



MOISÉS TOMÁS NGOME

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA
DE ALIMENTOS PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
PROPIÔNICO POR FERMENTAÇÃO E PURIFICAÇÃO
USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

LAVRAS- MG

2019

MOISÉS TOMÁS NGOME

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO POR FERMENTAÇÃO E PURIFICAÇÃO
USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

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

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves
Orientador

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Coorientadora

LAVRAS- MG

2019

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

Ngome, Moisés Tomás.

Aproveitamento de subprodutos da indústria de alimentos
para produção de ácido propiônico por fermentação e purificação
usando Sistemas Aquosos Bifásicos / Moisés Tomás Ngome. - 2019.
110 p.

Orientador (a): José Guilherme Lembi Ferreira Alves,
Coorientador (a) Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Soro de leite. 2. Água de maceração de milho. 3. Extração
líquido-líquido. 3. DCCR. 4. *Propionibacterium* spp. 5. *Lactobacillus*
spp. I. Universidade Federal de Lavras II. Título.

MOISÉS TOMÁS NGOME

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIONICO POR FERMENTAÇÃO E PURIFICAÇÃO
USANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

**THE USE OF BY-PRODUCTS OF THE FOOD INDUSTRY FOR THE
PRODUCTION OF PROPIONIC ACID BY FERMENTATION AND PURIFICATION
USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS**

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

APROVADA em 20 de fevereiro de 2019.

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dra. Olga Lucía Mondragón Bernal	UFLA
Dra. Lizzy Ayra Alcantara Verissimo	UFLA
Dr. Bernardo Onagar Yépez Silva Santisteban	INMETRO

Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves
Orientador

LAVRAS – MG

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar os meus sonhos em realidade.

À Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciências dos Alimentos, pelo aceite e oportunidade de realização do doutorado.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo ao doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Ao meu Orientador Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves por ter transformado o meu sonho em realidade, pelo total apoio, palavras de incentivo, colaboração, convivência, orientações e sugestões úteis durante a execução do projeto.

À Coorientadora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli pela confiança, disponibilidade em me ajudar e pela sua humildade que guardarei por toda a minha vida.

À Dra. Olga Lucia Mondragón-Bernal pela convivência, estímulo, ao longo do desenvolvimento desta tese, contribuições e ensinamentos que foram fundamentais à minha conquista.

Ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, pelo apoio e incentivo desde o início do curso e pelas sugestões valiosas que serviram para a melhoria de meu trabalho.

À Dra. Lizzy Ayra Alcantara Verissimo pela convivência, contribuições valiosas, durante a defesa, que foram essenciais para o trabalho.

À Dra. Sandra Maria Pinto e Dr. Michel Cardoso de Angelis Pereira pela humildade e convivência.

Aos técnicos(a) Fabrício, Ricardo e Cleuza pelo apoio nas análises Cromatográficas e do Soro de leite.

Aos Professores, técnicos e demais funcionários da UFLA, pela receptividade e atenção.

Aos meus colegas e ex-colegas de Pós-graduação, Iniciação Científica e BIC do Laboratório de Bioprocessos Dina, Cristiano, Fernanda, Débora, Isabela, Ana Cristina, Luiz, Alexandra, Laila, Kellen, Marília, Mariá, Ana Carolina, Ana Carla e Eduarda pela convivência, apoio e amizade e bons momentos de convívio.

Aos meus colegas do Departamento, pela amizade mantida desde o início do doutorado e pelos bons momentos vividos.

À minha esposa Ester e aos meus filhos: Samira, Ivan, Sheinase, Adnilson e Marnete, pelo amor, compreensão, paciência e pelo apoio constante, nos momentos difíceis, pois foi fundamental para a concretização de mais uma etapa.

Aos meus pais Tomás e Maria e familiares, irmãos, tios, tias, primos, primas, amigos e amigas, pela amizade que, mesmo distante, nunca nos separou.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para meu desenvolvimento científico e à realização deste trabalho.

Meu muito obrigado!

Aproveitamento de subprodutos da indústria de alimentos para produção de ácido propiônico por fermentação e purificação usando Sistemas Aquosos Bifásicos

Resumo geral

O ácido propiônico está entre os 30 produtos químicos aplicados como conservante de alimentos e de ração animal, intermediário químico na síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes e produtos farmacêuticos. O ácido propiônico pode ser produzido por síntese química e por fermentação. Em processos fermentativos, o custo do meio de cultivo é um dos fatores a ser reduzido. Além disso, tecnologias convencionais de purificação são o grande gargalo de todo o processo de produção, em termos de complexidade e alto custo, porque envolvem várias operações unitárias e, portanto, em cada passo, alguma quantidade de molécula alvo é perdida, resultando em grande perda global. Nesse sentido, o uso de subprodutos para o processo fermentativo como soro de leite (fonte de carbono) e água de maceração de milho (AMM) (fonte de nitrogênio), seguida de purificação do ácido propiônico, usando Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) que é uma tecnologia simples, podem ser opções economicamente viáveis. Assim, foi objetivo deste trabalho estudar a viabilidade do aproveitamento de subprodutos da indústria de alimentos para biossíntese de ácido propiônico por cultura mista e sua purificação do mosto fermentado usando SAB. Para isso, o experimento foi dividido em três etapas nas quais foi usado Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Na primeira etapa, empregou-se fatorial completo 2^3 , em que glicose e extrato de levedura foram substituídos por soro láteo. Foram testados três fatores (concentração das células, da lactose e do CaCO_3) e foi usada cultura mista de *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Apenas lactose e CaCO_3 foram significativos ($p < 0,05$) e conseguiu-se produzir ácido propiônico numa concentração de $23,27 \text{ g L}^{-1}$. Valores entre 20 a 45 g L^{-1} de lactose e acima de 26 g L^{-1} de CaCO_3 aumentaram a biossíntese do ácido propiônico. Na segunda etapa, foi conduzido um DCCR com 11 tratamentos, sendo glicose e extrato de levedura substituídos por soro láteo e AMM e foi usada cultura mista de *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 e *Lactobacillus paracasei*. Neste caso, os fatores testados foram lactose e AMM. Tanto a lactose como AMM foram significativos ($p < 0,05$) com a maior produção do ácido propiônico de $6,85 \text{ g L}^{-1}$. Este valor foi obtido com uso de 40 g L^{-1} de lactose e 65 g L^{-1} de AMM. Por fim, na terceira etapa, foram conduzidos novos experimentos empregando DCCR para avaliar a partição do ácido propiônico puro e a purificação de ácido propiônico em um sistema aquoso bifásico com polietilenoglicol (PEG) e citrato de sódio. As duas variáveis independentes foram PEG e citrato de sódio e foram testadas 2 massas molares de PEG (1500 e 4000). Foram determinados coeficientes de partição e relação de fases no processo de partição e purificação do ácido propiônico. Ainda na purificação, os melhores resultados foram analisados quanto à eficiência do processo. Os menores coeficientes de partição de ácido propiônico foram obtidos nos sistemas $24\% \text{ m m}^{-1}$ de PEG e $15\% \text{ m m}^{-1}$ de citrato de sódio, tanto para PEG1500, como para PEG4000, com valores inferiores a 0,4. Os melhores sistemas obtidos, para purificação dos ácidos orgânicos, com os menores coeficientes de partição de ácidos totais (K_{AT}), foram $16,7\% \text{ m m}^{-1}$ PEG e $13,5\% \text{ m m}^{-1}$ citrato, para PEG1500 com K_{AT} igual a 0,21 com uma eficiência de 58,03% e o sistema $24\% \text{ m m}^{-1}$ PEG e $15\% \text{ m m}^{-1}$ citrato com PEG4000, K_{AT} de 0,15. A eficiência do processo de purificação, para esse último, sistema foi de 68,15%. A utilização de soro láteo, água de maceração de milho e CaCO_3 , para a biossíntese de ácido propiônico com uso da cultura mista de bactérias propiônicas e lácticas, é viável. Nas condições testadas, a *Propionibacterium freundenreichii* apresentou melhores resultados da produção do ácido propiônico do que *Propionibacterium acidipropionicii*.

Palavras-chaves: soro de leite, água de maceração de milho, extração líquido-líquido, DCCR, *Propionibacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*

The use of by-products of the food industry for the production of propionic acid by fermentation and purification using Aqueous Two-Phase Systems

Abstract

Propionic acid is among the 30 best chemicals used as a component for products with various applications: food and animal feed preservatives, chemical intermediates in the synthesis of cellulose fibers, herbicides, perfumes and pharmaceuticals. Propionic acid can be produced by chemical synthesis and by fermentation. In fermentative processes, the cost of growing medium is one of the factors to be reduced. In addition, conventional purification technologies are also great bottleneck of the entire production process in terms of complexity and high cost because they involve several steps of unit operations and therefore at each step some amount of target molecule is lost, resulting in a large global loss. In this sense, the use of by-products such as whey (carbon source) and corn steep liquor (CSL) (nitrogen source) and then purification using Aqueous Two-Phase System (ATPS), which is a simple technology, can be economically feasible. Thus, the objective of this work was to study the viability of the use of by-products of the food industry for propionic acid biosynthesis and purification of the same in the fermented medium using ATPS. The experiment was divided into three stages. Central Composite Rotational Design (CCRD) was used at all stages. In the first step, 2^3 complete factorial was used, where glucose and yeast extract were replaced by whey. Three factors (cell, lactose and CaCO_3 concentration) were tested and mixed culture of *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei* were used. Only lactose and CaCO_3 were significant ($p < 0.05$), and propionic acid at a concentration of 23.27 g L^{-1} was produced. Values between 20 and 45 g L^{-1} of lactose and above 26 g L^{-1} of CaCO_3 increased the biosynthesis of propionic acid. In the second step, a CCRD with 11 treatments, glucose and yeast extract replaced by whey and CSL, was used and mixed culture of *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 and *Lactobacillus paracasei* were used. In this case, the factors tested were lactose and CSL. Both lactose and CSL were significant ($p < 0.05$) with the highest propionic acid production of 6.85 g L^{-1} . This value was obtained with the use of 40 g L^{-1} lactose and 65 g L^{-1} CSL. Finally, in the third step, 4 CCRD were conducted to evaluate the partition of pure propionic acid and the purification of propionic acid in a biphasic aqueous system with PEG and sodium citrate. The two independent variables were PEG and sodium citrate and 2 PEG molar masses (1500 and 4000) were tested. Partition coefficients and phase relations were determined in the partition and purification process of propionic acid. Still in the purification, the best results were analyzed for the efficiency of the process. The lowest propionic acid partition coefficients were obtained in the $24\% \text{ w w}^{-1}$ PEG and $15\% \text{ w w}^{-1}$ sodium citrate systems for both PEG1500 and PEG4000, with values lower than 0.4. The best systems for purification of organic acids, with the lowest total acid partition coefficients (K_{AT}), were $16.7\% \text{ w w}^{-1}$ PEG and $13.5\% \text{ w w}^{-1}$ citrate, for PEG1500 with K_{AT} equal to 0.21 with an efficiency of 58.03% and the system $24\% \text{ w w}^{-1}$ PEG and $15\% \text{ w w}^{-1}$ citrate with PEG4000, K_{AT} of 0.15. The efficiency of the purification process for the latter system was 68.15%. The use of whey, CSL and CaCO_3 , for the biosynthesis of propionic acid with the use of the mixed culture of propionic and lactic bacteria is feasible. In the conditions tested, *Propionibacterium freundenreichii* showed better results in the production of propionic acid than *Propionibacterium acidipropionicii*.

Keywords: whey, corn steep liquor, liquid-liquid extraction, central composite rotational design, *Propionibacterium spp*, *Lactobacillus spp*.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1. Vias da biossíntese de ácido propiônico em bactérias propiônicas.....	17
Figura 2. Exemplos de componentes e tipos de sistema aquoso bifásico.....	27

SEGUNDA PARTE

Artigo 1:

Fig. 1. Contour curves for the production of propionic acid (A) and yield (B) of propionic acid (x1 fixed at the central point corresponding to LogUFC mL-1 equal to 7).....	54
Fig. 2. Contour curve for the production of lactic acid (A) and acetic acid (B) (x1 fixed at the central point corresponding to LogUFC mL-1 equal to 7).....	54
Fig. 3. Variation of pH over 120 h of fermentation.....	56
Fig. 4. Consumption of lactose during fermentation.....	57
Fig. 5. Kinetics of organic acid production for treatment 14.....	58

Artigo 2:

Figura 1. Influência da concentração de lactose e da água de maceração de milho na produção de ácidos orgânicos: (A) Ácido Propiônico e (B) Ácido Lático.....	78
Figura 2. Efeitos da concentração da lactose e da AMM sobre YAP/S (rendimento do ácido propiônico) (A) e YAA/S (rendimento do ácido acético) (B).....	78
Figura 3. Efeitos da concentração da lactose e da AMM sobre o crescimento bacteriano: Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B).....	79
Figura 4. Variação do pH (A), da acidez (B) e consumo de lactose (C) durante a fermentação por cultura mista de <i>P. acidipropionici</i> e <i>L. paracasei</i>	81

Artigo 3:

Figura 1. Extração em batelada utilizando sistemas aquosos bifásicos.....	92
Figura 2. Curvas de contornos para coeficiente de partição do ácido propiônico (A) e relação de fases (B) para partição do ácido propiônico nos sistemas com PEG1500/Citrato (sistema modelo).....	102
Figura 3. Curvas de contornos da relação de fases (A) e (B), nos sistemas reais, para a purificação do ácido propiônico, usando PEG1500 e PEG4000, respectivamente.....	102

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1. Mercado global e preços dos ácidos propiônico e acético.....	15
Tabela 2. Composição do soro do queijo	23
Tabela 3. Composição centesimal da água de maceração de milho (AMM)	24
Tabela 4. Métodos de separação para recuperação de ácidos carboxílicos do caldo de fermentação	26

SEGUNDA PARTE

Artigo 1:

Table 1. Relationship between coded and real values of independent variables for CCRD	46
Table 2. Composition of the normal whey and the whey concentrate	49
Table 3. CCRD matrix with results for lactate, acetate and propionate concentrations in g L ⁻¹ , growth factor and propionic acid yield.....	49
Table 4. Regression coefficients, reparametrized, for LA, AA and PA production by a mixed culture of <i>P. freundenreichii</i> ATCC 6207 and <i>L. paracasei</i>	53

Artigo 2:

Tabela 1. Relação entre valores codificados e reais das variáveis do (DCCR).....	73
Tabela 2. Resultados da produção de ácidos, rendimento e fator de crescimento, após 120 h de fermentação, em função da concentração de lactose e água de maceração de milho.....	75
Tabela 3. Coeficientes de regressão para as respostas PAP, PAA, PAL, YAP/S, YAA/S, YAL/S e FC	76

Artigo 3:

Tabela 1. Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR para os Sistemas PEG1500/citrato de sódio/água e PEG4000/citrato de sódio/água.....	95
Tabela 2. Resultados dos coeficientes de partição do ácido propiônico (KAP) e relação de fases obtidos no DCCR para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água e PEG4000/citrato de sódio/água, no sistema modelo.....	98
Tabela 3. Resultados dos coeficientes de partição dos ácidos orgânicos totais (KAT) e relação de fases obtidos no DCCR para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água e PEG4000/citrato de sódio/água, no sistema real	99
Tabela 4. Coeficientes de regressão para as respostas KAP e R _f da partição do ácido propiônico puro (sistema modelo).....	100
Tabela 5. Coeficientes de regressão para as respostas KAT e R _f para os sistemas com partição de meio fermentado (sistema real).....	101
Tabela 6. Caracterização do meio fermentado quanto ao pH, de lactose e de produção de ácidos.....	103
Tabela 7. Concentração dos ácidos, nas fases topo e fundo dos sistemas reais, rendimento de extração de ácido propiônico e acético, nos dois tratamentos selecionados, para a análise por cromatografia em diferentes sistemas aquosos bifásicos	104

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Objetivo Geral	14
1.1.1 Objetivos Específicos.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Ácido propiônico	15
2.2 Aplicação do ácido propiônico	15
2.3 Bioprocesso da produção do ácido propiônico.....	16
2.4 Bactérias do ácido propiônico e do ácido láctico	19
2.5 Fontes de carbono e nitrogênio.....	22
2.6 Purificação do ácido propiônico	25
2.7 Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB).....	27
2.7.1 Coeficiente de partição	29
Bibliografia.....	30
4. Artigo 1: Biosynthesis of propionic acid using whey by mixed culture of <i>Propionibacterium freundenreichii</i> subs ATCC 6207 and <i>Lactobacillus paracasei</i>	40
5. Artigo 2: Otimização da formulação de meio de fermentação com soro de queijo Minas frescal e água de maceração de milho para a produção de ácido propiônico a partir da cultura mista de <i>Propionibacterium acidipropionicii</i> NRRL B-3568 e <i>Lactobacillus paracasei</i>	67
6. Artigo 3: Partição e purificação de ácido propiônico obtido por fermentação em Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo polietilenoglicol e citrato de sódio	90

1. INTRODUÇÃO

Considerando a escassez de recursos naturais e os graves danos da poluição ambiental causados pela produção química de ácido propiônico (CHEN et al., 2012; GUAN et al., 2015b), bem como os aumentos constantes do preço do petróleo, a atenção mundial tem sido voltada ao aproveitamento de subprodutos, para a obtenção de vários produtos valiosos, a partir de recursos renováveis. Uma tendência atual da indústria química é usar processos que atendam aos princípios da Química Verde, vertente da Química que tem como uma de suas principais idéias a aplicação de recursos biodegradáveis, sem gerar resíduos tóxicos ao meio ambiente. Os subprodutos são fontes frequentes de compostos biologicamente ativos (podem ser boa fonte de carbono, proteínas, pectina, fibras, vitaminas e ácidos orgânicos). Seu aproveitamento pode reduzir o custo da formulação de meios de fermentação, viabilizando economicamente os processos fermentativos (PIWOWAREK et al., 2018a; YANG et al., 2018).

Embora o baixo custo da síntese química do ácido propiônico seja grande vantagem, em razão de algumas desvantagens, como o uso de catalisadores complexos, reagentes tóxicos e alto consumo de energia, a produção microbiana de ácido propiônico, usando os subprodutos, tem atraído interesses, particularmente pelo uso de processos ambientalmente amigáveis (ZHUGE et al., 2014). Por outro lado, algumas limitações da produção microbiana, tais como alta complexidade de substratos e processos demorados com possível inibição pelo produto final, como também as etapas necessárias para a recuperação e purificação, tornam este processo menos competitivo comparado aos processos químicos (FENG et al., 2011). Assim, uma visão detalhada das variáveis do processo como pH, temperatura, concentração celular, estratégias de mistura de substratos ou microrganismos complementares, fermentação extrativa, uso de bactérias tolerantes ao ácido obtidas por evolução adaptativa, uso de células imobilizadas, pode ser abordada para superar as limitações, bem como melhorar o desempenho da produção de ácido propiônico.

A demanda por ácido propiônico produzido via fermentação aumentou, o que está relacionado à introdução de produtos com “rótulos limpos”, sem aditivos artificiais no mercado (BAUMANN; WESTERMANN, 2016). A utilização de subprodutos em bioprocessos pode resultar na redução da poluição ambiental, não apenas pelo descarte desses subprodutos, mas também por sua transformação em compostos industriais úteis e valiosos, como o ácido propiônico (PIWOWAREK et al., 2018a; YANG et al., 2018). As matérias-primas, principalmente, a fonte de carbono e nitrogênio, usadas na fermentação, representam

uma grande parcela (> 30%) do custo do produto para o ácido propiônico de base biológica (TUFVESSON et al., 2013). Portanto mais estudos foram realizados para investigar a aplicação de subprodutos de baixo custo (como soro de leite, hidrolisados de farinha, água de maceração de milho) ou resíduos agroindustriais baratos (como glicerol e melão de cana) (DISHISHA et al., 2013; ZHUGE et al., 2014; CORAL et al., 2008; NGOME et al., 2017; CRIVELARI et al., 2018; YANG et al., 2018; ZHANG et al., 2015). Essas fontes de carbono e de nitrogênio foram identificadas em nível de bioprocessos, para substituir o açúcar mais caro (glicose) e extrato de levedura, respectivamente, no crescimento celular e produção de ácido propiônico.

Bactérias das espécies *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium jensenii*, *Propionibacterium thoenii* e *Propionibacterium acidipropionici* parecem ser as mais apropriadas à produção biotecnológica do ácido propiônico. Em virtude de sua ampla variedade de sistemas enzimáticos, elas podem utilizar carbono de várias fontes puras e de subprodutos (FENG et al., 2011; ZHU et al., 2012, 2010; YANG et al., 2018). Também possuem um sistema metabólico que torna possível produzir vitamina B₁₂ (CHEN et al., 2012; ZHU et al., 2010; PIWOWAREK et al., 2018a, 2018b). Além disso, as cepas de *P. freudenreichii* são consideradas bactérias seguras pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos, que permite o uso dessas células bacterianas e seus metabólitos na produção de alimentos como queijos do tipo suíço e ração animal entre outras aplicações (SALMINEN et al., 2002; GUAN et al., 2015b; EŞ et al., 2017). Os metabólitos (ácido propiônico, acético, vitamina B₁₂ e trealose) são comumente usados nas indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia, além de também serem usados como aditivos em forragens para gado.

A importância da produção de ácido propiônico por fermentação torna necessário desenvolver novos métodos eficientes ou melhoria substancial para a purificação de ácido propiônico do meio de fermentação (HENCZKA; DJAS, 2016). O meio fermentado, contendo o ácido propiônico ou propionato, contém geralmente várias impurezas, tais como açúcares, sais, subprodutos de fermentação e detritos derivados da lise celular. A separação dessas impurezas é complexa pela sensibilidade do produto, em alguns casos, em relação a solventes orgânicos, em outros casos, a baixas concentrações no meio fermentado, valores de pH ou altas temperaturas.

Embora várias tecnologias convencionais de purificação tenham sido amplamente empregadas, elas geralmente são um grande gargalo de todo o processo de produção, em termos de complexidade e alto custo, o que pode representar mais de 70% do custo total do

produto purificado (RAJA et al., 2011). Envolve vários passos de operações unitárias e, portanto, em cada passo, alguma quantidade de molécula alvo é perdida, resultando em uma grande perda global (RAJA et al., 2011; GLYK; SCHEPER; BEUTEL, 2015). Dessa forma, a purificação é um dos principais entraves para a comercialização de produtos biológicos. Neste contexto, os Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) de polietilenoglicol e sal (PEG)/sal representam uma tecnologia de extração líquido-líquido promissora e eficiente, para a purificação de várias biomoléculas, como proteínas, enzimas, ácidos, vírus, anticorpos e organelas celulares. Além disso, os SAB podem superar as limitações das técnicas tradicionais de purificação e ganhar importância para aplicações, em diversos campos de bioprocessos, por suas vantagens versáteis quanto aos métodos de purificação convencionais. São alguns exemplos das suas vantagens a biocompatibilidade, simplicidade da técnica, menor custo total pela redução do número de etapas na purificação, baixo custo dos materiais de formação de fase, separação rápida com poucas alterações do produto e de fácil potencial de expansão.

Estão disponíveis várias e recentes revisões na literatura sobre processos de fermentação com ácido propiônico e técnicas de melhoria na sua produção (VIDRA; NÉMETH, 2018). No entanto existem poucos dados sobre a biossíntese deste ácido, usando mistura de subprodutos (soro lácteo e água de maceração de milho) e sua purificação. Ainda que o soro tenha se tornado uma fonte barata de carbono, pois aumento de processos de produção de queijo fornece uma grande quantidade de soro como subproduto, há pretensão de novas aplicações deste subproduto. As fontes de carbono e de nitrogênio mais comuns, para a produção de ácido propiônico, são lactato/glicose e extrato de levedura, respetivamente, sendo esses adequados para garantir o crescimento das bactérias propiônicas, porém estes nutrientes contribuem de forma significativa, para um aumento dos custos de produção, limitando suas aplicações em processos industriais. Como uma alternativa para extrato de levedura, a água de maceração de milho, um produto secundário obtido, a partir do processo de maceração de milho, pode ser uma opção economicamente viável, sendo um subproduto rico em proteínas, vitaminas e minerais. A maioria dos artigos existentes na literatura concentram-se na purificação de enzimas e proteínas. Para a purificação do ácido propiônico em meio fermentado, ainda, constitui um grande desafio. Por isso, foram objetivos deste trabalho estudar a viabilidade do aproveitamento de subprodutos da indústria de alimentos para a produção de ácido propiônico por fermentação e estudar a purificação do ácido propiônico no meio fermentado usando Sistemas Aquosos Bifásicos.

1.1 Objetivo Geral

Estudar a produção de ácido propiônico utilizando soro de queijo e cultura mista de *Propionibacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*

1.1.1 Objetivos Específicos

- Analisar a cinética da fermentação propiônica, utilizando subprodutos da indústria de alimentos (soro lácteo e água de maceração de milho), usando cultura mista de *Propionibacterium spp.* e *Lactobacillus spp.*;
- Avaliar a biossíntese do ácido propiônico e ácido acético, além do consumo de lactose e das concentrações de ácido láctico usando soro de queijo Minas frescal e cultura de *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 e *Lactobacillus paracasei*;
- Otimizar a formulação de meio de fermentação com soro de queijo e água de maceração de milho, para a produção de ácido propiônico, a partir da cultura mista de *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 e *Lactobacillus paracasei*;
- Examinar a partição do ácido propiônico em Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) do tipo polietilenoglicol e sal (PEG/sal);
- Investigar a purificação do ácido propiônico obtido por fermentação do soro lácteo usando SAB PEG/sal.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácido propiônico

O ácido propiônico é um ácido orgânico monocarboxílico, com três átomos de carbono. Apresenta a fórmula molecular ($C_3H_6O_2$) de cadeia aberta e com a massa molar de 74 g mol^{-1} (BARBOSA, 2011; MCMURRY, 2010). Caracteriza-se pela presença do grupo $-COOH$, denominado carboxila ou grupo carboxílico (BARBOSA, 2011). É reconhecido 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). É um ácido polar e pode formar ligações de hidrogênio (pontes de hidrogênio). Solúvel em água, ioniza-se parcialmente em solução aquosa ($CH_3CH_2COOH + H_2O = CH_3CH_2COO^- + H_3O^+$) e com constante de dissociação $K_a = 1.34 \cdot 10^{-5}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O grupo etila ($CH_3CH_2^-$) tem efeito indutivo doador de elétrons, sendo, portanto, ácido fraco, e os seus sais são ativos em alimentos com baixa acidez. Apresenta temperatura de fusão de $-22 \text{ }^\circ\text{C}$ e de ebulição de $141 \text{ }^\circ\text{C}$ (BARBOSA, 2011).

2.2 Aplicação do ácido propiônico

Dados de mercado sobre compostos da bioprodução, como os ácidos orgânicos, não estão prontamente disponíveis para o mundo acadêmico, mas apenas para fornecedores comerciais. As empresas de serviços oferecem relatórios de análise e previsões recentes de mercado, mas, para ter acesso a um relatório de 100 a 300 páginas, precisa-se fazer um pagamento de cerca de US\$ 5.000 (BAUMANN; WESTERMANN, 2016). Alguns dados da produção do ácido propiônico e acético dos anos 2014 e 2015 são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Mercado global e preços dos ácidos propiônico e acético

Ácido	Produção em toneladas (t)	Ano	Preço (USD/t)	Referências
Propiônico	$3,8 \cdot 10^5$	2014	1500–2000	http://www.lookchem.com/
			1600–2300	http://www.alibaba.com/
Acético	$1,6 \cdot 10^7$	2015	500–850	http://www.alibaba.com/ http://www.lanzatech.com/

Fonte: Baumann; Westermann, (2016).

Segundo o Departamento de Energia dos EUA, o ácido propiônico está entre os 30 melhores produtos químicos utilizados como componentes para produtos com diversas

aplicações (WERPY et al., 2004; DISHISHA; ALVAREZ; HATTI-KAUL, 2012; LIU et al., 2016; ZHUGE et al., 2014). O ácido propiônico é usado, principalmente, na forma de sal de cálcio, sódio, potássio ou de amônio como conservante de alimentos (CORAL et al., 2008; NGOME et al., 2017; VIDRA; NÉMETH, 2018a; YANG et al., 2018), geralmente, reconhecidos como aditivos alimentares seguros (EŞ et al., 2017). Usa-se o ácido propiônico ou propionato como aditivo e conservante na produção de alimentos e rações de animais. É também importante intermediário químico na síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes, aromas e produtos farmacêuticos (CORAL et al., 2008; VIDRA; NÉMETH, 2018).

O ácido propiônico e seus sais são capazes de inibir o crescimento de microrganismos (WANG; LIU, 2014). O mecanismo de inibição do crescimento de fungos, leveduras e algumas bactérias é bem complexo, mas a visão predominante é de que o ácido propiônico perturba a membrana celular pela diminuição do gradiente do pH do meio. O ácido não dissociado pode difundir-se da membrana bacteriana para o citoplasma e depois dissociar-se ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH} = \text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+$) dentro da célula, assim, permitindo um "vazamento" interno de prótons. A fim de manter o gradiente de prótons funcional por meio da membrana, o trifosfato de adenosina (ATP) extra deve ser consumido, para expulsar o próton (H^+), diminuindo o ATP disponível para o metabolismo celular (CORAL et al., 2008; GU; GLATZ; GLATZ, 1998). O ácido propiônico, além de modificar o sabor do queijo (DISHISHA et al. 2012), pode prevenir a infecção de fungos em aves e outros animais (LIND; JONSSON; SCHN, 2005).

2.3 Bioprocesso da produção do ácido propiônico

O ácido propiônico é produzido principalmente por hidrocarboxilação de eteno na indústria petroquímica, com um mercado global de 390.000 toneladas com receitas de US\$ 908 milhões em 2012. Estima-se que o seu mercado cresça a uma taxa anual superior a 6,7 % e atinja uma receita de US\$ 1,53 bilhão até 2020 (YANG et al., 2018). Considerando a escassez e a natureza finita de recursos do petróleo e os graves danos ambientais causados pela produção química de ácido propiônico, bem como aumento da demanda por produtos alimentícios naturais e ecológicos (CHEN et al., 2012; AHMADI; KHOSRAVI-DARANI; MORTAZAVIAN, 2017), como também a introdução de alimentos com "rótulos limpos" sem aditivos artificiais no mercado da América do Norte e países europeus, aumentou a demanda por ácido propiônico de origem microbiana (BAUMANN; WESTERMANN, 2016), com uso de resíduos gerados de várias indústrias, incluindo a alimentícia, o que deve reduzir

consideravelmente o custo e melhorar o status ambiental. Para tanto, a busca pelas novas vias metabólicas é necessária para intensificar a biossíntese do ácido propiônico (CHEN et al., 2012).

São citadas na literatura três vias, mas a via Wood-Werkman é a mais importante da biossíntese de produção de ácido propiônico, na qual as bactérias propiônicas são utilizadas (FALENTIN et al., 2010). Além das bactérias propiônicas, esta via também está presente em *Veilonella alcalescens* e *Selenomonas ruminantium* (REICHARDT et al., 2014). O produto primário da fermentação, na via de Wood-Werkman, é o ácido propiônico, que é muito eficientemente biossintetizado, quando comparado ao ácido acético e a outros subprodutos (KOŚMIDER ET AL., 2010). Os subprodutos dessa via são metilmalonil-CoA, succinil-CoA e CO₂ (FALENTIN et al., 2010). A via de Wood-Werkman (Figura 1) começa com a transformação do piruvato gerado, durante a glicólise, em oxaloacetato na presença de metilmalonil-CoA carboxiltransferase e complexo de biotina-CO₂. Em seguida, oxaloacetato é reduzido por malato e fumarato em succinato. Na etapa seguinte, o succinato é acetilado pela succinil-CoA sintetase em succinil-CoA, que, em cooperação com a coenzima B₁₂ (cobalamina) e a metilmalonil-CoA mutase, é transformada em metilmalonil-CoA que, em seguida, leva à geração de propionil-CoA. CoA transferase libera CoA de propionil-CoA, transformando-o em propionato (FALENTIN et al., 2010; PIWOWAREK et al., 2018). Uma das características fundamentais do ciclo é a reação de transcarboxilação e a enzima que catalisa essa reação é metilmalonil-CoA carboxiltransferase, que transfere o grupo carboxílico de metilmalonil-CoA, para o piruvato, com a geração de ácido oxaloacético e propionil-CoA. Esta enzima é uma carboxitransferase dependente de biotina (FALENTIN et al., 2010).

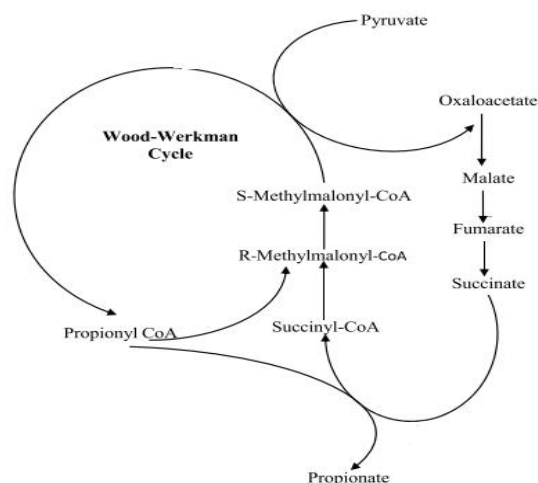


Figura 1. Vias da biossíntese de ácido propiônico em bactérias propiônicas
Adaptado: Falentin et al. (2010).

O piruvato é um nó importante, nas vias metabólicas das propionibactérias, porque o ácido propiônico, o ácido acético e o ácido succínico, bem como a biomassa, são todos formados a partir do piruvato (WANG; YANG, 2013). Numa comparação dos principais metabólicos, na síntese de ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici*, foi verificado que Propionil-CoA, metilmalonil-CoA e succinil-CoA são fatores cruciais na biossíntese de ácido propiônico como precursores diretos do produto. Para elevar as quantidades intracelulares destes fatores, foram adicionados fumarato, malato e succinato, separadamente, à cultura de fermentação de *P. acidipropionici* CGMCC 1.2230. Assim, foram observadas melhorias acentuadas na produção de ácido propiônico com concentrações de 10,6, 10,7 e 10,5 g L⁻¹, após adição de fumarato 30 m mol L⁻¹, malato 40 m mol L⁻¹ e succinato 20 m mol L⁻¹, respectivamente. Logo os resultados mostraram que fumarato, malato e succinato foram efetivamente utilizados ao entrar no ciclo de Wood-Werkman e aumentaram a bioprodução do ácido propiônico (GUAN et al., 2015b). Além desses fatores, o NAD⁺ participa da glicólise como a coenzima da desidrogenase, que traz uma grande quantidade de ATP para bombear o H⁺ para fora das células. A oxidação de NADH em NAD⁺ é necessária, para a biossíntese de ácido propiônico e, portanto uma menor relação NAD⁺/NADH é benéfica para a produção de ácido propiônico. A maior razão de NAD⁺/NADH aumenta a tolerância das bactérias ao ácido, mas é desvantajosa na produção do ácido propiônico (LIU et al., 2012). Como a glicólise não pode fornecer NADH suficiente, para a produção de ácido propiônico, o ácido acético é formado como um metabólito compensador, fornecendo um poder redutor extra para manter o equilíbrio redox. Consequentemente, para produzir ácido propiônico, a partir de glicose, que tem um estado redox mais baixo do que o ácido propiônico, requer-se a coprodução de um metabólito mais oxidado, o ácido acético (WANG; YANG, 2013). Vários substratos, incluindo glicose, sacarose, lactose, glicerol e lactato podem ser utilizados por bactérias propiônicas para a biossíntese do ácido propiônico (GUAN; ZHUGE et al., 2015). No entanto a produção de ácido propiônico, a partir da glicose, é fortemente limitada pela produção de ácido acético (WANG; YANG, 2013). Assim sendo, há um grande esforço para melhorar a biossíntese do ácido propiônico (ZHU et al., 2010) com o desenvolvimento de fermentação de alta densidade celular, por meio da imobilização celular (DISHISHA et al., 2012; ZHU et al., 2012), fermentação extrativista e adaptação evolutiva (JIN; YANG, 1998; ZHU et al., 2012), processo de fermentação com alimentação do substrato (WANG et al., 2017). Embora esses processos tenham sido demonstrados como abordagens eficientes, para aliviar a inibição e aumentar a produtividade do ácido propiônico, a complexidade do processo de controle desses

biorreatores pode, em última análise, limitar sua aplicação na escala industrial (WANG; JIN; YANG, 2015).

2.4 Bactérias do ácido propiônico e do ácido lático

Bactérias propiônicas são grupos de bactérias anaeróbias, Gram-positivas e facultativas, não formadoras de esporos (THIERRY et al., 2011; PIWOWAREK et al., 2018a), catalases positivas e apresentam-se em forma de bastonetes curtos ou de cocos, de acordo com o meio em que se encontram (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002). Este grupo de bactérias pode crescer em vários tipos de fontes de carbono (CORAL et al., 2008). As colônias destas bactérias propiônicas no meio sólido podem ser de cor creme, laranja, vermelha ou marrom, dependendo da espécie. No meio líquido, elas se comportam como um pellet de fibras (PIWOWAREK et al., 2018). Nos últimos anos, foi reconhecida por suas propriedades probióticas para o consumo humano (WANG; YANG, 2013). Várias espécies de bactérias propiônicas, incluindo *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii* e *P. shermanii* são geralmente consideradas como seguras (WANG; YANG, 2013; AHMADI; KHOSRAVI-DARANI; MORTAZAVIAN, 2017; PIWOWAREK et al., 2018a).

As bactérias propiônicas são amplamente utilizadas nos bioprocessos e na indústria de laticínios, para fabricar produtos como queijo tipo suíço, vitaminas do grupo B como o caso de vitamina B₁₂, trealose e bacteriocinas, além da bioprodução do ácido propiônico (WANG; JIAO; LIU, 2014; BIOTECHNOL; PAPER, 1994; CORAL et al., 2008; CHAMLAGAIN et al., 2018; PIWOWAREK et al., 2018a, 2018b). Além de modificar o sabor do queijo pela geração de compostos voláteis (ácidos acético e propiônico) e compostos derivados do catabolismo de aminoácidos e lipídios, as propionibactérias lácteas (DISHISHA; ALVAREZ; HATTI-KAUL, 2012; ZÁRATE; PÉREZ-CHAIA, 2012), também, são utilizadas como cultura e aditivos em alimentos e silagem para inibir o crescimento de bolores e leveduras (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002).

Todas as bactérias clássicas do gênero *Propionibacterium* têm capacidade de fermentação e são importantes fontes de metabólitos valiosos (ácido propiônico, vitamina B₁₂, bacteriocina e trealose). Um exemplo são as cepas de *P. freudenreichii subsp. shermanii* que podem metabolizar a lactose (eles têm genes que codificam a enzima β -D-galactosidase (PIWOWAREK et al., 2018a; SUOMALAINEN et al., 2008). *Propionibacterium* é muito suscetível ao pH, portanto o controle do pH é importante, pois o crescimento é geralmente inibido em pH menor que 4,5. O seu crescimento ótimo é entre pH 6-7 (EŞ et al., 2017). O

pH mais baixo melhora a relação entre a concentração de ácido propiônico e ácido acético (5:1), todavia a produtividade do ácido propiônico diminui ($0,11 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$). Em pH maior que 6 (até 7,5), menores proporções de ácido propiônico, para a concentração de ácido acético (2,5:1), foram obtidas, mas a produtividade de ácido propiônico aumentou ($0,2 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) (SESHADRI; MUKHOPADHYAY, 1993). Em outro estudo com a estratégia de controle de pH, em dois estágios (pH de 6,5 por 48 h e, posteriormente, para 6,0), foi observada uma eficiência máxima de conversão de glicose em ácido propiônico de 48,03%, uma melhoria significativa de produção em $19,21 \text{ g L}^{-1}$ comparando com o processo de operação com pH constante (6,0), em que a eficiência de conversão foi de 36,45% e uma produção do ácido propiônico de $14,58 \text{ g L}^{-1}$ (FENG et al., 2010). Além do pH, a temperatura é um dos fatores mais importantes que influenciam o rendimento da biomassa e da biossíntese do ácido propiônico (AHMADI et al., 2017). A temperatura ideal, para o crescimento destas bactérias, varia de 30 a 37 °C e foi relatado que a produção de ácido propiônico diminui com incrementos de temperatura de 30 para 37 °C, enquanto a produção de biomassa aumenta (SESHADRI; MUKHOPADHYAY, 1993). Entretanto, nos experimentos com a cepa *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4965, foram observados melhores resultados tanto da produção de ácido propiônico quanto da taxa de crescimento de biomassa a 30 °C do que a 36 °C em todos os ensaios (CORAL et al., 2008).

As bactérias do ácido láctico são conjunto de diferentes gêneros que se apresentam, na forma de bastonetes, variando de longos a curtos, são Gram-positivas, não formam esporos, a maioria são anaeróbicas ou microaerófilas e catalase negativa (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). Estas bactérias pertencem ao filo *Firmicutes*, sendo este composto por cerca de 20 gêneros. Os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* são os mais estudados entre as bactérias lácticas (ERCOLINI et al., 2001; HOLZAPFEL et al., 2001; JAY, 2000). Na fermentação, as bactérias do ácido láctico podem ser classificadas como homolática ou heterolática. A fermentação homolática ou glicólise fornece exclusivamente lactato como produto final. Já a fermentação heterolática segue a rota do fosfogluconato, fornecendo lactato, etanol (e/ou acetato) e CO_2 em quantidades equimolares (LEHNINGER; NELSON; COX, 2002).

Fermentação homolática compreende duas etapas. No primeiro passo, chamada de glicólise ou via Embden-Meyerhof-Parnas, a glicose é transformada em ácido pirúvico, enquanto, no passo seguinte, este é reduzido para ácido láctico pela enzima lactato desidrogenase (MARTINEZ et al., 2013). As bactérias do ácido láctico ou homofermentativas

fermentam 1 mol de glicose a 2 moles de ácido láctico, gerando um rendimento líquido de 2 moles de ATP por molécula de glicose, sendo o ácido láctico o produto principal desta fermentação com rendimento de mais de 0,90 g g⁻¹ (REDDY et al., 2008; WEE; KIM; RYU, 2006). São exemplos de bactérias homofermentativas *L. acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus* (NIGATU, 2000; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001; KOZHAKHMETOV et al., 2013). Já a fermentação heterolática é caracterizada pela formação de ácido láctico como produto principal além de produtos secundários como exemplo o CO₂, etanol e/ou ácido acético (MARTINEZ et al., 2013). O subproduto reduz o rendimento teórico do ácido láctico a partir da glicose para 0,50 g g⁻¹ ou 1,0 mol mol⁻¹ (REDDY et al., 2008; ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011; MARTINEZ et al., 2013). O primeiro passo das bactérias hereofermentativas é a degradação da glicose, chamada de via das pentoses fosfato, produzindo gliceraldeído 3- fosfato, acetil-fosfato e CO₂. O gliceraldeído 3-fosfato entra na glicólise por meio da qual é transformado em ácido láctico, enquanto o acetil-fosfato é convertido em ácido acético e/ou etanol (MARTINEZ et al., 2013). São exemplos das bactérias que utilizam esta via metabólica para o consumo de hidratados de carbono *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. parabuchneri* e *L. reuteri* (NIGATU, 2000; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

O gênero *Lactobacillus* é o maior dentre os gêneros que compreendem as bactérias lácticas, abrangendo cerca de 80 espécies reconhecidas (AXELSSON, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). Os lactobacilos não possuem sistema de citocromo e são incapazes de utilizar o oxigênio como aceptor de elétrons. Em vez 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 lactobacilos levam vantagem em relação aos competidores (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000).

A temperatura ótima de crescimento das bactérias lácticas varia de acordo com o gênero e está entre 20 a 45 °C e o crescimento ótimo ocorre na faixa de pH entre 5 a 7 (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL 2000; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007). O gênero *Lactobacillus* é considerado como seguro, para a produção industrial de ácido láctico, por não apresentar efeitos adversos à saúde de seres humanos (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

As células de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* apresentam-se em forma de bastonete e crescem entre 10 a 40 °C; para algumas estirpes, esse intervalo aumenta para 5 a

45 °C. São usadas para a biossíntese dos isômeros do ácido láctico (COLLINS; PHILLIPS; ZANONI, 1989). A um pH de 6,5 controlado pela adição de hidróxido de sódio, *L. paracasei* subsp. *Paracasei*, CHB2121 metabolizou eficientemente 200 g L⁻¹ de glicose para produzir concentrações de 192 g L⁻¹ de ácido L-láctico, com produtividade de 3,99 g L⁻¹h⁻¹, rendimento de 0,96 g g⁻¹, e pureza óptica de 96,6%. Como a proporção de ácido láctico é de, aproximadamente, 97%, *L. paracasei* CHB2121 foi identificado como tendo propriedades homofermentativas (ABDEL-RAHMAN et al., 2013; MOON; WEE; CHOI, 2012).

2.5 Fontes de carbono e nitrogênio

As matérias-primas, principalmente, a fonte de açúcar e nitrogênio usada na fermentação, representam uma grande parcela (> 30%) do custo do produto de base biológica como o ácido propiônico (TUFVESSON et al., 2013). Portanto mais estudos foram realizados, para investigar a aplicação de fontes de carbono e nitrogênio renováveis ou substratos de baixo custo (como soro de leite, hidrolisados de farinha, água de maceração de milho, casca de batata) (CORAL et al., 2008; FENG et al., 2010; MENEZES, 2014), para substituir o açúcar mais caro (glicose) e extrato de levedura (YANG et al., 2018), visto que as bactérias propiônicas são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono, incluindo lactose (CORAL et al., 2008; NGOME et al., 2017), glicose (CORAL et al., 2008; HIMMI; BORIES; BOUSSAID, 2000; MART, 2002; WANG; YANG, 2013; BELGRANO et al., 2018), lactato (CORAL et al., 2008; MART, 2002), glicerol (CORAL et al., 2008; HIMMI; BORIES; BOUSSAID, 2000; ZHANG; YANG, 2009; WANG; YANG, 2013), melão (Ahmadi and KHOSRAVI-DARANI, 2015; CORAL et al., 2008), sacarose (CORAL et al., 2008; QUESADA-CHANTO; AFSCHAR; WAGNER, 1994), xilose (CORAL et al., 2008) entre outras.

O soro lácteo é o principal subproduto obtido na produção de queijo. É um líquido diluído de cor amarela esverdeada, que contém lactose, proteínas, minerais e vestígios de gordura, com, aproximadamente, 70% ou mais constituídos por lactose. A sua composição difere, dependendo da origem da espécie, do processo tecnológico da produção do queijo (Tabela 2), mas os componentes brutos são similares e em quantidades diferentes (ZALL, 1992).

Tabela 2. Composição do soro do queijo

Componentes	Quantidade
Água	93-94%
Sólidos totais	5,9-6,9%
Gordura	0,1-05%
Proteína	0,7-09%
Lactose	4,5-5%
Minerais	0,6-1,6%
Sódio	0,13%
Potássio	0,14%
Cálcio	0,12%
Fósforo	0,10%
Nitrato	45ppm
Ferro	1ppm

Fonte: ZALL, (1992); FRANCO, (1982) e OLIVEIRA et al. (2012).

O soro contém também a maioria das vitaminas presentes no leite (solúveis em água), como a vitamina B₁₂, a vitamina B₆, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina, vitamina C e retinol além de ácido láctico, de ácido cítrico e, compostos nitrogenados não-proteicos (ureia e ácido úrico) (DRAGONE et al., 2009; GUIMARÃES, 2010). Em vista da composição do soro de leite, existe um interesse considerável em fermentar a lactose proveniente do soro para a produção de sais de ácido propiônico. O soro tem alto teor de lactose, mas carece de grandes aplicações econômicas. Uma das alternativas do uso poderia ser para a produção de ácido propiônico. O caldo fermentado, contendo ácido propiônico, pode ser seco e usado como ingrediente natural na indústria de alimentos, como, por exemplo, ser usado em produtos de panificação que eliminaria o fluxo de resíduos nas indústrias de laticínios e atingiria contaminação ambiental baixa (YANG; HUANG; HONG, 1995). Por isso, há vários estudos que despertam atenção sobre maior problema do soro, pois ele tem alto poder poluente (BARBOSA, 2011), dessa maneira, as sugestões para 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 seja seguro e pode ser viável economicamente (JAN et al., 2002).

Além da temperatura e do pH, a fonte de carbono utilizada também pode influenciar nos resultados como o rendimento e a bioprodução. No estudo realizado por CORAL et al., (2008), com diferentes fontes de carbono, foi verificado que o rendimento celular do melão de cana-de-açúcar foi maior em cerca de quatro vezes que o do lactato. Entretanto a biossíntese do ácido propiônico nos dois substratos foi semelhante.

Geralmente, a falta de múltiplos nutrientes, como vitaminas e ou vários aminoácidos, pode levar a um fraco desempenho de fermentação a qual pode ser uma das razões do baixo crescimento bacteriano. Desse modo, a fonte de nitrogênio também afeta significativamente a biossíntese de vários produtos de interesse (WANG et al., 2017). Extrato de levedura, peptona e água de maceração de milho são boas fontes que podem ser usadas por bactérias propiônicas (QUESADA-CHANTO et al., 1998). Água de maceração de milho é um subproduto do processo de fabricação de milho (GAO; YUAN, 2011), de baixo custo e possui nutrientes e minerais que são eficazes para a fermentação (CASTILLO-MARTINEZ et al., 2013). Apresenta elevada quantidade de matéria orgânica, valores médios de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) de cerca de 11.000 mgL⁻¹, tornando-se um dos grandes problemas de tratamento para as indústrias de alimentos (LOSS et al., 2009). Nota-se que outras fontes de nitrogênio, como o farelo de soja, subproduto da refinaria de soja atualmente utilizado, principalmente, na alimentação animal, também podem ser empregadas como fonte econômica de nitrogênio para fermentação (ZHANG; YU; YANG, 2015).

AMM é composta por proteínas, aminoácidos, vitaminas, açúcares redutores, ácidos orgânicos e minerais (Tabela 3).

Tabela 3. Composição centesimal da água de maceração de milho (AMM)

Propriedades gerais	Valores	Propriedades gerais	Valores
Proteína	20,5 %	Umidade	47,5 %
Carboidratos	13,22 %	Fibras	1 %
Lipídeos	1 %	Cinzas	8,8 %
Massa seca	52,5 %	pH	4-5
Brix	54,5		
Aminoácidos	Valores	Aminoácidos	Valores
Arginina	3,3 %	Glicina	5,1 %
Isoleucina	3,6 %	Metionina	1,9 %
Treonina	4 %	Leucina	11,3 %
Triptofano	0,2 %	Lisina	2,5 %
Tirosina	5,8 %	Histidina	2,8 %
Cisteína	1,9 %	Valina	3,4 %
Fenilalanina	4,4 %		
Minerais	Valores	Minerais	Valores
Cálcio	1 %	Potássio	4,5 %
Magnésio	1,5 %	Sódio	0,2 %
Fósforo	3,3 %	Cloro	0,18 %
Enxofre	0,58 %	Ferro	0,10 %
Vitaminas	Valores	Vitaminas	Valores
Tiamina	1 mg/kg	Ácido pantotênico	8 mg/kg
Riboflavina	5 mg/kg	Pirodoxina	2 mg/kg
Niacina	30 mg/kg		

Fonte: Chiani et al. (2010).

Pesquisas têm sugerido o uso da AMM para a produção de ácidos orgânicos, por via fermentativa (MADDIPATI et al., 2011), por ser considerada uma fonte econômica de nutrientes para microrganismos (CHIANI et al., 2010). Numa avaliação da produção de ácido propiônico por *P. acidipropionici*, usando água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, a produtividade do ácido, nas fermentações em bateladas sequenciais, alcançou 0,8 g L⁻¹h⁻¹ e rendimento de 0,42 g g⁻¹ em pH 6,5 (YANG et al., 2018). Em estudo dos efeitos de cinco fontes alternativas de nitrogênio: brotos de malte, água de maceração de milho, NH₄Cl, NH₄NO₃ e citrato de diamina, na produção de ácido L (+) láctico por *Lactobacillus plantarum*, os brotos de malte e água de maceração de milho mostraram efeitos significativos na produção de ácido láctico e seus valores ótimos foram de 16,0 g L⁻¹ e 12,0 g L⁻¹, respectivamente, com produtividade de 3,20 g L⁻¹h⁻¹ e rendimento de 0,98 g g⁻¹ de ácido láctico. Esses resultados indicam que a produção de ácido láctico pode ser melhorada com fontes alternativas de nitrogênio de baixo custo (LIU et al., 2010). Em outro estudo de otimização da composição do meio de fermentação, para a produção de ácido láctico, usando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 e, como matéria-prima farinha de batata, água de maceração de milho e carbonato de cálcio, foi obtido um resultado, para a produção do ácido láctico de 183,8 ± 0,2 g L⁻¹, utilizando 220 g L⁻¹ de farinha de batata, 55 g L⁻¹ de água de maceração de milho e 45g L⁻¹ de CaCO₃ por 72 horas de fermentação a 37 °C (CRIVELARI et al., 2018).

2.6 Purificação do ácido propiônico

Há um grande interesse no desenvolvimento de processos eficientes para a recuperação e purificação de produtos biológicos (RUIZ-RUIZ et al., 2012). As estratégias de purificação respondem por até 80% dos custos totais de bioprocessos (MAESTRO et al., 2008). Alguns métodos de purificação de ácido propiônico, obtido por fermentação, foram reportados na literatura (Tabela 4).

Tabela 4. Métodos de separação para recuperação de ácidos carboxílicos do caldo de fermentação

Método	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Precipitação	CaCO ₃ é adicionado no meio para neutralizar o ácido. A solução de carboxilato de cálcio é concentrada por evaporação, cristalizada e separada da água mãe.	Baixas impurezas no produto; baixo custo de investimento; alto rendimento.	Requer o uso de H ₂ SO ₄ para a liberação do ácido carboxílico, que gera CaSO ₄ , um resíduo sólido que é depositado em aterros.
Destilação	NH ₃ é usado para neutralizar ácido. Carboxilato de amônia então reage com álcool para formar éster, que é separado por destilação.	Produto de elevada pureza; o subproduto (NH ₄) ₂ SO ₄ pode ser usado como um fertilizante.	Requer a hidrólise de ésteres e destilação para separar o álcool a partir de ácido carboxílico. Elevado investimento e custos de energia associados com a destilação, requer economia de escala.
Extração líquido-líquido (Tradicional)	Uso de solventes orgânicos para extrair ácido carboxílico do caldo.	Baixo custo, alto rendimento, melhor para a produção de sal carboxilato.	A solução precisa ser acidificada para permitir extração eficiente do ácido carboxílico livre. Extratante precisa ser regenerado por destilação ou re-extração (<i>stripping</i>).
Extração líquido-líquido (SAB)	Espécies químicas misturadas em faixas de [] e T ^o dividem-se em 2 fases com composições diferentes	Baixo custo, curto tempo de processamento, mantem atividade biológica do produto e de fácil operação	Pode requerer mais que 1 operação ou associar a outros métodos
Adsorção	Usualmente usam-se resinas de troca iônica para adsorver íons carboxilatos do caldo.	Fácil operação.	Alto custo da resina, exige intensa energia para regeneração da resina, separação não é altamente seletiva.
Eletrodialise	Corrente elétrica é aplicada para mover os íons carboxilato negativos por meio de membrana de troca aniônica para o ânodo no eletrodializador.	Carboxilato é concentrado na solução aquosa, não requer adição de ácido para ajustar o pH da solução	Pureza do produto é baixa e pode exigir purificação adicional; grande consumo de energia; membrana pode incrustar; difícil de realizar o <i>scale up</i> .

Adaptado: Yang et al. (2007); []- concentração.

A escolha do método de separação depende do tipo de ácido carboxílico e sua concentração e pureza no caldo de fermentação. Em geral, uma concentração de produto de, aproximadamente, 10% (m v^{-1}) é suficiente para o processo de recuperação (YANG et al., 2007) de maneira simples, com um menor custo (JIN; YANG, 1998). Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias, para o desenho de processos de purificação eficiente e econômico, representa uma área de pesquisa de grande interesse (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

2.7 Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB)

Uma das alternativas de purificação é o processo de extração líquido-líquido em SAB (RUIZ-RUIZ et al., 2012). SAB é uma técnica de extração líquido-líquido em que duas fases são formadas, quando dois polímeros hidrofílicos, ou um polímero e um sal são misturados (Figura 2) na presença de água acima de uma concentração crítica (ASENJO; ANDREWS, 2011).

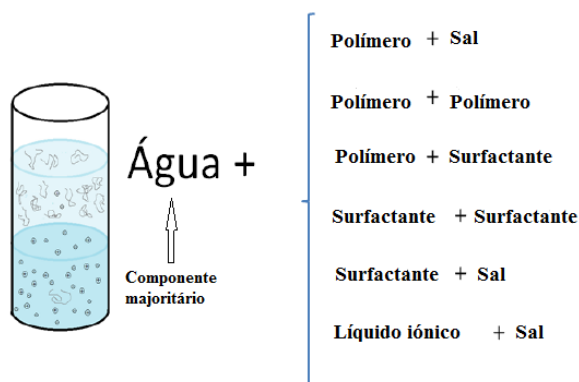


Figura 2. Exemplos de componentes e tipos de sistema aquoso bifásico
Fonte: Junqueira. (2014).

Esta técnica de extração líquido – líquido emprega duas fases aquosas com aplicações, no campo da biotecnologia, para a separação e purificação de materiais biológicos, como proteínas, enzimas, ácidos, vírus, anticorpos e organelas celulares (RAJA et al., 2011). Ácidos, proteínas e outros solutos dividem-se entre as duas fases com base em suas propriedades termodinâmicas (ASENJO; ANDREWS, 2011). Ácidos orgânicos incluindo o ácido propiônico seriam particionados, na fase superior do SAB, que é uma fase rica em polietilenoglicol (PEG) (KHAYATI, 2013a). Apesar de a grande variedade de sistemas aquosos bifásicos, os sistemas mais utilizados, para a extração líquido-líquido, são basicamente os formados por PEG-sal (fosfato/citrato/sulfato) e PEG-Dextrana (DEX), por sua disponibilidade comercial, e o PEG é um polímero de baixo custo e forma um sistema de duas fases com outros polímeros neutros, bem como sais (RAJA et al., 2011). É um polímero

não tóxico, inflamável e não volátil, portanto os SAB, baseados em PEG, podem ser considerados, ambientalmente amigáveis, ao contrário dos sistemas convencionais de extração por solvente que utilizam solventes orgânicos imiscíveis em água (KHAYATI, 2013a). Fosfatos e sulfatos são os sais comumente usados nos SAB formados por polímero/sal, porém o descarte da fase sólida leva a altas concentrações de fosfato e sulfato nos efluentes e, dessa forma, surge uma nova preocupação ambiental. Por isso, atualmente, o uso de sais de citrato e de carbonato de amônio, como componentes formadores de fase com PEG, é preferido, uma vez que os sais de citrato são biodegradáveis e não tóxicos e os sais de amônio são voláteis (RAJA et al., 2011). A purificação usando o SAB fornece um ambiente suave e não desnaturante para biomoléculas e é fácil de escalonar (GLYK; et al., 2015; RAHIMPOUR; HATTI-KAUL; MAMO, 2016), além de ser efetivo para a separação de várias substâncias biológicas (RUIZ-RUIZ et al., 2012). Isso é interessante e adequado do ponto de vista de bioprocessos, pois, muitas vezes, o processo envolve um ou mais estágios de extração. No primeiro estágio, por exemplo, o produto alvo migra para uma das fases, enquanto a maioria dos contaminantes migra para a outra fase. Este estágio é adequado, para a purificação primária, ou seja, remoção de resíduos celulares e outros contaminantes. A extração em múltiplos estágios é usada, quando o rendimento de recuperação do produto e ou requisitos de pureza não podem ser obtidos em uma única etapa de separação (GLYK et al., 2015; RAHIMPOUR et al., 2016). O mecanismo que direciona o comportamento de particionamento de biomoléculas em SAB é complexo e não pode ser facilmente previsto (ASENJO; ANDREWS, 2011). Entretanto a massa molecular do polímero utilizado influencia a partição do produto. Quanto maior o peso molecular dos polímeros, menor é a concentração de polímero necessária para a separação de fases. À medida que a concentração do polímero aumenta, as diferenças na densidade, índice de refração e viscosidade entre as fases aumentam (OLIVEIRA et al., 2008). Vários pesquisadores relataram que, em pH mais alto, a biomolécula com carga negativa prefere a fase superior, e o coeficiente de partição aumenta, o que pode ser atribuído às interações eletrostáticas entre a biomolécula e as moléculas de PEG. Além disso, a mudança no pH afeta a composição de fases que, por sua vez, afeta o comportamento de partição. A área de duas fases se expande com um aumento na temperatura e no pH (ASENJO et al., 1994; TUBI et al., 2006).

Uma abordagem prática, para o desenvolvimento de processo à recuperação de biomoléculas, usando SAB PEG/sal, requer a caracterização físico-química inicial da matéria-prima, que envolve principais contaminantes, seleção dos parâmetros do sistema (pH, massa molecular e concentração de PEG e do sal) e avaliação da influência dos

parâmetros, no processo da purificação, para finalmente definir as condições operacionais do processo de purificação (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2008). O processamento com a ajuda da metodologia de superfície de respostas têm sido usados como ferramenta de modelagem poderosa e confiável pela sua simplicidade e alto poder de predição, em vários campos das engenharias, como a modelagem dos Coeficientes de Partição de Biomoléculas em SAB Poliméricos (DESAI et al., 2008).

2.7.1 Coeficiente de partição

Ao adicionar os compostos nos SAB, que se distribuem seletivamente entre a fase superior e inferior, este processo é caracterizado pelo coeficiente de partição (K_P), o qual é definido pela relação entre a concentração da biomolécula na fase superior e inferior. Vários fatores influenciam os valores de K_P como a natureza química dos componentes formadores do SAB, o tamanho, a conformação (estrutura secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), a presença de ligantes, ao longo da cadeia polimérica que possam interagir com a biomolécula, o pH, a temperatura e a adição de sais inorgânicos (CHAIWUT; RAWDKUEN; BENJAKUL, 2010; DE SOUSA et al., 2014).

Bibliografia

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 877–902, 2013.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of biotechnology**, v. 156, n. 4, p. 286–301, 2011.

AHMADI, N.; KHOSRAVI-DARANI, K. FED-Batch Fermentation For Propionic , Acetic And Lactic Acid Production. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 581-590, 2015.

AHMADI, N.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MORTAZAVIAN, A. M. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 67–75, 2017.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011.

ASENJO, J. A.; SCHMIDT, A. S.; HACHEM, F; ANDREWS, B. . A. Model for predicting the partition behaviour of proteins in aqueous two-phase systems. **Chromatography A**, v. 668, n. 1, p. 47–54, 1994.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. editors. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 1-72.

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

BAUMANN, I.; WESTERMANN, P. Microbial Production of Short Chain Fatty Acids from Lignocellulosic Biomass : Current Processes and Market. **BioMed research international**, v. 2016, p. 1-15, 2016.

BELGRANO, F. D. S. et al. EPS production by *Propionibacterium freudenreichii* facilitates its immobilization for propionic acid production. **Journal of applied microbiology**, p. 1–10, 2018.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Review Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological

- products. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 3, p. 133–142, 2008.
- CASTILLO MARTINEZ-CAMPOSINEZ, F. A. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, 2013.
- CHAMLAGAIN, B. et al. In situ production of active vitamin B12 in cereal matrices using *Propionibacterium freudenreichii*. **Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 67–76, 2018.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol – salts biphasic system. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1148–1155, 2010.
- CHEN, F. et al. Propionic acid production in a plant fibrous-bed bioreactor with immobilized *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 2, p. 202–210, 2012.
- COLLINS, M. D.; PHILLIPS, B. A.; ZANONI, P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 105–108, 1989.
- CORAL, J. et al. Batch fermentation model of propionic acid production by *propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2–3, p. 333–341, 2008.
- CRIVELARI, M. et al. (+) -Lactic acid using medium with potato , corn steep liquor and calcium carbonate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 03, 2018.
- DALMASSO, M. et al. Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 113–20, 2011.
- DESAI, K. M. et al. Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: Case study of fermentative production of scleroglucan. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 3, p. 266–273, 2008.
- DE SOUSA, C. E. et al. Recovery of casein-derived peptides with in vitro inhibitory activity of angiotensin converting enzyme (ACE) using aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 973, p. 84–88, 2014.

DISHISHA, T. et al. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 504–512, 2013.

DISHISHA, T.; ALVAREZ, M. T.; HATTI-KAUL, R. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 553–562, 2012.

DRAGONE, G. et al. Characterization of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v.112, n.4, p.929- 935, 2009.

ERCOLINI, D. et al. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. **Current Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 199–202, 2001.

EŞ, I. et al. Current advances in biological production of propionic acid. **Biotechnology Letters**, v. 39, n. 5, p. 635–645, 2017.

FALENTIN, H. et al. The complete genome of *propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1T, a hardy actinobacterium with food and probiotic applications. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. 1–12, 2010.

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

FENG, X. et al. Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6141–6146, 2011.

FRANCO, G. **Nutrição – Texto básico e tabela de composição química dos alimentos**. 6ª ed. Rio de Janeiro. Ed. Atheneu, 1982, 227p.

GAO, Y.; YUAN, Y. J. Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-keto- 1 - gulonic acid fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 18, p. 9845–9853, 2011.

GLYK, A.; SCHEPER, T.; BEUTEL, S. PEG–salt aqueous two-phase systems: an attractive and versatile liquid–liquid extraction technology for the downstream processing of proteins and enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6599–6616, 2015.

GU, Z.; GLATZ, B. A.; GLATZ, C. E. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 1, p. 13–18, 1998.

GUAN, N. et al. Engineering propionibacteria as versatile cell factories for the production of industrially important chemicals: advances, challenges, and prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 585–600, 2015a.

GUAN, N. et al. Comparative metabolomics analysis of the key metabolic nodes in propionic acid synthesis in *Propionibacterium acidipropionici*. **Metabolomics**, v. 11, n. 5, p. 1106–1116, 2015b.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**. v. 28, p. 375-384, 2010.

HENCZKA, M.; DJAS, M. Reactive extraction of acetic acid and propionic acid using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 154–160, 2016.

HIMMI, E. H.; BORIES, A.; BOUSSAID, A. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp . *shermanii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 4, p. 435–440, 2000.

HOFVENDAHL, K.; HAHN–HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87–107, 2000.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365S–373S, 2001.

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

JAY, J. M. Fermentation and fermented dairy products. **Modern food microbiology**. 6^o ed. Gaithersburg, USA: An Aspen Publication, Aspen Publishers, 2000. 635 p.

JIN, Z.; YANG, S. Extractive Fermentation for Enhanced Propionic Acid Production from Lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biotechnology progress**, v. 14, n. 3, p. 457-

465, 1998.

JOHN, R. P.; NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 524–534, 2007.

JUNQUEIRA, C. M. Partição da Lipase de *Geotrichum candidum* em sistemas aquosos bifásicos. 2014. 77p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014

KHAYATI, G. Optimization of Propionic acid extraction by Aqueous Two-Phase System using Response Surface Methodology. **Chemical Engineering Communications**, v. 200, n. 5, p. 667–677, 2013.

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

KOŚMIDER, A. et al. Propionic acid production by propionibacterium *freudenreichii* ssp. *shermanii* using crude glycerol and whey lactose industrial wastes. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, n. 6, p. 1249–1253, 2010.

KOZHAKHMETOV, S. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus*. **Central Asian Journal of Global Health**, v. 2, 2013.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3ª ed. Sarvier, 2002. 1009 p.

LIND, H.; JONSSON, H.; SCHN, J. Antifungal effect of dairy propionibacteria — contribution of organic acids. **International journal of food microbiology**, v. 98, n. 2, p. 157–165, 2005.

LIU, B. et al. Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, n. 2–3, p. 212–219, 2010.

LIU, L. et al. Pathway engineering of *Propionibacterium jensenii* for improved production of propionic acid. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-9, 2016a.

LIU, Z. et al. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 711–714, 2012.

- LIU, Z. et al. Efficient production of propionic acid through high density culture with recycling cells of *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 856–861, 2016b.
- LOSS, E. et al. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp . mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of hazardous materials**, v. 166, p. 1522–1525, 2009.
- MCMURRY, J. *Química orgânica:combo*. Rio de Janeiro: Learning, 2010. 753 p.
- CHIANI, M. et al. Production of desferrioxamine B (desderal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 1151–1155, 2010.
- MADDIPATI, P. et al. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6494–6501, 2011.
- MAESTRO, B. et al. Affinity partitioning of proteins tagged with choline-binding modules in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1–2, p. 189–196, 2008.
- MARTINEZ-CAMPOSINEZ-CAMPOS, R. Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 6, p. 427–431, 2002.
- MARTINEZ-CAMPOSINEZ, F. A. C. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, 2013.
- MENEZES, A. G. T. Produção de Vodca a Partir de Batata (*Solanum tuberosum* L.) Cultivar Ágata. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, p. 1349-1356, 2015.
- MOON, S. K.; WEE, Y. J.; CHOI, G. W. A novel lactic acid bacterium for the production of high purity l-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 114, n. 2, p. 155–159, 2012.
- NGOME, M. T. et al. Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 39, p. 543–550, 2017.

NIGATU, A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate *Lactobacillus*, *Weissella* minor and related taxa isolated from kocho and tef. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 6, p. 969-978, 2000.

OLIVEIRA D.F.; BRAVO C.E.C.; TONIAL I.B. Soro de leite: Um subproduto valioso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 385, p. 64- 71, 2012.

OLIVEIRA, R. M. DE et al. Liquid – Liquid Equilibria of Biphasic Systems Composed of Sodium Citrate + Polyethylene (glycol) 1500 or 4000 at Different Temperatures. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 53, n. 4, p. 895–899, 2008.

PIWOWAREK, K. et al. Propionibacterium spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 2, p. 515–538, 2018a.

PIWOWAREK, K. et al. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by Propionibacterium freudenreichii strain T82. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 111, n. 6, p. 921–932, 2018b.

QUESADA-CHANTO, A.; AFSCHAR, A. S.; WAGNER, F. Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 41, n. 4, p. 378–383, 1994.

QUESADA-CHANTO, A. et al. Influence of different vitamin-nitrogen sources on cell growth and propionic acid production from sucrose by Propionibacterium shermanii. **Acta Biotechnologica**, v. 18, n. 3, p. 267–274, 1998.

RAHIMPOUR, F.; HATTI-KAUL, R.; MAMO, G. Response surface methodology and artificial neural network modelling of an aqueous two-phase system for purification of a recombinant alkaline active xylanase. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 452–462, 2016.

RAJA, S. et al. Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7–16, 2011.

REDDY, G. et al. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 22–34, 2008.

REICHARDT, N. et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. **ISME Journal**, v. 8, n. 6, p. 1323–1335, 2014.

RUIZ-RUIZ, F. et al. Aqueous two-phase affinity partitioning systems : Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1–13, 2012.

SALMINEN; S. A. WRIGHT, L. M. P. M.; SAXELIN, D. B. W. M. DE V. R. F.; MATTILA-SANDHOLM, K. C. G. M. S. B. T. Construction drawings — Indication of limit deviations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. December, p. 93–106, 2002.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 319-331, 2001.

SESHADRI, N.; MUKHOPADHYAY, S. N. Influence of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocessing by *Propionibacterium acidipropionici*. **Journal of Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 321–328, 1993.

SUOMALAINEN, T. et al. In vitro and in vivo gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 3, p. 271–278, 2008.

THIERRY, A. et al. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 19–27, 2011.

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

TUBI, G. et al. Liquid - Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly (ethylene glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 51, n. 1, p. 209–212, 2006.

TUFVESSON, P. et al. Economic and environmental assessment of propionic acid production by fermentation using different renewable raw materials. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 556–564, 2013.

VIDRA, A.; NÉMETH, Á. Bio-produced propionic acid: A review. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 62, n. 1, p. 57–67, 2018.

WANG, P.; JIAO, Y.; LIU, S. Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, p. 1811–1815, 2014.

- WANG, X. et al. Propionic acid production from corn stover hydrolysate by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 200, 2017.
- WANG, Z.; JIN, Y.; YANG, S. T. High cell density propionic acid fermentation with an acid tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 502–511, 2015.
- WANG, Z.; YANG, S. T. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. **Bioresource Technology**, v. 137, p. 116–123, 2013.
- WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163–172, 2006
- WERPY, T. et al. Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. National Renewable Energy Lab., Golden, CO (US), 2004, 77p.
- YANG, H. et al. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 250, n. October 2017, p. 1–9, 2018.
- YANG, S. et al. Chapter 16 . Extractive Fermentation for the Production of Carboxylic Acids. Elsevier, p. 421–446, 2007.
- YANG, S. -T; HUANG, Y.; HONG, G. A novel recycle batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, n. 5, p. 379–386, 1995.
- ZALL, R. R. SOURCES AND COMPOSITION OF WHEY AND PERMEATE contain cow , sheep and goat milk data at different times of the year . lated to growth rates of young for whom nature provides nutrients. New York. Ed. Springer, 1992, 72p.
- ZÁRATE, G.; PÉREZ CHAIA, A. Influence of lactose and lactate on growth and β -galactosidase activity of potential probiotic *Propionibacterium acidipropionici*. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 25–30, 2012.
- ZHANG, A. et al. Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 374–381, 2015a.

ZHANG, A.; YANG, S. T. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1346–1351, 2009.

ZHANG, K.; YU, C.; YANG, S. T. Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seed culture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 173–179, 2015b.

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

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**, v. 101, n. 22, p. 8902–8906, 2010.

ZHUGE, X. et al. Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 519–525, 2014.

SEGUNDA PARTE: ARTIGOS

4. Artigo 1: Biosynthesis of propionic acid using whey by mixed culture of *Propionibacterium freundenreichii* subs ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei*

Autores: Moisés Tomás Ngome^a, José Guilherme Lembi Ferreira Alves^{b*}, Ana Cristina Freitas de Oliveira^b, Dina Luz Hernández Torres^b, Luiz Ronaldo de Abreu^b, Olga Lucía Mondragón Bernal^b, Roberta Hilsdorf Piccoli^b

^a*Department of Agricultural Production, Eduardo Mondlane University (UEM-ESUDER), Julius Nyerere Road, Post Office Box nº 254, Mozambique*

^b*Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras/MG, Brazil, B.O.: 3037, Zip: 37.200.000*

A ser submetido na revista: Bioresource Technology

Biosynthesis of propionic acid using whey by mixed culture of *Propionibacterium freundenreichii* subs ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

Abstract

Biosynthesis of propionic acid (PA) by mixed culture of *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* from the whey cheese fermentation was studied the effects of 18 treatments using *L. paracasei* inoculum, lactose, and CaCO₃ concentrations on propionic acid (PA) production by *P. freundenreichii* following a central composite rotational design (CCRD). Concentrations of lactose below 52 g L⁻¹ and above 26 g L⁻¹ of CaCO₃ promoted higher production of acetic acid (AA) and PA. To optimize productivity and PA yield, concentrations of lactose should be less than 37 g L⁻¹ and concentrations of CaCO₃ should be greater than 28 g L⁻¹. This mixed culture can efficiently use whey for PA biosynthesis, reducing environmental damage from traditional synthesis.

Keywords: renewable sources, lactose, propionic fermentation, organic acids, central rotational compound design.

1. Introduction

Propionic acid (PA) is a short chain organic acid with broad application in the food industry, mainly in food preservation and in feed (Vidra and Németh, 2018). This acid is recognized by the Food and Drug Administration (FDA) as a generally safe food additive (Liu et al., 2012; Eş et al., 2017). It is also used in pharmaceuticals, herbicides, and cosmetics (Stowers et al., 2014). PA salts inhibit fungal growth, thereby improving food safety and prolonging shelf-life (Kagliwal et al., 2013). PA is also used as an important chemical intermediate (Vidra and Németh, 2018) in the synthesis of vitamin E, cellulose fibers, artificial fruit aromas, fragrances, and perfumes (Kagliwal et al., 2013). It is also used as an intermediate in the production of polymers, plastics, pesticides, solvents and bioaromas (Chen et al., 2012).

Propionic acid is currently produced by chemical synthesis of non-renewable raw materials (petroleum) (Dishisha et al., 2012, Yang et al., 2018), as this is the most economical process. However, there is growing interest in sustainable production and in reducing the cost of synthesizing chemicals from renewable resources.

Fermentative processes offer the opportunity for countries with limited petroleum resources to manufacture organic acids such as propionic acid in a sustainable manner (Stowers et al., 2014). Reducing waste generated from technological processes is a significant concern for both manufacturing companies and environmentalists. Waste reduction has many benefits, such as reducing environmental pollution and treatment costs, and it can also enable the production of new products (Piwowarek et al. 2016). Therefore, alternative routes for producing PA from renewable products have been extensively investigated (Piwowarek et al., 2016; Wang et al., 2015b; Sabra et al., 2013), but remains at the research scale (Dishisha et al., 2012).

Producing propionic acid via fermentation still has both low productivity and final concentration due to end-product inhibition of propionic bacteria growth (Dishisha et al.,

2013). This inhibition is mainly due to the passage of PA (an undissociated weak acid) through the cell membrane into the cytoplasm where it releases protons because of the intracellular alkaline environment. As a result, the pH gradient across the cell membrane is disturbed, which affects nutrient transfer and inhibits cell growth (Zhang and Yang, 2009).

Several alternatives have been reported to significantly improve the production of propionic acid including: extractive fermentation to reduce the effect of the acids generated during the production of propionate (Zhu et al., 2012); cellular immobilization, which increases the tolerance of bacterial cells to their metabolites (Zhu et al., 2012; Dishisha et al., 2015, Belgrano et al., 2018ab); controlling the pH; strains to increase PA production (Ahmadi et al., 2017) and propionic cells adapted by serial transfer in media containing increasing amounts of PA (Woskow and Glatz, 1991; Zhu et al., 2010; Wang et al., 2015a). The pH also influences cell growth, substrate consumption, and by-product formation, with efficient production of 19.21 g L⁻¹ of propionic acid seen using a pH control strategy (Feng et al., 2010).

Fermentation processes for PA production require abundant and economical raw materials, such as lactose (whey), sucrose (sugar cane derivatives), glucose (corn derivatives), glycerol or cellulosic materials (Feng et al., 2011; Coral et al., 2008), and control of the bacterial growth process. Thus, the use of one of the most important by-products of the food industry, whey, was studied for propionic acid biosynthesis, evaluating the effects of concentration of lactic acid bacteria, lactose, and calcium carbonate on the fermentative process with a mixed culture of *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*.

2. Materials and methods

The whey was from fresh Minas cheese provided by the Milk Technology Pilot Plant in Federal University of Lavras/Brazil. The microorganisms, *Propionibacterium*

freundenreichii ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* were donated by the Tropical Cultures Collection belonging to the André Tosello Foundation, Campinas/SP. The reagents used were all analytical grade.

2.1 Purity of propionic and lactic bacteria cultures

The purity of the cultures *Lactobacillus paracasei* and *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 was verified using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™). The strain *Escherichia coli* K12 was used as the standard for the external calibration of MALDI-TOF MS following the methodology described by Lima-neto et al. (2014).

2.2 Preparation of whey

The whey was filtered to remove the micelles and homogenize the raw material. This whey was then concentrated with the aid of a rotary evaporator to approximately half the initial volume. In parallel, aliquots were taken for chemical characterization of the whey.

2.3 Activation, stock, and standardization of the inoculum

A lyophilized culture of *Lactobacillus paracasei* was transferred to a test tube containing 10 mL of Man Rogosa and Sharpe broth (MRS), previously sterilized at 121 °C, for 15 min, incubated at 37 °C for 48 h. For propagation, an aliquot of this culture in the tube was transferred to an Erlenmeyer flask containing 100 mL of MRS broth and incubated at 37 °C for 24 h. For storage, 1 ml aliquots of the culture contained in the Erlenmeyer flask were transferred to several 1.5 ml eppendorfs. The eppendorfs were centrifuged at 27,000 g at the Spinlab (SL-5AM) spectrophotometer for 5 min and the supernatant was removed. The culture of *L. paracasei* was stored added in pre-autoclaved freezing medium containing: 15

mL glycerol, 0.5 g bacteriological peptone, 0.3 g yeast extract, and 0.5 g NaCl in 100 mL of distilled water pH adjusted to 7.0.

The inoculum was standardized by growth curve. After reactivation, aliquots of 100 μ L of the inoculum were transferred to 300 mL of MRS broth, incubated at 37 °C. In parallel samples were taken at regular times of one hour intervals for absorbance reading and viable cell counting. The OD at 600 nm was determined at one hour intervals in a Biospectro (SP-22) spectrophotometer. The culture was plated on MRS agar for incubation at 37 °C for 96 h in anaerobic conditions. The cultures were standardized for fermentation based on the ratio of absorbance to the number of viable cells, corresponding to 10^8 CFU mL⁻¹.

The lyophilized culture of *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 was activated, stored, and standardized following the same methodology as that for *L. paracasei*. Here, lactate broth per liter (w v⁻¹): 1% yeast extract, 1% meat peptone, 0.025% K₂HPO₄ and 1% sodium lactate was used, and the culture was incubated at 30 °C for 48 h and plated on lactate agar (per liter (w v⁻¹): 1% yeast extract, 1% meat peptone, 0.025% K₂HPO₄, 1% sodium lactate and 2% agar-agar). The plates were incubated at 30 °C for 96 h in anaerobic conditions.

2.4 Effect of bacterial cell, lactose, and carbonate concentration on PA biosynthesis

A Central Composite Rotational Design (CCRD) was performed totaling 18 experiments (Rodrigues and Iemma, 2014) with three independent variables: *L. paracasei* inoculum concentration in log UFC mL⁻¹ - LacInoc (x1), lactose (x2), and calcium carbonate (x3) concentrations. The choice of levels of the factors was based on the results of our research. The studied range of the variables is shown in Table 1. The dependent variables (responses) were the organic acid production (propionic, acetic, and lactic acid), propionic acid productivity and yield, lactose consumption, total acidity, and pH.

Table 1. Relationship between coded and real values of independent variables for CCRD

Variables	Code	Level				
		-1.68	-1	0	+1	+1.68
LacInoc (LogCFU mL⁻¹)	x ₁	5	6	7	8	9
Lactose (g L⁻¹)	x ₂	20	30	45	60	70
CaCO₃ (g L⁻¹)	x ₃	0	8	20	32	40

LacInoc- *Lactobacillus* inoculum concentration in log UFC mL⁻¹

For fermentation, a mixed culture of *P. freundenreichii* ATCC 6207 and *L. paracasei* was used, with a fixed initial inoculum of 10⁸ CFU mL⁻¹ *P. freundenreichii* ATCC 6207 for all treatments. The fermentation medium was prepared with concentrated whey from fresh Minas cheese. The calcium carbonate and lactose (from the whey cheese) concentrations was determined by CCRD. All treatments were performed in duplicate; the Erlenmeyer flasks were sealed with cotton and incubated in an B.O.D oven without shaking at 30 °C, to verify the production of the organic acids. For each treatment, a kinetic study was carried out in which 10 mL aliquots were aseptically removed at time intervals of 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h. A 0.1 mL aliquotas of each treatment was also taken aseptically at the beginning (0 h) and at the end of the fermentation (120 h) to count cells by plating on lactate agar medium and incubating in anaerobic jars placed in an oven at 30 °C for 4 days. The collected samples (10 mL) were centrifuged at 1428 g for 25 min and the supernatant was collected in capped flasks and then stored frozen (-10 °C) for the analysis of organic acids, lactose, total acidity, and pH. The PA yield (Y_{P/S}), PA productivity (Pr), and growth factor (GF) were calculated according to equations 1, 2 and 3.

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

$$Pr = (P - P_0) / t_f \quad (2)$$

$$GF = (LogUFC/mL)_f / (LogUFC/mL)_i \quad (3)$$

Where P - final concentration of PA (g L^{-1}); P0 - initial concentration of PA (g L^{-1}); S - final lactose concentration (g L^{-1}); S0 – initial lactose concentration (g L^{-1}); Pr – productivity of PA ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$); tf - fermentation time (h); Log CFU mL^{-1} - logarithm of the total cell forming units per mL at the final and initial time points.

Statistical analysis was performed using Statistic 8.0 software (Statsoft, 2008), with 5% significance level. Models were adjusted (equation 3) and generated response surfaces, contour curves, according to methodology recommended by (Rodrigues and Iemma, 2014).

$$y = \beta_0 + \beta_{1x_1} + \beta_{2x_2} + \beta_{3x_3} + \beta_{12x_1x_2} + \beta_{13x_1x_3} + \beta_{23x_2x_3} + \beta_{11x_1^2} + \beta_{22x_2^2} + \beta_{33x_3^2} \quad (4)$$

Since y is the response variable, β_0 is the intercept term, β_1, β_2 e β_3 are the coefficients of the model, β_{12}, β_{13} e β_{23} are the coefficients of interaction, β_{11}, β_{22} e β_{33} are the quadratic coefficients, and x1, x2, and x3 are the independent variables in coded values. The interactions that did not have a significant effect ($p > 0.05$) were disregarded during the regression and eliminated from the final model.

2.5 Determination of organic acids (lactic, acetic, and propionic)

The organic acids were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). A Shimadzu brand chromatograph was used with a diode arrangement detection system (model SPD-M20A) and aSIL-20AHT automatic sampler. The column used was a Supelcogel C610H, 30 cm \times 7.8 mm \times 9.0 μm , equipped with a pre-column and operated at a temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$. The mobile phase was per chloric acid (HClO_4) in H_2O , with flow rate of 0.5 mL min^{-1} and a run time of 30 min. Acids were detected by UV absorbance at 210 nm. The acids were identified by comparison with sample retention times of the respective acid standards, and quantification was performed by preparing a standard curve. Samples were diluted and filtered with a 0.22 μm filter for further analysis. The results were processed using the LC-Solutions software.

2.6 Determination of physico-chemical parameters

pH were determined according to the methodology of (AOAC, 2012). Lactose analysis was performed using the dinitrosalicylic acid (DNS) method according to (Miller, 1959).

3. Results and Discussion

Using the MALDI-TOF MS technique the microorganisms were successfully confirmed and with a higher identification score of 2.167 and 2.112 for *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. This method corroborated all previous phenotypic identifications for these microorganisms in reference. Mass spectrometry using MALDI-TOF has been applied for the identification of a wide variety of bacterial species. Where each profile can be automatically compared to a library of reference spectra, generating the list of the most closely related microorganisms. This ranking indicates the level of confidence in the identification and, depending on how high the value is, the organism is identified at the level of gender or species (Clark et al., 2013; Lima-neto et al., 2014; Patel, 2013).

In fermentation, efforts have focused on the use of low-cost carbon and nitrogen sources (Yang et al., 2018). In the case of propionic fermentation, most of the carbon and nitrogen sources investigated have been agricultural and processing wastes (Vidra and Németh, 2018). Whey is a by-product of cheese production, with valuable uses, and can reduce the cost in the fermentation process. In addition to lactose, whey proteins, amino acids and minerals are also found in the whey. Table 2 shows the composition of the normal whey and the whey concentrate.

Table 2. Composition of the normal whey and the whey concentrate

Parameters	Normal whey	Whey concentrate
PH	6.78±0.01	5.72±0.01
Acidity (g L⁻¹)	0.80±0.00	3.67±0.06
Ashes (% w w⁻¹)	0.48±0.05	1.12±0.07
Lactose (% w w⁻¹)	4.83±0.21	9.70±0.10
Proteins (% m v⁻¹)	5.31±0.94	10.97±1.30
Fat (% m v⁻¹)	0.30±0.00	0.60±0.00

In this study, whey from fresh Minas cheese was used for propionic fermentation and the results of the 18 treatments are shown in Table 3.

Table 3. CCRD matrix with results for lactate, acetate and propionate concentrations in g L⁻¹, growth factor and propionic acid yield

Treat.	x1	x2	x3	PPA (g L ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)	PLA (g L ⁻¹)	PAA (g L ⁻¹)	Ratio (PA/AA)	GF
1	-1	-1	-1	1.09	0.04	10.44	0.74	1.46	1.68
2	1	-1	-1	2.12	0.08	9.31	1.72	1.24	1.19
3	-1	1	-1	0.66	0.01	15.14	0.39	1.70	1.82
4	1	1	-1	0.78	0.02	15.42	0.52	1.52	1.37
5	-1	-1	1	18.88	0.74	1.15	5.08	3.72	1.66
6	1	-1	1	14.73	0.56	1.34	3.92	3.76	1.31
7	-1	1	1	2.54	0.05	20.91	0.72	3.50	1.25
8	1	1	1	1.82	0.04	18.64	0.79	2.29	1.36
9	-1.68	0	0	5.76	0.14	12.91	1.82	3.17	1.29
10	1.68	0	0	1.91	0.05	17.99	0.32	5.99	1.45
11	0	-1.68	0	10.31	0.55	1.30	2.82	3.66	1.43
12	0	1.68	0	0.62	0.01	26.13	0.42	1.48	1.30
13	0	0	-1.68	0.18	0.01	5.49	0.25	0.71	1.21
14	0	0	1.68	23.27	0.55	2.42	5.88	3.96	1.42
15	0	0	0	2.21	0.05	15.00	0.66	3.34	1.34
16	0	0	0	2.72	0.07	14.00	0.68	4.00	1.29
17	0	0	0	2.32	0.05	15.08	1.02	2.27	1.29
18	0	0	0	3.57	0.10	13.37	1.05	3.40	1.32

x1- LacInoc (LogCFU mL⁻¹); x2- Lactose (g L⁻¹); x3- CaCO₃ (g L⁻¹), PPA, PLA and PAA - production of propionic, lactic and acetic acid respectively, Y_{P/S} - Yield of propionic acid (g g⁻¹), PA/AA- ratio between propionic and acetic acid and GF - growth factor

Analysis of the results of propionic acid (PPA) production revealed that the concentration ranged from 0.18 (treatment 13) to 23.27 g L⁻¹ (treatment 14), indicating the large effect of calcium carbonate concentration on propionic fermentation. Similar results

were obtained for propionic acid productivity, with a lowest value seen in treatment 13 and highest value in treatment 14 ($0.19 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Finally, the highest yields of propionic acid were produced by treatments 5 (0.74 g g^{-1}) and 6, 11, and 14 ($0.55 - 0.56 \text{ g g}^{-1}$).

For lactic acid, highest concentrations were observed in treatments 7 (20.91 g L^{-1}) and 12 (26.13 g L^{-1}) and lowest concentrations were seen in treatments 5, 6, 11, and 14. Treatments 5 (5.08 g L^{-1}) and 14 (5.88 g L^{-1}) produced the highest concentrations of acetic acid. Since the purpose of this study was to produce propionic acid, the treatments with lowest levels of lactic and acetic acid are the most interesting. This can also be observed by analysing the ratio of propionic acid/acetic acid (PA/AA), which was highest in treatments 10 (5.99) and 14 (3.96). There was little variation in the growth factor of lactic and propionic bacteria, ranging between 1.19 (treatment 2) and 1.82 (treatment 3).

The results of fermentation with the mixed culture of *P. freundenreichii* ATCC 6207 and *L. paracasei* were promising. Taking into account all factors, treatment 14, which contained 10^7 CFU mL^{-1} of *L. paracasei*, 45 and 40 g L^{-1} of lactose and CaCO_3 respectively, had the best results with a maximum concentration of 23.27 g L^{-1} PA obtained after 120 h of the fermentation.

In this treatment, the main by-product was 5.88 g L^{-1} of AA. It was verified that in tests with highest concentrations of LA, the concentrations of propionic acid were low. The same result was observed in the production of PA from the fermentation of glucose and lactose by *Lactobacillus zae* and *V. criteci*. *L. zae* metabolizes the glucose in lactate, causing the accumulation of lactic acid and the inhibition of *Veillonella criteci* that should use the lactate, resulting in lowest propionic acid production (Sabra et al., 2013). The results of this work were better than those obtained by Ngome et al. (2017), which fermented milk whey with a mixed culture of *Propionibacterium freudenreichii* PS-1 and *Lactobacillus helveticus* and obtained a maximum propionic acid production of 3.78 g L^{-1} , with 3.10 g L^{-1} of acetic

acid, which competed with the main product. The highest productivity was $0.19 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ over 120 h of fermentation and the yield was 0.74 g g^{-1} . In the literature, there are many works with similar or better results, but the time required (productivity) for the fermentation or its complexity limits their eventual application on an industrial scale.

The results of this experiment showed that the mixed culture and whey may be used for the production of PA. However, some authors show that conventional fermentation processes for PA production are mainly focused on monocultures (Sabra et al., 2013). The use of mixed cultures could be an effective alternative for PA production (Ngome et al., 2017).

Whey is an inexpensive industrial by product that has been investigated as a raw material for the production of propionic acid. Development of a continuous fermentation process with cell retention resulted in a productivity of $0.90 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and a yield of 0.40 g g^{-1} over a 192 h fermentation (Goswami and Srivastava, 2001). Using a two-stage pH control strategy (pH 6.5 for 48 h and then 6.0), caused the PA concentration to increase from 14.58 g L^{-1} at a constant pH to a maximum of 19.21 g L^{-1} and the maximum propionic acid yield and glucose conversion efficiency reached 25.23 g L^{-1} and 47.76%, respectively (Feng et al., 2010). Chen et al. (2012) obtained high concentrations of PA, $136 \pm 6.8 \text{ g L}^{-1}$, with a productivity of $0.57 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ after $240 \pm 11 \text{ h}$, using glucose as a fermentation medium and *P. freudenreichii* CCTCC M207015 immobilized on sugarcane bagasse. Yang et al. (2018) fermented soybean residues at pH 6.5 with *Propionibacterium acidipropionici* and obtained a PA productivity of $0.8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and a yield of 0.42 g g^{-1} sugar. Belgrano et al. (2018a) investigated the fermentation of propionic acid and obtained a concentration of 25.8 g L^{-1} , a productivity of $0.46 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and a yield of 0.43 g g^{-1} using immobilization of microbial cells for bioprocess production of propionic acid. In all of these cases, the yield was lower than that achieved in this study.

AA is the main byproduct of propionic acid fermentation. It is difficult to minimize its production during fermentation (Stowers et al., 2014) and makes recovery of the product difficult. In this study, the highest ratio of PA/AA was 5.99 in treatment 10, which unfortunately also showed low productivity and yield ($0.02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and 0.05 g g^{-1} respectively). Therefore, the most interesting PA/AA ratios were 3.72 and 3.95, which involved low levels of AA and yields of up to 0.74 and 0.55 g g^{-1} of PA, respectively. The low concentrations of acetic acid facilitate the purification of propionic acid from the fermented medium. Control of oxygen input during the fermentation process may result in a further reduction of the by-product. It has already been noted that aerobic conditions favor the production of acetic acid, which explains the increased production of this metabolite (Piwowarek et al., 2016).

3.1 Production of propionic, acetic, and lactic acid

The regression coefficients of the model adjusted for lactic acid, acetic acid, propionic acid production, and propionic acid yield are presented in Table 4. According to the regression analysis verified that the concentration of the lactic acid bacteria inoculum did not significantly influence any of the response variables and that only the concentrations of lactose and calcium carbonate had statistically significant effects ($p < 0.05$). It was found that an increase in the concentration of lactose decreased the production of propionic acid, while an increase in carbonate concentration increased the propionic acid content.

The Analysis of Variance (ANOVA) and the coefficients of determination (R^2) above 88%, indicated that the models which described lactic (LA), acetic (AA), and propionic acid (PA) production, and propionic acid yield ($Y_{P/S}$) as a function of the concentration of lactose and CaCO_3 concentrations, can be considered adequate, since the regressions were statistically significant at a 5% significance. The *L. paracasei* inoculum concentration was not statistically significant ($p < 0.05$).

In all cases, the highly significant calculated F factors ($p < 0.0001$) were higher than the tabulated F, showing significant adjustment by the models. For the growth factor (GF) and ratio (PA/AA) responses, the model adjustments were not statistically significant at a 5% threshold; for GF, no term was significant, whereas for PA/AA, only the linear effect of calcium carbonate concentration had a positive and statistically significant effect ($p < 0.05$) (Table 4).

Table 4. Regression coefficients, reparametrized, for LA, AA and PA production by a mixed culture of *P. freundenreichii* ATCC 6207 and *L. paracasei*

SV	PPA (g L ⁻¹)		Y _{P/S} (g g ⁻¹)		PLA (g L ⁻¹)		PAA (g L ⁻¹)		Ratio PA/AA	
	Reg	p-value	Reg	p-value	Reg	p-value	Reg	p-value	Reg	p-value
Mean/Intercept	3.27	0.0003	0.07	0.0017	14.74	0.0000	1.08	0.0001	2.84	0.000
x ₂ (L)	-3.47	0.0001	-0.16	0.0000	6.57	0.0000	-0.96	0.0001	-	-
x ₂ (Q)	-	-	0.07	0.0001	-	-	-	-	-	-
x ₃ (L)	5.29	0.0000	0.16	0.0000	-	-	1.22	0.0000	0.94	0.0052
x ₃ (Q)	2.68	0.0006	0.07	0.0001	-3.61	0.0000	0.69	0.0003	-	-
x ₂ x ₃	-3.44	0.0007	-0.14	0.0000	3.28	0.0001	-0.74	0.0007	-	-
R²	0.92		0.95		0.95		0.88		0.40	

SV- Source of variation, x₂- Lactose, x₃- CaCO₃, Reg- Regression, Y_{P/S} - Propionic acid yield (g g⁻¹), PPA- production of propionic acid, PLA- production of lactic acid, PAA- production of acetic acid and PA/AA- ratio between propionic and acetic acid.

The coded models for the production of PA, LA, and AA are represented by equations 5, 7, and 8 and the model for yield of propionic acid by equation 6.

$$PA = 3.27 - 3.47x_2 + 5.29x_3 + 2.68x_3^2 - 3.44x_2x_3 \quad (5)$$

$$Y_{P/S} = 0.07 - 0.16x_2 + 0.16x_3 + 0.07x_2^2 + 0.07x_3^2 - 0.14x_2x_3 \quad (6)$$

$$LA = 14.74 + 6.57x_2 - 3.61x_3^2 + 3.28x_2x_3 \quad (7)$$

$$AA = 1.08 - 0.96x_2 + 1.22x_3 + 0.69x_3^2 - 0.74x_2x_3 \quad (8)$$

Contour curves were constructed from the CCRD models for the various combinations of the concentrations of lactose and of calcium carbonate (Fig. 1 and 2).

Contour curves for the production and yield of propionic acid are shown in Fig. 1A and Fig. 1B respectively.

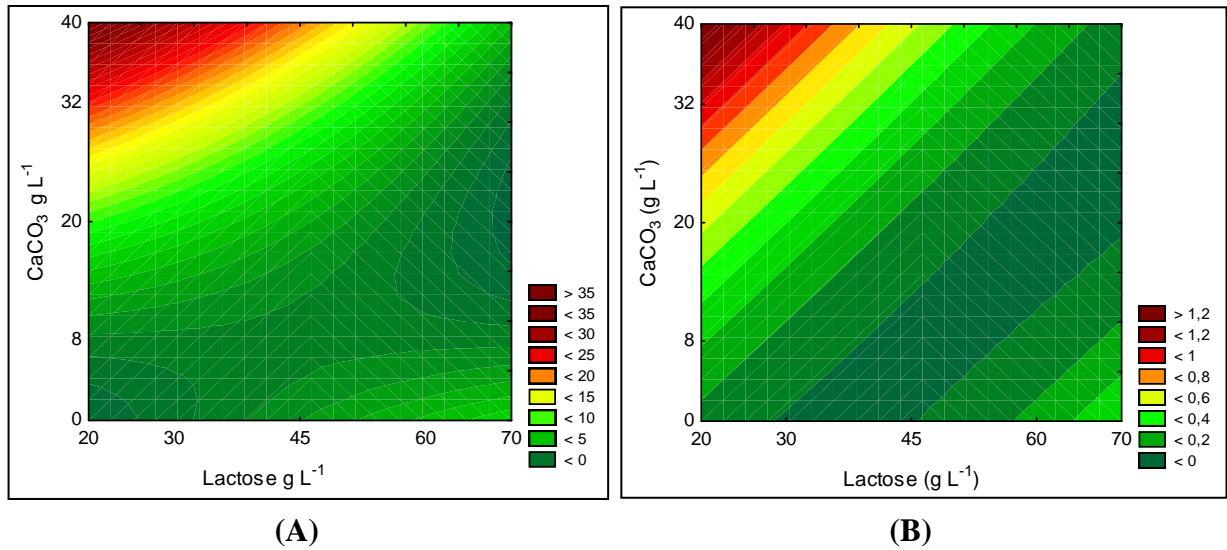


Fig. 1. Contour curves for the production of propionic acid (A) and yield (B) of propionic acid (x1 fixed at the central point corresponding to LogUFC mL-1 equal to 7)

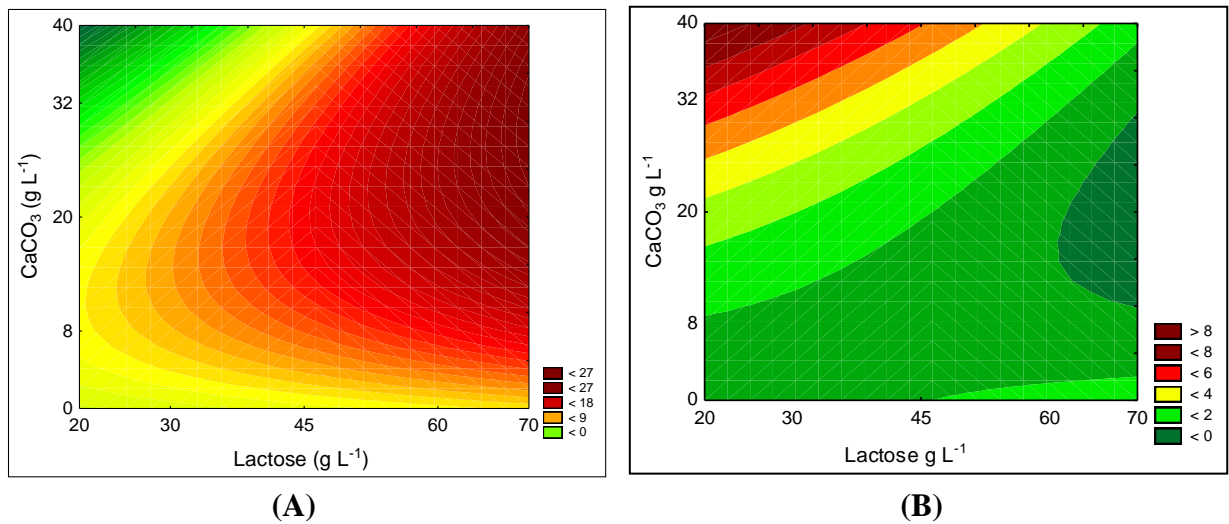


Fig. 2. Contour curve for the production of lactic acid (A) and acetic acid (B) (x1 fixed at the central point corresponding to LogUFC mL-1 equal to 7)

Neither the LA, AA, PA, nor $Y_{P/S}$ responses were affected by cell concentration (LogCFU mL^{-1}) within the range studied ($p < 0.05$). Thus, there was no need to construct the contour curves for this variable. For the PA, $Y_{P/S}$, LA, and AA responses, (Fig. 2 and 3) respectively, only the concentrations of lactose and CaCO_3 were statistically significant. For $Y_{P/S}$, it was verified that the region with the highest values is the area below 37 g L^{-1} of lactose and above 28 g L^{-1} of CaCO_3 (Fig. 1B). This information is important because it is possible to minimize the quantities to be used, minimizing the cost of the fermentation process and consequently making it more competitive.

For lactic acid, a region of lowest concentrations contained more than 28 g L^{-1} of CaCO_3 and less than 37 g L^{-1} lactose (Fig. 2A), similar to the optimal region for propionic acid. For acetic acid, the region with the lowest values corresponds to the area between 8 and 27 g L^{-1} of CaCO_3 and above 60 g L^{-1} of lactose (Fig. 2B).

In all treatments, pH were measured during 120 h of fermentation. In Fig. 3, it can be seen that treatments 5, 6, 11, and 14, which had higher levels of propionic acid production, did not result in higher pH variation during fermentation. The other treatments caused lower pH and higher acidity. In general, drops in pH and increases in acidity were fastest during the first 48 h of fermentation. Treatment 13, which did not include CaCO_3 , had the lowest mean pH of the treatments with a pH of 3.47 at the end of fermentation; it also started with the lowest pH (5.76).

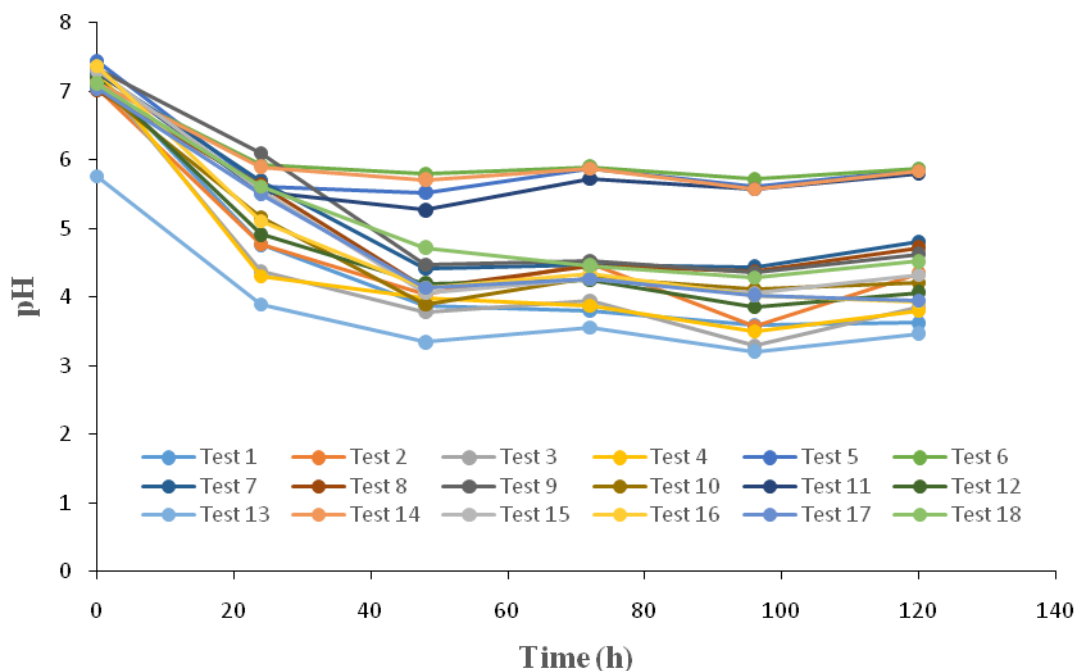


Fig. 3. Variation of pH over 120 h of fermentation

In general, concentrations of calcium carbonate above 32 g L^{-1} in the fermentation medium prevented drastic variations of acidity and pH, resulting in a positive effect on PA production rates and PA $Y_{P/S}$ (Table 4 and Fig. 1A and 1B). It was also seen that in the media with less CaCO_3 , pH levels were lower, as were the PA/AA ratios. In these treatments, the increase in acidity (drastic reduction of pH after 24 h) may have led to inhibition of PA biosynthesis. The temperature was maintained constant at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ which is considered optimal propionic bacteria in the production of PA. Concentrations of lactose greater than 45 g L^{-1} in the media had negative effects on the production of PA, AA, and PA $Y_{P/S}$ (Table 4 and Fig. 1A and 2B).

3.2 Lactose consumption

The consumption of the substrate (lactose) throughout the fermentation is presented in Fig. 4. It was verified that after 120 h of fermentation, practically all lactose had been consumed.

Analysis of the (Fig. 4) treatments with lactose concentrations below 30 g L^{-1} and that of calcium carbonate at 32 g L^{-1} (5, 6, 11 and 14), consumption of lactose by mixed culture was fast, with lactose depletion after 48 h of fermentation. These treatments had less acidity and lower pH variation. In contrast, in media with lactose concentrations above 60 g L^{-1} and less than 8 g L^{-1} of calcium carbonate, consumption of lactose was very slow, lasting about 120 h, as seen in treatments 3, 4, and 12. The axial points of carbonate (treatment 14) and lactose (treatment 13) followed the trend of fast and slow lactose consumption, respectively. In the remaining treatments, lactose was consumed for between 72 and 96 hours.

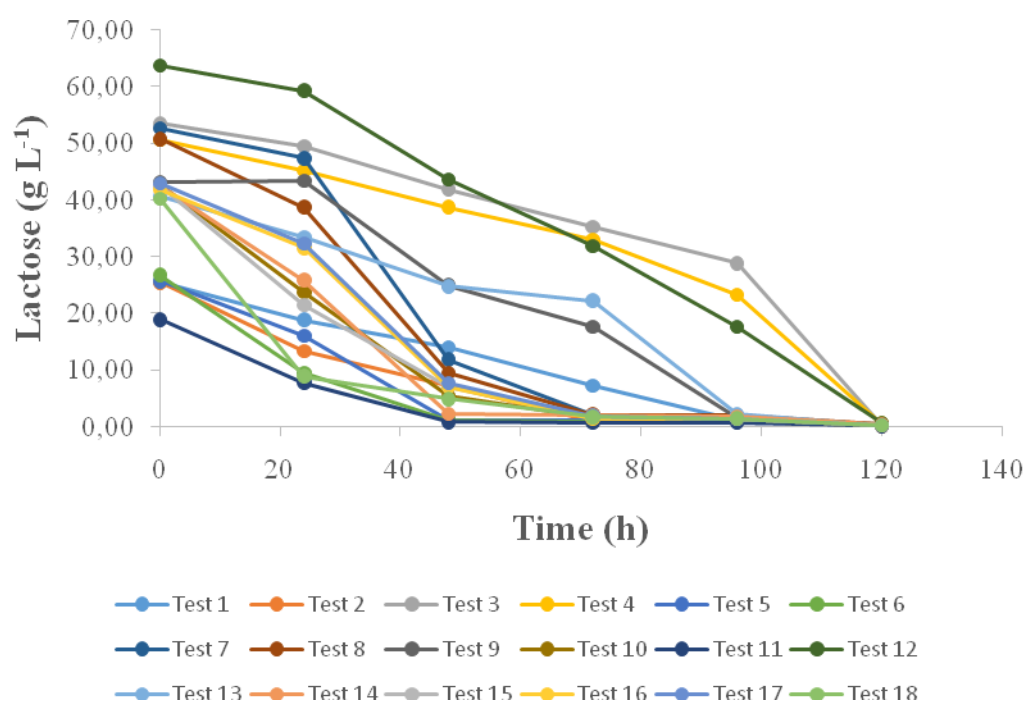


Fig. 4. Consumption of lactose during fermentation

3.3 Kinetics of organic acid production

A kinetic study of the formation of the organic acids over the course of fermentation was performed for treatment 14, which had the highest production of propionic acid. The complex interrelationship between the use of lactose and lactate and production of PA and

AA by the bacteria of propionic acid in the fermentation by mixed culture is shown in Fig. 5. It was found that lactose was consumed almost entirely in just 48 h of fermentation at which time lactate reached its maximum concentration of 38.31 g L^{-1} , along with 7.64 and 3.92 g L^{-1} of PA and AA, respectively. After 48 h of fermentation, lactose depletion and lactate consumption were observed until the end of fermentation at 120 h. By then, lactate had also been depleted, allowing the formation of 23.27 g L^{-1} of propionic acid.

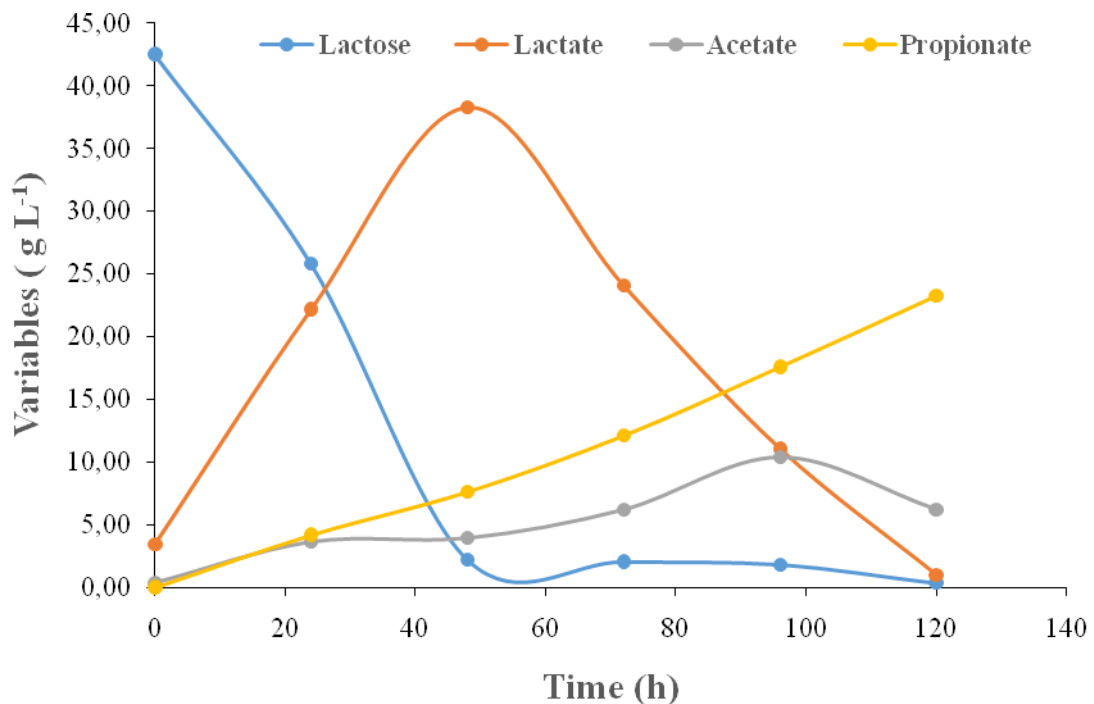


Fig. 5. Kinetics of organic acid production for treatment 14

Caption: Trat. 14: 10^7 CFU mL^{-1} , 45 g L^{-1} and 40 g L^{-1} cell count of *L. paracasei*, lactose concentration and CaCO_3 respectively

In preliminary work and in a previous study it had been observed that *P. freundenreichii* grows slower (32 h growth time) than *L. paracasei* (8 h) (Ngome et al., 2017). In Fig. 5, it was noted that at the beginning of the fermentation, *L. paracasei* metabolizes lactose, producing lactic acid, whose maximum concentration was observed in 48 h of fermentation when all lactose was metabolized. Then *P. freundenreichii* metabolized has a

preference for lactate, although lactose may also be used simultaneously, production PA. According to Seeliger et al. (2002) the propionic bacteria preferentially metabolize lactate to propionate and for each 3 moles of lactate consumed are formed 2 moles of propionate, 1 mol of acetic acid and 1 mol of carbon dioxide, plus 2 moles of ATP. PA production was more evident after 48 h of fermentation and the fermentation products of this bacterium were safe for human consumption. At the end of the fermentation in this study, 0.35 g L⁻¹ lactose and 1.01 g L⁻¹ lactate were observed (Fig. 5).

This process of fermentation with a mixed culture showed good symbiosis between lactic and propionic bacteria, which also occurs in the production of which resembles the production process of the Swiss cheese, where the activity of enzymes in *Lactobacillus spp.* promotes the release of peptides that stimulate the growth of *P. freundenreichii*. The positive interaction in this mixed culture may serve as another interesting data point for future fermentation studies.

Several authors had previously observed that *P. acidipropionici* ACT-1 has a relatively high tolerance to propionate at pH 6.5. The highest propionic acid concentration of 42.7 g L⁻¹ was found in the second batch (Wang et al., 2015a). Sequential batch fermentations in a fibrous-bed bioreactor (FBB) has much higher PA productivity (0.81 vs. 0.35 g L⁻¹ h⁻¹) and yield (0.42 vs. 0.39 g g⁻¹) at pH 6.5 (Yang et al., 2018) during subsequent batches. The production of propionic acid by propionic bacteria is inhibited by the extensive accumulation of by-products, mainly acetic acid (it decreases pH, thus inhibiting bacterial growth) (Suwannakham and Yang, 2005).

In some cases (Fig. 5), and others treatments not shown, lactose and lactate depletion may have been another inhibitor of cell growth and PA biosynthesis. The highest production of metabolites occurred between 48 and 120 h of the fermentation process with a mean production of 5.21 g L⁻¹ of propionic acid every 24 h. A study in which apple was used

as a substrate for propionic/acetic acid fermentation showed a larger increase in the production of both metabolites between 96 and 120 h (Piwowarek et al., 2016). The large production of propionic acid achieved from glycerol with genetically modified *Propionibacterium jensenii* and a strategy of pH control, had a maximum yield of 37.26 g L⁻¹ of PA and productivity of 0.163 g L⁻¹ h⁻¹ (Zhuge et al., 2014). In this work, the pH was not controlled. However, calcium carbonate was added to the fermentation medium at various concentrations according to DCCR in order to regulate abrupt pH variation during fermentation.

The PA biosynthesis in some treatments (Table 2) was not satisfactory. This can be explained by the low concentration of calcium carbonate in the medium, causing inhibition of propionic fermentation either by the low pH or the high concentration of lactose. Some authors have verified a metabolic change in *P. acidipropionici*, since *P. acidipropionici* ATCC 55737 accumulated 25 g L⁻¹ of LA in a fermenter compared to only 6 g L⁻¹ of LA for *P. acidipropionici* ATCC 4875. Clearly, the metabolism of *P. acidipropionici* ATCC 55737 was biased towards the production of LA relative to *P. acidipropionici* ATCC 4875 (Stowers et al., 2014).

LA can then be converted into PA using propionic bacteria under glucose-limiting conditions, extending the fermentation time after glucose depletion (Wang et al., 2017). The production of PA by propionic bacteria from lactate is faster than from molasses because it does not need to be metabolized by the glycolytic pathway (Ahmadi et al., 2017). Propionic acid is produced by propionic bacteria via carboxylic acids with acetic and lactic acid produced as by-products (Stowers et al., 2014).

According to the transcarboxylation reaction, they can convert pyruvate to oxaloacetate, which is then converted to succinate through the carboxylic acid cycle enzymes. Succinate is converted via intermediates of methylmalonyl coenzyme A (CoA) to propionate.

The carboxylic group removed from methylmalonyl-CoA is then transferred to pyruvate to form oxaloacetate, making it cyclic pathway (Huang et al., 2002). The production of AA from glucose by propionic bacteria is associated with redox balance, energy generation (ATP or NADH) and cell growth (Stowers et al., 2014; Wang et al., 2017) decreasing the yield of the acid (Vidra and Németh, 2018). Thus, the major challenge will be to make *P. freundenreichii* more tolerant to the substrate to provide greater production of its metabolites from the agro industrial residues.

4. Conclusions

A mixed culture of *P. freundenreichii* and *L. paracasei* can efficiently use lactose from whey for PA and AA biosynthesis and is therefore an alternative to exploit this by-product of the dairy industry. A symbiotic relationship between the microorganisms allowed the production of 23 g L⁻¹ of propionic acid using 10⁷ CFU mL⁻¹ of *L. paracasei*, 40 and 45 g L⁻¹ of calcium carbonate-supplemented dairy whey respectively. It is important to develop sustainable processes, for example, fermentative processes, for obtaining outputs of commercial value, such as propionic acid.

Acknowledgements

The authors are grateful to Fapemig for financial support, to the Brazilian agency Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES (Process Number 9246142) and to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for scholarships, and to Coleção de Culturas Tropical – FUNDAÇÃO ANDRÉ TOSELLO (CCT – FAT), Campinas / SP -Brazil for donations of microorganisms.

References

- Ahmadi, N., Khosravi-Darani, K., Mortazavian, A.M., 2017. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electron. J. Biotechnol.* 28, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.04.004>
- AOAC, 2012. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. J. Assoc. Off. Agric. Chemists 19th. Ed, 1–95.
- Belgrano, F. dos S., Diegel, O., Pereira, N., Hatti-Kaul, R., 2018a. Cell immobilization on 3D-printed matrices: A model study on propionic acid fermentation. *Bioresour. Technol.* 249, 777–782. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.087>
- Belgrano, F.D.S., Vercoza, B.R.F., Rodrigues, J.C.F., Hatti-Kaul, R., Pereira, N.J., 2018b. EPS production by *Propionibacterium freudenreichii* facilitates its immobilization for propionic acid production. *J. Appl. Microbiol.* 125, 480-489. <https://doi.org/10.1111/jam.13895>
- Chen, F., Feng, X., Xu, H., Zhang, D., Ouyang, P., 2012. Propionic acid production in a plant fibrous-bed bioreactor with immobilized *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015. *J. Biotechnol.* 164, 202–210. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.025>
- Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, M., 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical 26, 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>
- Coral, J., Karp, S.G., Porto De Souza Vandenberghe, L., Parada, J.L., Pandey, A., Socol, C.R., 2008. Batch fermentation model of propionic acid production by *propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 333–341. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8196-1>
- Dishisha, T., Alvarez, M.T., Hatti-Kaul, R., 2012. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresour. Technol.* 118, 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.079>
- Dishisha, T., Ibrahim, M.H.A., Cavero, V.H., Alvarez, M.T., Hatti-Kaul, R., 2015. Improved propionic acid production from glycerol: Combining cyclic batch- and sequential batch fermentations with optimal nutrient composition. *Bioresour. Technol.* 176, 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.013>

- Dishisha, T., Stahl, A., Lundmark, S., Hatti-Kaul, R., 2013. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. *Bioresour. Technol.* 135, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.098>
- Eş, I., Khaneghah, A.M., Hashemi, S.M.B., Koubaa, M., 2017. Current advances in biological production of propionic acid. *Biotechnol. Lett.* 39, 635–645. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2293-6>
- Feng, X., Chen, F., Xu, H., Wu, B., Li, H., Li, S., Ouyang, P., 2011. Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor. *Bioresour. Technol.* 102, 6141–6146. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.087>
- Feng, X., Xu, H., Yao, J., Li, S., Zhu, H., Ouyang, P., 2010. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for propionic acid production with *propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 343–349. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8300-6>
- Goswami, V., Srivastava, A.K., 2001. Propionic acid production in an in situ cell retention bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 676–680. <https://doi.org/10.1007/s002530000582>
- Huang, Y.L., Wu, Z., Zhang, L., Cheung, C.M., Yang, S., 2002. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor. *Bioresour. Technol.* 82, 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00151-1](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00151-1)
- Jin, Z., Yang, S., 1998. Extractive Fermentation for Enhanced Propionic Acid Production from Lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol. Progress.* 14, 457–465. <https://doi.org/10.1021/bp980026i>
- Kagliwal, L.D., Survase, S.A., Singhal, R.S., Granstrom, T., 2013. Wheat flour based propionic acid fermentation: An economic approach. *Bioresour. Technol.* 129, 694–699. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.154>
- Lima-Neto, R., Santos, C., Lima, N., Sampaio, P., Pais, C., Neves, R.P., 2014. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection 522, 515–522. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000044>

- Liu, Z., Ma, C., Gao, C., Xu, P., 2012. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresour. Technol.* 114, 711–714. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.118>
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Ngome, M.T., Alves, J.G.L.F., Piccoli, R.H., Domingo, E.C., Pinto, S.A., Bernal, O.L.M., 2017. Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. *Acta Sci. - Technol.* 39, 543–550. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i0.29479>
- Patel, R., 2013. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology 57, 564–572. <https://doi.org/10.1093/cid/cit247>
- Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., 2016. Possibility of using apple pomaces in the process of propionic-acetic fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* 23, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.004>
- Rodrigues, M. I., Iemma, A. F., 2014. *Experimental Design and Process Optimization*, CRC Press, Boca Raton (USA).
- Sabra, W., Dietz, D., Zeng, A.P., 2013. Substrate-limited co-culture for efficient production of propionic acid from flour hydrolysate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5771–5777. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4913-y>
- Seeliger, S., Janssen, P.H., Schink, B., 2002. Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 65–70. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11204.x>
- Signor, L., Boeri Erba, E., 2013. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometric Analysis of Intact Proteins Larger than 100 kDa. *J. Vis. Exp.* 1–7. <https://doi.org/10.3791/50635>
- StatSoft, Inc., 2008. *STATISTICA* (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Stowers, C.C., Cox, B.M., Rodriguez, B.A., 2014. Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41,

837–852. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1423-6>

- Suwannakham, S., Yang, S., 2005. Enhanced Propionic Acid Fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* Mutant Obtained by Adaptation in a Fibrous-Bed Bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 91, 325-337. <https://doi.org/10.1002/bit.20473>
- Vidra, A., Németh, Á., 2018. Bio-produced propionic acid: A review. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 62, 57–67. <https://doi.org/10.3311/PPch.10805>
- Wang, X., Salvachúa, D., Sánchez i Nogué, V., Michener, W.E., Bratis, A.D., Dorgan, J.R., Beckham, G.T., 2017. Propionic acid production from corn stover hydrolysate by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol. Biofuels* 10, 1754-6834. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0884-z>
- Wang, Z., Jin, Y., Yang, S.T., 2015a. High cell density propionic acid fermentation with an acid tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol. Bioeng.* 112, 502–511. <https://doi.org/10.1002/bit.25466>
- Wang, Z., Lin, M., Wang, L., Ammar, E.M., Yang, S.-T., 2015b. Metabolic engineering of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* for enhanced propionic acid fermentation: Effects of overexpressing three biotin-dependent carboxylases. *Process Biochem.* 50, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.11.012>
- Woskow, S.A., Glatz, B.A., 1991. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2821–2828.
- Yang, H., Wang, Z., Lin, M., Yang, S.T., 2018. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresour. Technol.* 250, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>
- Zhang, A., Yang, S.T., 2009. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. *Process Biochem.* 44, 1346–1351. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.013>
- Zhu, L., Wei, P., Cai, J., Zhu, X., Wang, Z., Huang, L., Xu, Z., 2012. Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresour. Technol.* 112, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.055>

Zhu, Y., Li, J., Tan, M., Liu, L., Jiang, L., Sun, J., Lee, P., Du, G., Chen, J., 2010. Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici* with glycerol as the carbon source. *Bioresour. Technol.* 101, 8902–8906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.070>

Zhuge, X., Liu, L., Shin, H.D., Li, J., Du, G., Chen, J., 2014. Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy. *Bioresour. Technol.* 152, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.063>

Artigo 2: Otimização da formulação de meio de fermentação com soro de queijo Minas frescal e água de maceração de milho para a produção de ácido propiônico a partir da cultura mista de *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 e *Lactobacillus paracasei*

Autores: Moisés Tomás Ngome¹, José Guilherme Lembi Ferreira Alves^{2*}, Cristiano Cardoso de Oliveira Patto Tourino², Luiz Ronaldo de Abreu², Olga Lucía Mondragón Bernal², Roberta Hilsdorf Piccoli²

¹*Department of Agricultural Production, Eduardo Mondlane University (UEM-ESUDER), Julius Nyerere Road, Post Office Box nº 254, Moçambique*

²*Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras/MG, Brazil, B.O.: 3037, Zip: 37.200.000*

Otimização da formulação de meio de fermentação com soro de queijo Minas frescal e água de maceração de milho para a produção de ácido propiônico a partir da cultura mista de *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 e *Lactobacillus paracasei*

Resumo

O objetivo deste estudo foi otimizar a formulação de meio de fermentação com soro de queijo Minas frescal e água de maceração de milho (AMM) para a produção de ácido propiônico a partir da cultura mista de *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 e *Lactobacillus paracasei*. Para tanto, foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes (concentração de lactose e de AMM) totalizando 12 tratamentos. Estudos cinéticos foram realizados, e as amostras foram tomadas em intervalos de tempo de 24 até 120 h. Foi determinado a produção de ácido propiônico (PAP), do ácido acético (PAA) e do ácido láctico (PAL), pH, consumo de lactose, produtividade e o rendimento da produção dos ácidos e o fator de crescimento celular. A maior PAP ($6,85 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida usando 40 g L^{-1} de lactose e 65 g L^{-1} de AMM com rendimento de $0,21 \text{ g g}^{-1}$. O consumo de lactose foi de 98,0% com crescimento celular de dois ciclos logarítmicos.

Palavras-chaves: fermentação, ácido propiônico, água de maceração de milho, soro de queijo e delineamento composto central rotacional.

Abstract

The objective of this study was to optimize the formulation of fermentation medium with Minas frescal cheese whey and corn steep liquor (CSL) for the production of propionic acid from the mixed culture of *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 and *Lactobacillus paracasei*. Central Composite Rotational Design (CCRD) was used with two independent variables (lactose and CSL concentration), totaling 12 treatments. Kinetic studies were performed, and samples were taken at time intervals of 24 to 120 h. Production of propionic acid (PAP), acetic acid (AAP) and lactic acid (LAP), pH, lactose consumption, yield and acid yield and cell growth factor were determined. The highest PAP (6.85 g L^{-1}) was obtained using 40 g L^{-1} lactose and 65 g L^{-1} CSL in a yield of 0.21 g g^{-1} . The lactose consumption was 98.0% with cell growth of two log cycles.

Keywords: fermentation, propionic acid, corn steep liquor, cheese whey and central composite rotational design.

1. Introdução

O ácido propiônico está entre os 30 produtos químicos utilizados como componentes para produtos com diversas aplicações (Werpy et al., 2004; Dishisha et al., 2012; Liu et al., 2016; Zhuge et al., 2014): conservante de alimentos (Coral et al., 2008; Ngome et al., 2017; Vidra and Németh, 2018; Yang et al., 2018). Geralmente os seus sais de sódio, potássio, cálcio e amônio são reconhecidos como aditivos alimentares seguros (Eş et al., 2017), aditivo e conservante na produção de rações de animais.

O ácido propiônico e seus sais são capazes de inibir o crescimento de outros microrganismos (Wang et al., 2014). A inibição pelo ácido propiônico é causada pelo efeito de perturbação do gradiente de pH, que é importante no transporte de nutrientes para dentro e para fora das células. A membrana citoplasmática impede compostos ionizantes de entrarem nas células bacterianas. Assim, o ácido propiônico não dissociado penetra no interior da célula e, com isso, é liberado um próton H^+ ($CH_3CH_2COOH = CH_3CH_2COO^- + H^+$), logo o gradiente de pH por meio da membrana celular é interrompido e, para ser reestabelecido, uma molécula de ATP extra é consumida, diminuindo o número de moléculas de ATP livres, para o metabolismo celular, o que faz com que o metabolismo e transporte de nutrientes fique comprometido (Coral et al., 2008; Gu et al., 1998). O ácido propiônico é um importante intermediário químico, na síntese de fibras de celulose, herbicidas, perfumes, aromas e produtos farmacêuticos (Coral et al., 2008; Vidra and Németh, 2018).

Atualmente, muitos ácidos carboxílicos são produzidos, principalmente, por síntese química a partir do petróleo (Yang et al., 2018). Contudo fontes alternativas e renováveis, para a produção de produtos químicos, incluindo o ácido propiônico, estão em destaque. Perante essa realidade, o soro lácteo e água de maceração de milho, dois subprodutos da indústria de alimentos, vêm sendo estudados como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, para a bioprodução de ácidos orgânicos por suas altas disponibilidades, bem como aumento da demanda por produtos alimentícios naturais e ecológicos.

O soro lácteo é o principal subproduto obtido na produção de queijo. Contém cerca de 70% de lactose, proteínas, minerais e traços de gordura. Geralmente, a falta de múltiplos nutrientes, como vitaminas e ou aminoácidos, pode levar ao fraco desempenho da fermentação a qual pode ser uma das razões do baixo crescimento bacteriano (Wang et al., 2017). Desse modo, a fonte de carbono, bem como a de nitrogênio afetam significativamente a biossíntese de vários produtos de interesse como o ácido propiônico.

Extrato de levedura, peptona e água de maceração de milho são boas fontes que podem ser usadas por bactérias propiônicas (Quesada-Chanto et al., 1998). Água de maceração de milho é um subproduto do processo de fabricação de milho (Gao et al., 2011), de baixo custo e possui nutrientes e minerais que são eficazes para a fermentação (Castillo-Martinez et al., 2013). Apresenta elevada quantidade de matéria orgânica, valores médios de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) de cerca de 11.000 mg L⁻¹, tornando-se um dos grandes problemas para o tratamento de resíduos indústrias de alimentos (LOSS et al., 2009). Por isso, pesquisas têm sugerido o uso da AMM, para a produção de ácidos orgânicos por via fermentativa (MADDIPATI et al., 2011), por ser considerada uma fonte econômica de nutrientes para microrganismos (CHIANI et al., 2010) como bactérias do ácido propiônico (YANG et al., 2018) e do ácido láctico (CRIVELARI et al., 2018).

Bactérias propiônicas constituem um grupo de bactérias anaeróbias, Gram-positivas e facultativas, não formadoras de esporos (THIERRY et al., 2011; PIWOWAREK et al., 2018a), catalase positiva e apresentam-se em forma de bastonetes curtos ou de cocos, de acordo com o meio em que se encontram (KIATPAPAN; MUROOKA, 2002). Este grupo de bactérias pode crescer em vários tipos de fontes de carbono (CORAL et al., 2008). Nos últimos anos, foram reconhecidas por suas propriedades probióticas para o consumo humano (WANG; YANG, 2013). Algumas espécies de bactérias propiônicas, incluindo *P. acidipropionici*, *P. freudenreichii* e *P. shermanii*, são geralmente consideradas como seguras (WANG; YANG, 2013; AHMADI; KHOSRAVI-DARANI; MORTAZAVIAN, 2017; PIWOWAREK et al., 2018a). Todas as bactérias clássicas do gênero *Propionibacterium* têm capacidade de fermentação e são importantes fontes de metabólitos valiosos (ácido propiônico, vitamina B₁₂, bacteriocina e trealose). Um exemplo são as cepas de *P. freudenreichii subsp. shermanii* que podem metabolizar a lactose (eles têm genes que codificam a enzima β-D-galactosidase (PIWOWAREK et al., 2018a; SUOMALAINEN et al., 2008). No entanto, verifica-se que as bactérias propiônicas metabolizam, preferencialmente, lactato em propionato. Desta forma, a utilização de bactérias lácticas como *Lactobacillus* é alternativa, para maior aproveitamento do soro de leite, para a produção do ácido propiônico. As bactérias do ácido láctico produzem lactato, a partir de simples fermentação de carboidratos. O gênero *Lactobacillus* pode ser considerado seguro, para a produção industrial de lactato, pois não apresenta efeitos adversos à saúde de seres humanos.

Assim, a produção de ácido propiônico com a utilização de bactérias pode resultar na redução da poluição ambiental, não apenas pelo tratamento dos resíduos, mas também por sua transformação em compostos industriais úteis e valiosos (Piwowarek et al., 2018b, 2016).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi otimizar a formulação de meio de fermentação, usando subprodutos da indústria de alimentos, para a produção de ácido propiônico, a partir da cultura mista de *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 e *Lactobacillus paracasei*.

2. Materiais e métodos

As análises foram realizadas nos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos/UFLA e no Laboratório Central de Biologia Molecular pertencente ao Departamento de Biologia/UFLA.

2.1 Matérias-primas

O soro utilizado foi proveniente da fabricação de queijo Minas frescal obtido na Planta piloto de Tecnologia de Leite do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA. A água de maceração de milho (AMM) foi doada pela empresa *Ingredion* Brasil - Ingredientes Industriais Ltda. localizada na cidade de Mogi Mirim- SP. Nos experimentos, AMM foi utilizado diretamente sem tratamento prévio. Os reagentes utilizados foram todos do grau analítico.

2.2 Preparação e análise da composição do soro de leite

O soro de leite foi filtrado com papel filtro (diâmetro de 12,5cm e porosidade 8 µm) para a retirada das micelas de proteína e homogeneizado. Em seguida, foi concentrado em evaporador rotativo (marca Tecnal -TE-210, operada a uma temperatura em torno de 80 °C) até aproximadamente a metade do volume inicial. Paralelamente, foram retiradas alíquotas antes e depois da concentração para a análise quantitativa da composição do soro (proteína, cinzas, gordura, lactose e sólidos totais).

2.3 Pureza das culturas de bactérias propiônicas e lácticas

A pureza das culturas *Lactobacillus paracasei* e *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 foi verificada, utilizando-se o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™). A cepa *Escherichia coli* K12 foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS, seguindo metodologia descrita por Lima-Neto et al. (2014).

2.4 Pureza, Ativação, estocagem e padronização do inóculo

Foram utilizadas as cepas *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 e *Lactobacillus paracasei* doadas pela Coleção de Culturas Tropical pertencente à Fundação André Tosello (Campinas/SP).

A cultura liofilizada de *Lactobacillus paracasei* foi ativada em caldo Man Rogosa & Sharpe (MRS) com incubação a 37 °C por 24 h. As culturas estoque de *L. paracasei* foram armazenadas em meio de congelamento (15 mL glicerol; 0,5 g peptona bacteriológica; 0,3 g de extrato de levedura; 0,5 g NaCl em 100 mL de água destilada, pH 7,0) a -18 °C durante todo o experimento.

A padronização do inóculo foi realizada mediante curva de crescimento. Após a reativação da cultura estoque em caldo MRS, alíquotas de 100 µL do inóculo foram transferidas para 300 mL de caldo MRS, incubadas a 37 °C, sendo realizadas leituras periódicas (intervalos de uma hora) em espectrofotômetro (D.O. 600 nm) e plaqueamento em ágar MRS, com incubação em anaerobiose, utilizando-se jarra e gerador anaerobiose (PROBAC do Brasil), a 37 °C por 96 h. O inóculo foi padronizado em 10⁸ UFC mL⁻¹.

A cultura liofilizada de *Propionibacterium acidipropionicii* NRRL B-3568 foi ativada, armazenada e padronizada seguindo a mesma metodologia de *Lactobacillus paracasei*. Entretanto os meios de cultivo foram o caldo e ágar lactato (m v⁻¹): 1% de extrato de levedura, 1% de peptona de carne, 0,025% de K₂HPO₄, 1% de lactato de sódio, sendo ao ágar lactato adicionados 2% de ágar-agar, com incubação a 37 °C por 48 h e 96 h, respectivamente. As placas foram incubadas em anaerobiose.

2.5 Otimização da formulação do meio de fermentação com resíduos agroindustriais para a produção de ácidos orgânicos

Foi realizado delineamento composto central rotacional (DCCR) com as variáveis concentração de lactose (x1) e concentração de água de maceração de milho (x2), conforme metodologia preconizada por Rodrigues; Iemma (2014). A matriz do planejamento experimental com as variáveis é mostrada na Tabela 1. As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers, sem agitação, a 37 °C por 120 h. As variáveis respostas foram a produção dos ácidos orgânicos (lático, acético e propiônico), rendimento, produtividade, consumo de lactose e contagem de células. Os resultados quantitativos foram submetidos à análise estatística.

Tabela 1. Relação entre valores codificados e reais das variáveis do (DCCR)

Variáveis		Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Lactose (g L ⁻¹)	x ₁	26	30	40	50	54
AMM (g L ⁻¹)	x ₂	15	25	40	55	65

AMM- água de maceração do milho.

2.6 Estudo cinético da fermentação

O meio de fermentação foi preparado utilizando soro de leite suplementado com água de maceração de milho, em diferentes quantidades, de acordo com o delineamento experimental (Tabela 1). Em todos os tratamentos, foi adicionado carbonato de cálcio na concentração de 40 g L⁻¹, sendo em seguida os meios autoclavados a 121 °C por 15 min. Após o resfriamento à temperatura ambiente, o meio foi inoculado com cultura de *Propionibacterium acidipropionici* e *Lactobacillus paracasei* e incubado a 37 °C durante 120 horas. A concentração do carbonato foi determinada por experimentos preliminares.

As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyers, contendo 300 mL de meio de cultura e 10% (v v⁻¹) com 10⁸ UFC mL⁻¹ de inóculo de *P. acidipropionici* e *L. paracasei*, perfazendo o total de 360 mL. Alíquotas de 10 mL dos mostos fermentados foram coletadas após 0, 24, 48, 72, 96 e 120 h de incubação. Alíquotas de 1 mL foram retiradas, para contagem em placas e o restante foi centrifugado (FANEM modelo Excelsa II 206 BL) a 1428 x g por 25 min. O sobrenadante foi coletado em frascos com tampa e congelados (-18 °C) para a realização posterior das análises de ácidos orgânicos, acidez total, açúcares redutores e pH.

A determinação do número de microrganismos viáveis foi feita por plaqueamento, no início (0 h) e ao final da fermentação (120 h), em meio ágar lactato para as duas cepas e incubadas em anaerobiose a 37°C por 4 dias.

O rendimento de produção do ácido propiônico (Y_{P/S}), a produtividade (Pr) e o fator de crescimento (FC) foram calculados segundo equações 1, 2 e 3.

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

$$Pr = (P - P_0) / t_f \quad (2)$$

$$FC = (\text{LogUFC/mL})_f / (\text{LogUFC/mL})_i \quad (3),$$

Em que P é a concentração final de ácido (g L⁻¹); P₀ - concentração inicial de ácido (g L⁻¹); S - concentração final de substrato (g L⁻¹); S₀ - concentração inicial de substrato (g L⁻¹); Pr –

produtividade; t_f - tempo de fermentação (h); Log UFC mL^{-1} – logaritmo na base 10 da contagem de unidades formadoras de colônia totais por mL no tempo final e inicial.

2.7 Determinação dos ácidos orgânicos (Lático, Acético, Propiônico)

Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, com sistema de detecção por arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), com amostrador automático SIL-20AHT. A coluna utilizada foi da marca Supelcogel C610H, 30 cm x 7,8 mm x 9,0 μm , equipada com pré-coluna, operada a uma temperatura de 40° C. A fase móvel usada foi de ácido perclórico HClO_4 100Mm (70%) em H_2O , com fluxo de 0,5 mL min^{-1} e tempo de corrida de 30 min. Os ácidos foram detectados via UV (absorbância 210 nm). A identificação dos ácidos foi feita por comparação com tempos de retenção das amostras com os respectivos padrões dos ácidos (propiônico acético e lático) todos com a pureza de 99,9% da marca Sigma-Aldrich, e a quantificação foi feita por meio de curva-padrão. As amostras foram diluídas 1/10 e filtradas com filtro de 0,22 μm para posterior análise. Os resultados foram processados com ajuda do software LC-Solutions.

2.8 Determinação dos parâmetros físico-químicos das amostras

O pH e acidez total das amostras retiradas, em diferentes tempos de fermentação, foram determinados segundo a metodologia da AOAC (2012).

A determinação da concentração de lactose, nas diferentes amostras e tempos de fermentação, foi realizada pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (Miller, 1959).

2.9 Análise estatística

Os modelos para cada resposta foram obtidos usando regressão polinomial de segunda ordem (Equação 4).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (4)$$

Em que β_0 - é constante do modelo, β_i - é coeficiente linear, β_{ii} - é coeficiente quadrático e β_{ij} - é coeficiente de interação; x_i e x_j - são as variáveis independentes; K - é o número de fatores testados ($k=2$); e ε é o erro experimental. Foi feita a análise de variância (ANOVA, e foram determinados os coeficientes de efeito e regressão dos termos individuais linear, quadrático e

de interação. Os modelos foram utilizados para gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno com auxílio do *software Statistica 8.0* (Statsoft, 2008), a 5% de significância.

3. Resultados

Os efeitos das concentrações de lactose (X1) e de água de maceração de milho (X2) sobre a produção de ácidos (lático, acético e propiônico), seus rendimentos e sobre os fatores de crescimento de *Propionibacterium acidipropionici* e *Lactobacillus paracasei* podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da produção de ácidos, rendimento e fator de crescimento, após 120 h de fermentação, em função da concentração de lactose e água de maceração de milho

Ensaio	LAC x1	AMM x2	PAP (g L ⁻¹)	PAA (g L ⁻¹)	PAL (g L ⁻¹)	Y _{AP/S} (g g ⁻¹)	Y _{AA/S} (g g ⁻¹)	Y _{AL/S} (g g ⁻¹)	FC
1	1(50)	1(55)	6,24	0,26	35,24	0,14	0,01	0,81	1,27
2	-1(30)	1(55)	1,78	2,05	18,41	0,08	0,09	0,82	1,17
3	1(50)	-1(25)	1,68	2,22	31,81	0,04	0,05	0,72	1,23
4	-1(30)	-1(25)	3,63	3,24	15,16	0,19	0,17	0,79	1,27
5	0(40)	0(40)	1,50	1,62	26,25	0,06	0,06	0,99	1,42
6	0(40)	0(40)	1,77	2,11	24,93	0,07	0,08	0,92	1,34
7	0(40)	0(40)	1,51	1,88	25,83	0,06	0,07	0,96	1,50
8	0(40)	0(40)	1,87	3,00	24,12	0,07	0,11	0,90	1,40
9	-1,41(26)	0(40)	2,76	2,28	14,33	0,21	0,18	1,10	1,14
10	1,41(54)	0(40)	2,60	1,12	34,87	0,07	0,03	0,87	1,30
11	0(40)	-1,41(15)	2,63	2,42	22,61	0,09	0,08	0,74	1,26
12	0(40)	1,41(65)	6,85	1,67	26,69	0,21	0,05	0,83	1,28

LAC- lactose, AMM- água de maceração de milho; PAP-produção do ácido propiônico; PAA-produção do ácido acético; PAL-produção do ácido lático; Y_{AP/S} –rendimento do ácido propiônico; Y_{AA/S} –rendimento do ácido acético; Y_{AL/S} –rendimento do ácido lático e FC- fator de crescimento de *P. acidipropionici* e *L. paracasei*.

Analisando-se os resultados, verifica-se que a produção de ácidos, rendimento e fator de crescimento variaram bastante. Houve maior produção de PAP e PAA de 6,85 e 3,24 g L⁻¹ nos tratamentos 12 e 4, respectivamente. No tratamento 12, as concentrações de lactose e AMM foram 40 g L⁻¹ e 65 g L⁻¹, respectivamente e esta última foi a maior concentração de AMM. Já no tratamento 4, as concentrações de lactose e de AMM foram em níveis mais baixas, 30 g L⁻¹ e 25 g L⁻¹. A produção de ácido lático (PAL) variou de 14,33 a 35,24 g L⁻¹ com rendimento máximo de, aproximadamente, 100% para o tratamento 9. Os níveis baixos da concentração de lactose resultaram em menor PAL.

Em relação ao rendimento em ácido propiônico (Y_{AP/S}), pode-se notar que, nos tratamentos 9 e 12, foram encontrados os valores máximos de 21%. Estes dois tratamentos referem-se aos pontos axiais, ou seja, no tratamento 9 foi aplicado o valor mais baixo de lactose (26 g L⁻¹) e o valor mais alto de AMM de 65 g L⁻¹ para o tratamento 12. O tratamento

9 apresentou o maior rendimento para $Y_{AA/S}$ de 18% com uso de menor concentração de lactose de 26 g L⁻¹ e 40 g L⁻¹ de AMM.

O tratamento 7 apresentou o maior valor para o fator de crescimento (1,50). Neste tratamento, foi observado o aumento aproximado de 3 ciclos logarítmicos ($1,0 \times 10^7$ a $3,13 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹), durante a fermentação. No geral, foi observado aumento de 2 a 3 ciclos logarítmicos para todos os experimentos (Tabela 2).

Pela análise estatística, foram considerados significativos os parâmetros com p-valor menores que 5% ($p < 0,05$). Os termos lineares do modelo matemático estão associados à letra L e os quadráticos à letra Q (Tabela 3).

Tabela 3. Coeficientes de regressão para as respostas PAP, PAA, PAL, YAP/S, YAA/S, YAL/S e FC

Variáveis	FV	Mean/ Interc.	(1)LAC (gL ⁻¹)(L)	LAC (gL ⁻¹)(Q)	(2)AMM (gL ⁻¹)(L)	AMM (gL ⁻¹)(Q)	1L by 2L	R ²
PAP	Regressão	1,67	0,29	0,41	1,09	1,45	1,60	0,93
	p-valor	0,0025	0,2723	0,1710	0,0038	0,0016	0,0030	
PAA	Regressão	2,15	-0,56	-0,21	-0,53	-0,03	-0,19	0,74
	p-valor	0,0002	0,0285	0,3688	0,0342	0,8798	0,5088	
PAL	Regressão	25,28	7,83	-0,21	1,56	-0,18	0,05	0,99
	p-valor	0,0000	0,0000	0,6136	0,0041	0,6580	0,9285	
Y _{AP/S}	Regressão	0,06	-0,04	0,03	0,02	0,04	0,05	0,82
	p-valor	0,0156	0,0310	0,0854	0,1478	0,0518	0,0286	
Y _{AA/S}	Regressão	0,08	-0,05	0,01	-0,02	-0,01	0,01	0,92
	p-valor	0,0002	0,0003	0,2717	0,0290	0,3255	0,4520	
Y _{AL/S}	Regressão	0,94	-0,05	0,00	0,03	-0,10	0,01	0,75
	p-valor	0,0000	0,0997	0,9151	0,2844	0,0118	0,7686	
FC	Regressão	1,41	0,04	-0,10	0,00	-0,07	0,03	0,86
	p-valor	0,0000	0,0884	0,0028	0,8550	0,0126	0,2294	

LAC- lactose; AMM- água de maceração do milho; PAL-produção do ácido lático; PAA-produção do ácido acético; PAP-produção do ácido propiônico; Y_{AL/S} –rendimento do ácido lático; Y_{AA/S} –rendimento do ácido acético; Y_{AP/S} –rendimento do ácido propiônico e FC- fator de crescimento de *P. acidipropionici* e *L. paracasei*.

Para a PAP, somente AMM e a interação da lactose com AMM é que foram significativos ($p < 0,05$) e com efeito positivo na PAP. Para PAL e PAA, a análise da regressão indicou que foram significativos ($p < 0,05$) os termos lineares da concentração da lactose e da AMM. Como os coeficientes dos termos linear da lactose e da AMM foram positivos, indicam que aumento da lactose e da AMM incrementam a produção de ácido lático, sendo maior o efeito da lactose. Para a PAA e o seu rendimento, os coeficientes dos termos linear da lactose e da AMM foram negativos, indicando que o aumento da lactose e da AMM promove a diminuição da PAA e, conseqüentemente, o seu rendimento. Já para FC, os coeficientes dos termos quadráticos da lactose e da AMM foram negativos, mostrando a diminuição de células

viáveis de *P. acidipropionici* e *L. paracasei* à medida que a concentração da lactose e da AMM aumentaram.

Os resultados da análise de variância (ANOVA), para as respostas PAP, PAL, $Y_{AP/S}$, $Y_{AA/S}$ e FC, mostraram variação dos coeficientes de determinação (R^2) de 82 a 99%. Quanto mais próximo a 100% o valor de R^2 , melhor os modelos predizem os resultados experimentais. Verificou-se, também, que os valores de F, calculados da regressão, são maiores que os valores de F tabelado em um nível de confiança de 95%. Desta forma, esses resultados demonstram bom ajuste entre os valores experimentais e previstos pelo modelo e podem representar adequadamente a relação real dos fatores escolhidos. De acordo com a análise de regressão, as variáveis PAA e $Y_{AL/S}$ não proporcionaram bom ajuste.

Foi possível, então, ajustar os modelos com as variáveis codificadas de concentração de lactose (X_1), concentração de AMM (X_2). Os modelos matemáticos empíricos completos, codificados para as respostas PAP, PAL, $Y_{AP/S}$, $Y_{AA/S}$ e FC são apresentados pelas equações 5, 6, 7, 8 e 9, em que os valores em negrito são os parâmetros estatisticamente significativos que foram obtidos utilizando o software Statistica® 8.0.

$$PAP = \mathbf{1,67} + 0,29x_1 + \mathbf{1,09}x_2 + 0,41x_1^2 + \mathbf{1,45}x_2^2 + \mathbf{1,60}x_1x_2 \quad (5)$$

$$PAL = \mathbf{25,28} + \mathbf{7,38}x_1 + \mathbf{1,5}x_2 - 0,21x_1^2 - 0,18x_2^2 + 0,05x_1x_2 \quad (6)$$

$$Y_{AP/S} = \mathbf{0,06} - \mathbf{0,04}x_1 + 0,02x_2 + 0,03x_1^2 + 0,04x_2^2 + \mathbf{0,05}x_1x_2 \quad (7)$$

$$Y_{AA/S} = \mathbf{0,08} - \mathbf{0,05}x_1 - \mathbf{0,02}x_2 + 0,01x_1^2 - 0,01x_2^2 + 0,01x_1x_2 \quad (8)$$

$$FC = \mathbf{1,41} + 0,04x_1 - \mathbf{0,10}x_1^2 - \mathbf{0,07}x_2^2 + 0,03x_1x_2 \quad (9)$$

As curvas de contorno para a PAP e PAL (Figura 1) foram geradas empregando-se as equações 5 e 6. Nas Figuras 1A e 1B, são apresentados os efeitos da concentração da lactose e da AMM. Observa-se que somente nos extremos de menor ou de maior concentração de lactose e AMM é que foi observado maior PAP. Já na Figura 1B, verifica-se que as maiores PAL são obtidas a valores acima de 45 g L⁻¹ de lactose e independente da concentração de AMM, mas com tendência de aumento de PAL nas maiores concentrações de AMM.

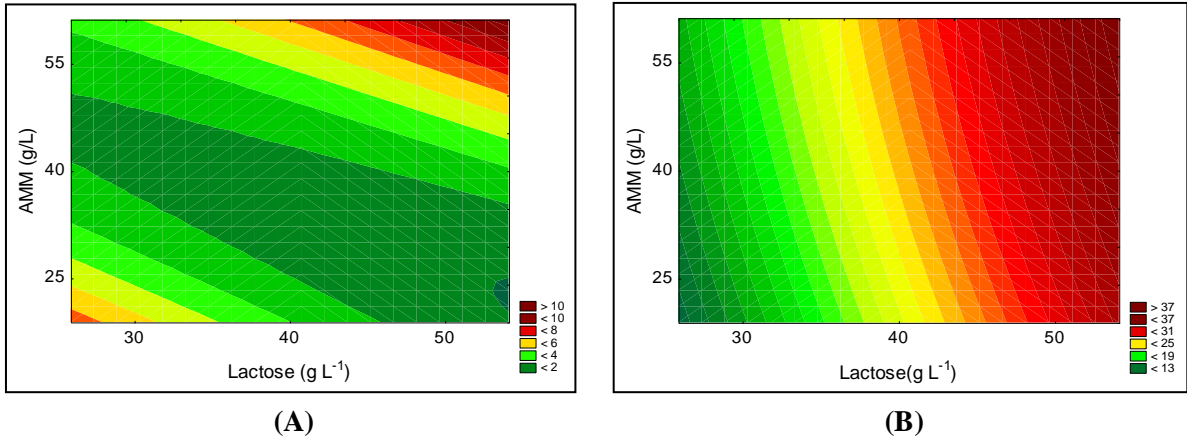


Figura 1. Influência da concentração de lactose e da água de maceração de milho na produção de ácidos orgânicos: (A) Ácido Propiônico e (B) Ácido Lático

As curvas de contorno para o $Y_{AP/S}$ e $Y_{AA/S}$ (Figura 2) foram geradas empregando-se as equações 7 e 8. Nas Figuras 2A e 2B, são apresentados os efeitos da concentração da lactose e da AMM sobre $Y_{AP/S}$ (rendimento do ácido propiônico) e $Y_{AA/S}$ (rendimento do ácido acético). Assim como na PAP, o $Y_{AP/S}$ também foi mais alto nos extremos de menor ou de maior concentração de lactose e AMM (Figura 2A). O $Y_{AA/S}$ (Figura 2B) foi observado em valores abaixo de 40 e 55 $g L^{-1}$ da concentração de lactose e da AMM, respectivamente.

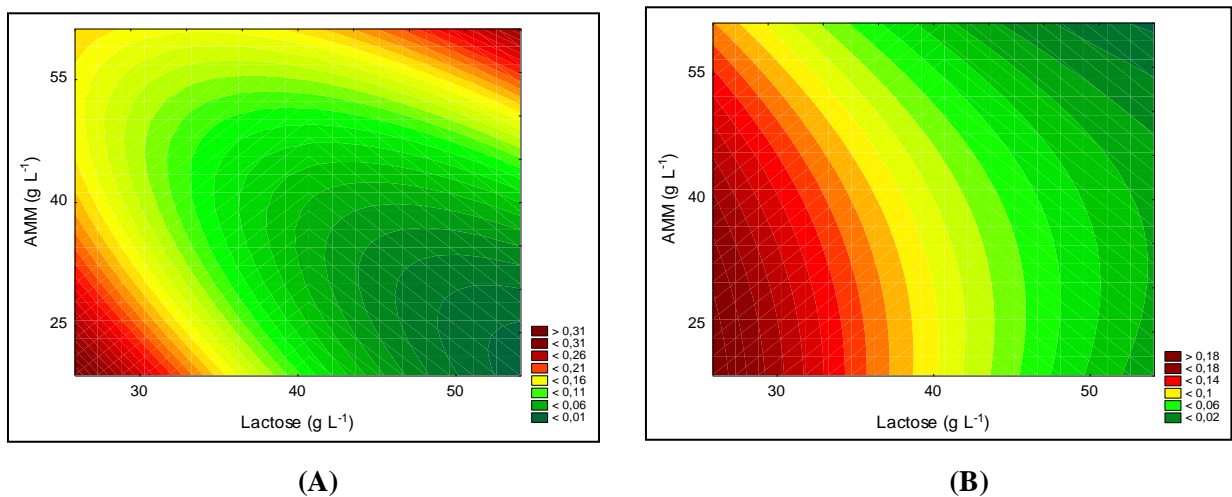
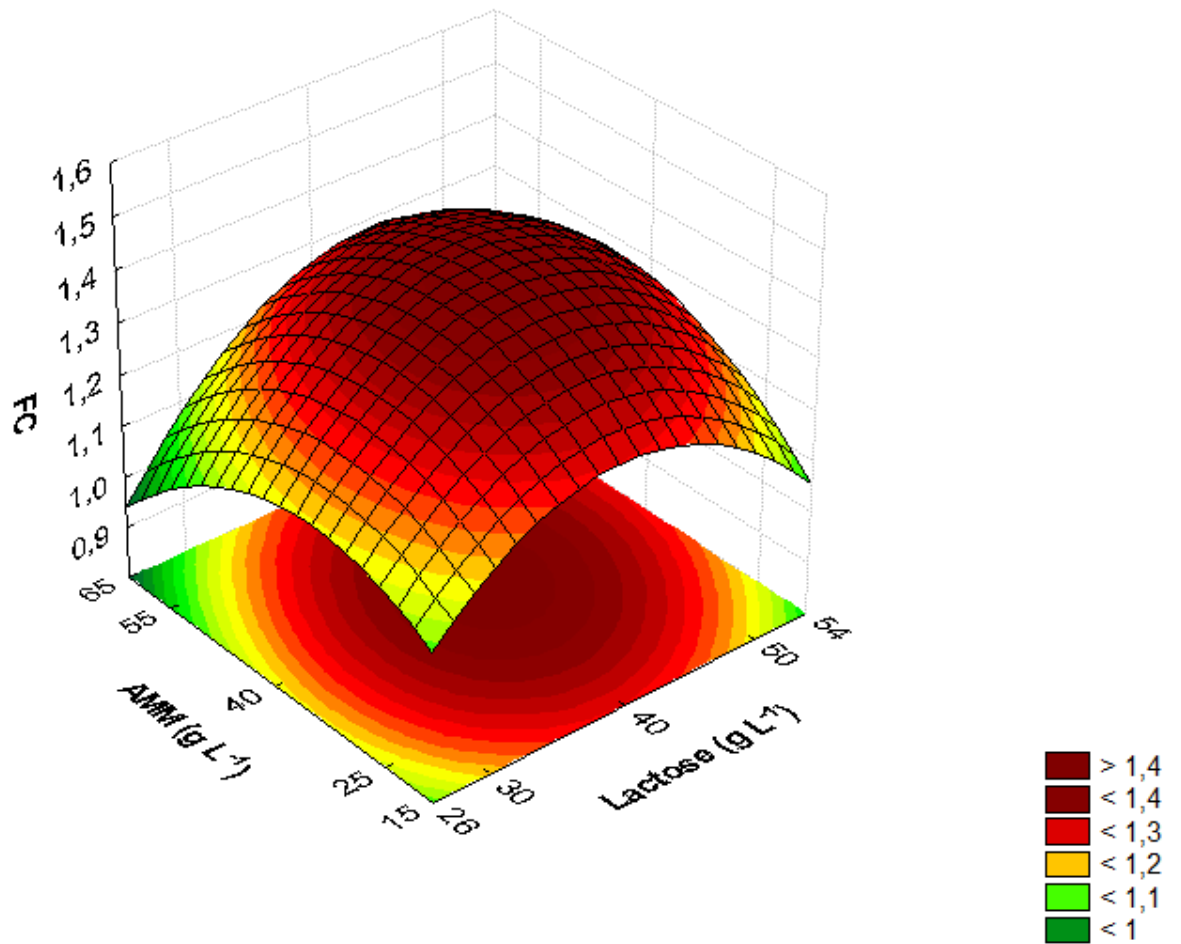
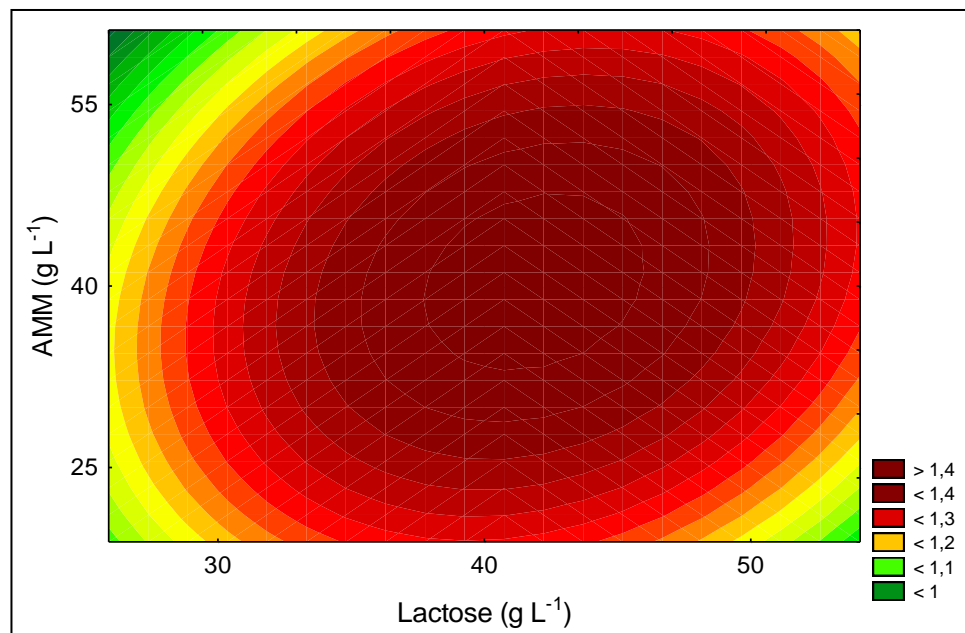


Figura 2. Efeitos da concentração da lactose e da AMM sobre $Y_{AP/S}$ (rendimento do ácido propiônico) (A) e $Y_{AA/S}$ (rendimento do ácido acético) (B)

Nas Figuras 3A e 3B são apresentadas a superfície de resposta e a curva de contorno para o FC que foram geradas, usando a equação 9, que mostra os efeitos da concentração da lactose e da AMM sobre o crescimento bacteriano, tendo o fator de crescimento atingido o máximo de 1,29.



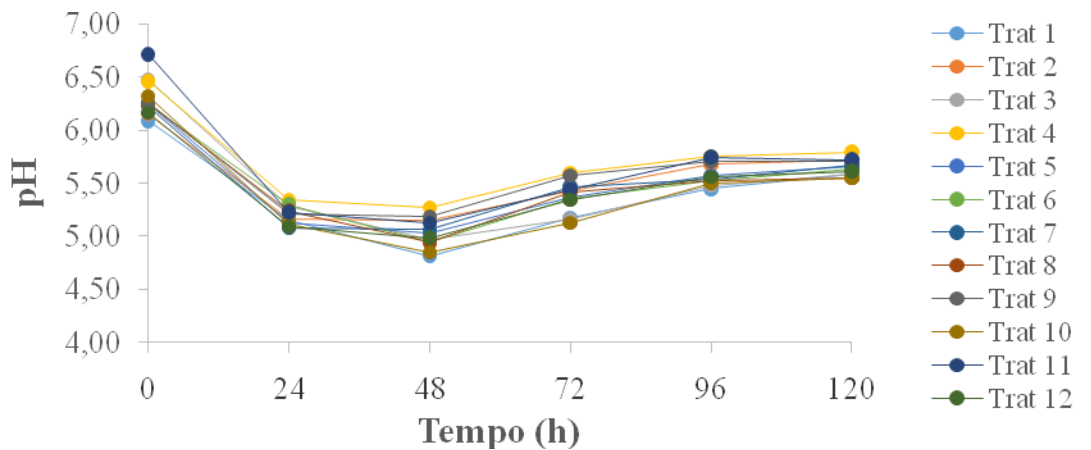
(A)



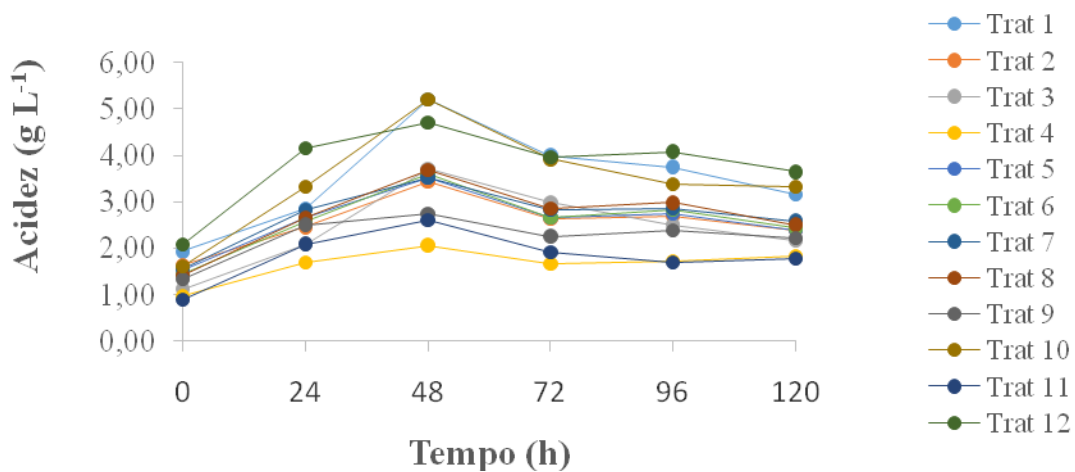
(B)

Figura 3. Efeitos da concentração da lactose e da AMM sobre o crescimento bacteriano: Superfície de resposta (A) e curva de contorno (B)

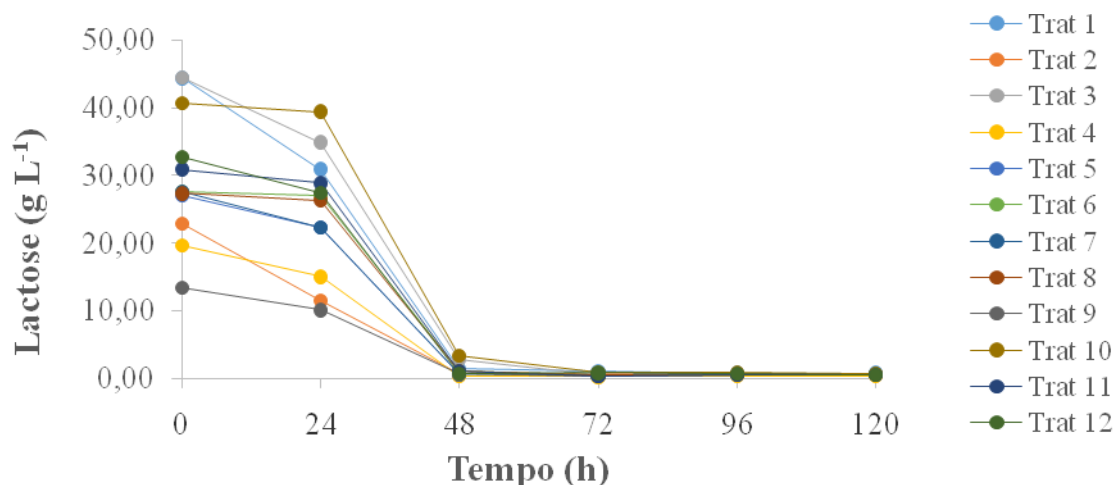
As evoluções do pH, da acidez e o consumo de lactose, durante a fermentação por cultura mista de *P. acidipropionici* e *L. paracasei*, são mostradas pela Figura 4. Os valores iniciais de pH do meio variaram em relação à média de 6,30 de todos os tratamentos. Nas primeiras 24 horas de fermentação, houve decréscimo considerável de 1,11 no valor médio de pH. De 24 a 48 horas, nota-se o mesmo comportamento, porém com variação de 0,17 do seu valor médio que é um pouco menor, comparativamente, às 24 h iniciais. Após estes períodos, o valor do pH manteve-se praticamente constante até o fim da fermentação (Figura 4A). A variação de acidez corrobora com o pH, uma vez que aumenta nas primeiras 48 h, com maior acidez neste período para os tratamentos 1, 10 e 12. De 48 h à 72 h, houve uma pequena queda de acidez em todos tratamentos. Nos tempos subsequentes da fermentação, acidez manteve-se constante (Figura 4B).



(A)



(B)



(C)

Figura 4. Variação do pH (A), da acidez (B) e consumo de lactose (C) durante a fermentação por cultura mista de *P. acidipropionici* e *L. paracasei*

Os gráficos das cinéticas de consumo de lactose, durante a fermentação, podem ser observados na Figura 4C. No geral, todo o açúcar (lactose) foi consumido (96,4% do consumo) em até 48 h, independentemente da concentração inicial da lactose. Entretanto, nos tratamentos 3 e 4, o consumo total de lactose só ocorreu após 72 h de fermentação. Os tratamentos 6, 8 e 10 mostraram o menor consumo de lactose de 0,58; 1,0 e 1,22 g L⁻¹ nas primeiras 24 h, respectivamente, pelas bactérias.

4. Discussão

A fermentação convencional, para a obtenção de ácido propiônico, emprega habitualmente um único substrato. Contudo, na prática, um único substrato não atende completamente as exigências nutricionais de *P. acidipropionicii* NRRL B-3568 e *L. paracasei* para a produção de ácido propiônico (PAP). Fontes mistas de carbono e nitrogênio podem aumentar a produção de ácido propiônico, por meio de mudanças na composição do produto final e, conseqüentemente, na cinética da fermentação.

O melaço de soja (SM), um subproduto de baixo valor econômico das indústrias beneficiadoras de soja, contém sacarose e oligossacarídeos da família da rafinose (RFO) e foi usado como fonte de carbono e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio para a PAP. A fermentação foi realizada em bateladas sequenciais, com *P. acidipropionici*, tendo alcançado 21,9 g L⁻¹, produtividade de 0,35 g L⁻¹h⁻¹ e rendimento de 0,39 g g⁻¹ com pH controlado em 6,5 (Yang et al., 2018).

No estudo com uso de duas fontes de carbono (glicose + glicerol) e uma única cultura de *Propionibacterium freudenreichii*, foi obtido PAP de 42,7 g L⁻¹, rendimentos do ácido propiônico (Y_{AP/S}) de 0,71 g g⁻¹ e produtividade do ácido propiônico de 0,36 g L⁻¹h⁻¹ em 258 h de fermentação, usando a estratégia de adição gradual do substrato (Wang et al., 2014). Na fermentação sequencial de alta densidade celular (ADC), com o pH 6,5 foi produzido ácido propiônico (40 g L⁻¹) e produtividade do AP mais alta já verificada até o momento de 2,98 g L⁻¹h⁻¹, com um rendimento de 0,44 g g⁻¹, a partir de glicose usando uma cepa tolerante a ácidos de *Propionibacterium acidipropionici* (Z. Wang et al., 2014). Neste estudo, com uso da cultura mista de *P. acidipropionicii* NRRL B-3568 e *L. paracasei* e soro proveniente do queijo Minas Frescal, como fonte de carbono e água de maceração do milho (AMM), como fonte de nitrogênio, foi obtido PAP de 6,85 g L⁻¹ com rendimento de 0,21 g g⁻¹ (Tabela 2). Salienta-se que a concentração de AMM foi o fator que maior contribuiu para a PAP. Estes resultados foram melhores, se comparados aos relatados por Ngome et al. (2017) que também utilizaram uma cultura mista de *P. freudenreichii* PS-1 and *L. helveticus* num meio de soro desnatado cuja a PAP foi 3,78 g L⁻¹.

Foi encontrado neste estudo uma relação da PAP/PAA de 23,86 que pode ser interessante para os passos subsequentes da purificação do ácido propiônico. Entretanto a concentração do ácido láctico no meio foi muito maior (35,24 g L⁻¹). Observa-se que as bactérias propiônicas metabolizam, preferencialmente, lactato em propionato e, para cada 3 moles de lactato consumidos, são formados 2 moles de propionato, 1 mol de ácido acético e 1 mol de dióxido de carbono, além de 2 moles de ATP (Seeliger et al., 2002). A célula bacteriana irá obter energia a partir da oxidação anaeróbia do próprio lactato em acetato e CO₂ (Vidra and Németh, 2018). Outros autores encontraram ácido láctico como produto principal, numa fermentação com cultura mista indefinida, usando resíduos de casca de batata a qual contém uma grande quantidade de amido, polissacarídeo não amiláceo, lignina, proteína e lipídio e obtiveram rendimentos máximos de PAL e PAA de 0,22 e 0,06 g g⁻¹ respectivamente. A PAL foi de 14,7 g L⁻¹ e de AA foi de 4,0 g L⁻¹ (Liang et al., 2014).

Neste trabalho, a maior concentração de ácido láctico no meio fermentado pode requerer reajuste para melhoramento do processo na PAP. Por outro lado, maior concentração de ácido láctico no meio fermentado pode indicar uma possível inibição das bactérias propiônicas pela alta concentração de ácido láctico. Stowers et al. (2014) consideram que o ácido láctico é um intermediário, durante a fermentação na PAP, podendo então ser convertida em AP sob condições de limitação de glicose, estendendo o tempo de fermentação, após a

depleção de glicose. A produção de AA, a partir da glicose pelas bactérias propiônicas, está associada ao equilíbrio redox, geração de ATP e crescimento celular pelo consumo do substrato.

Vários fatores podem ter influenciado o processo de fermentação, como a temperatura, pH, fonte de carbono e de nitrogênio, tempo de fermentação, entre outros. A temperatura de 37 °C, provavelmente, favoreceu mais o crescimento celular do que a formação de ácido propiônico, uma vez que foi verificado, no geral, um aumento de 2 a 3 ciclos logarítmicos. O fator de crescimento foi sempre maior que a unidade (Tabela 2 e Figuras 3A e 3B). A influência da temperatura de cultivo sobre o crescimento das bactérias impacta diretamente na produção de AP. Farhadi and Khosravi-darani, (2013) e Coral et al. (2008) observaram que, quando a temperatura foi aumentada de 30 para 35 e 40 °C, a PAP e PAA diminuía, enquanto a biomassa celular aumentou, fato que pode corroborar com os resultados encontrados no presente trabalho.

O pH, com o valor mínimo verificado de 4,81, também, é outro fator que pode ter afetado a fermentação. Segundo Coral et al. (2008), as bactérias propiônicas crescem mais rapidamente em pH entre 6,0 e 7,0, enquanto nenhum crescimento é observado em pH inferior a 4,5. Como a *P. acidipropionicii* NRRL B-3568 não metabolizou todo o lactato do mosto, houve o aumento da acidez (Figuras 4A e 4B), uma vez que pK_a do AL < pK_a do AA < pK_a do AP. Isto é, o AL é mais forte, por isso, ele tem maior influência na acidez do meio, o qual não chegou a inibir o crescimento *P. acidipropionicii* (pH = 4,5). O carbonato de cálcio (40 g L⁻¹), adicionado no início juntamente com o meio fermentado, auxiliou no controle da variação do pH.

Segundo Abdel-Rahman et al. (2011) e Tashiro et al. (2011), o aumento da concentração de ácido láctico no meio de fermentação pode inibir o crescimento bacteriano. Neutralizando os ácidos formados, durante a fermentação, por meio da formação de sal de lactato com a adição de agentes neutralizantes, tais como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, ou uma solução de amônio, é uma forma de superar parcialmente a inibição bacteriana e melhorar a eficácia do processo fermentativo. Nakano et al. (2012) relataram que cations bivalentes (Ca²⁺) são melhores do que cations monovalentes (Na⁺ e NH³⁺) como agentes de neutralização na fermentação.

O consumo de lactose foi, para todos os tratamentos, alto (96,4% de consumo de lactose em até 48 h) (Figura 4C). Essa eficiência pode ser atribuída a *L. paracasei* visto que a maior parte de lactose foi transformada em lactato em até 48 h. À medida que o AL foi

formado, a acidez do meio aumentou (Figura 1B e Figuras 4A e 4B) até o consumo total da lactose (Figura 4C).

O consumo do lactato por *P. acidipropionicii* levou à diminuição da acidez, no período de 48 a 72 h, permanecendo constante após esse período (Figura 4A e 4B). Assim, era de se esperar que, com a deficiência de lactose no meio, a *P. acidipropionicii* NRRL B-3568 utilizasse todo o lactato como único substrato para o seu crescimento e PAP. O processo metabólico, para esta bactéria, foi lento, já que foi verificado até o final da fermentação uma maior taxa de AL. Num trabalho anterior, foi verificado que as bactérias propiônicas cresciam lentamente (tempo de crescimento de 32 h) em caldo lactato (Ngome et al., 2017).

O consumo de lactose ocorreu em até 48 h, neste período, verificou-se maior produção do ácido láctico, conseqüentemente, o abaixamento drástico do pH, pois pK_a do ácido láctico < pK_a do ácido acético < pK_a do ácido propiônico. Com esgotamento de lactose em até 48 h, o lactato foi consumido por *P. acidipropionicii*, diminuindo, assim, acidez do meio (aumento ligeiro do pH). Quando o lactato foi esgotando, o pH permaneceu constante (Figuras 4A, 4B e 4C).

5. Conclusão

Conseguiu-se produzir ácido propiônico, usando-se cultura mista de *P. acidipropionicii* NRRL B-3568 e *L. paracasei*, a partir de soro de queijo Minas frescal e água de maceração de milho (AMM), com produção máxima do ácido propiônico de 6,85 g L⁻¹ e rendimento de 0,21 g g⁻¹, usando 40 g L⁻¹ de lactose e 65 g L⁻¹ de AMM. O aumento da água de maceração de milho favorece a produção de ácido propiônico, mas também a de ácido láctico, enquanto o aumento da concentração de lactose favorece, especialmente, a produção de ácido láctico. O consumo de lactose foi de 98,0% em até 48 h. O uso de subprodutos (soro de queijo e AMM) em bioprocessos é promissor.

Bibliográfia

- Abdel-rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., Hanada, K., Shibata, K., Sonomoto, K., 2011. Efficient Homofermentative L - (+) -Lactic Acid Production from Xylose by a Novel Lactic Acid Bacterium , *Enterococcus mundtii* QU 25. *Appl. Environ. Microbiol* 77, 1892–1895. <https://doi.org/10.1128/AEM.02076-10>
- Ahmadi, N., Khosravi-Darani, K., Mortazavian, A. M., 2017. An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes. *Electron. J. Biotechnol.* 28, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.04.004>
- AOAC, 2012. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. J. Assoc. Off. Agric. Chemists 19th. Ed, 1–95.
- Castillo Martinez, F. A., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez González, J. M., Converti, A., Oliveira, R.P. de S., 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 30, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.11.007>
- Coral, J., Karp, S. G., Porto De Souza Vandenberghe, L. P. S., Parada, J. L., Pandey, A., Soccol, C. R., 2008. Batch fermentation model of propionic acid production by *propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 333–341. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8196-1>
- Crivelari, M., Masotti, M. T., Mondragón-bernal, O. L., Guilherme, J., Ferreira, L., 2018. (+) -Lactic acid using medium with potato, corn steep liquor and calcium carbonate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 35. *Brazilian J. Chem. Eng.* 35, 887–900. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170024>
- Dishisha, T., Alvarez, M. T., Hatti-Kaul, R., 2012. Batch- and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresour. Technol.* 118, 553–562. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.079>
- Eş, I., Khaneghah, A. M., Hashemi, S. M. B., Koubaa, M., 2017. Current advances in biological production of propionic acid. *Biotechnol. Lett.* 39, 635–645. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2293-6>
- Farhadi, S., Khosravi-darani, K., 2013. Production of propionic acid in a fermented dairy

- beverage 66, 127–134. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12004>
- Gao, Y., Yuan, Y. J., 2011. Comprehensive quality evaluation of corn steep liquor in 2-keto-1-gulonic acid fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9845–9853. <https://doi.org/10.1021/jf201792u>
- Gu, Z., Glatz, B. A., Glatz, C. E., 1998. Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00094-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00094-X)
- Kiatpapan, P., Murooka, Y., 2002. Genetic manipulation system in propionibacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(02\)80045-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(02)80045-7)
- Liang, S., Mcdonald, A. G., Coats, E. R., 2014. Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. *Waste Manag.* 34, 2022–2027. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.07.009>
- Liu, Z., Ge, Y., Xu, J., Gao, C., Ma, C., Xu, P., 2016. Efficient production of propionic acid through high density culture with recycling cells of *Propionibacterium acidipropionici*. *Bioresour. Technol.* 216, 856–861. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.023>
- Loss, E., Rafaela, A., Barreto-rodrigues, M., Claudia, A., 2009. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp . mushroom and optimization of its biological efficiency 166, 1522–1525. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.014>
- M. Chiani, A. Akbarzadeh, A. Farhangi and, M. R. M., 2010. Production of desferrioxamine B (desderal) using corn steep liquor in *Streptomyces pilosus*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 23, 1151–1155. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2010.1151.1155>
- Maddipati, P., Atiyeh, H. K., Bellmer, D. D., Huhnke, R. L., 2011. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresour. Technol.* 102, 6494–6501. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.047>
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nakano, S., Ugwu, C. U., Tokiwa, Y., 2012. Bioresource Technology Efficient production of D - (-) -lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as a neutralizing agent. *Bioresour. Technol.* 104, 791–794.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.017>

- Ngome, M. T., Alves, J.G.L.F., Piccoli, R. H., Domingo, E. C., Pinto, S. A., Bernal, O. L. M., 2017. Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Propionibacterium freudenreichii* PS-1. *Acta Sci. - Technol.* 39, 543–550. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v39i0.29479>
- Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., 2016. Possibility of using apple pomaces in the process of propionic-acetic fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* 23, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.004>
- Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Bzducha-Wróbel, A., Synowiec, A., 2018a. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 111, 921–932. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0991-7>
- Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Kieliszek, M., Ścibisz, I., 2018b. *Propionibacterium* spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 515–538. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8616-7>
- Quesada-Chanto, A.; Afschar, A. S.; Wagner, F., 1994. Microbial production of propionic acid and vitamin B12 using molasses or sugar. *Appl Microbiol Biotechnol* 378–383.
- Quesada-Chanto, A., Da Costa, J. P. C. L., Silveira, M. M., Schroeder, A. G., Schmid-Meyer, A.C., Jonas, R., 1998. Influence of different vitamin-nitrogen sources on cell growth and propionic acid production from sucrose by *Propionibacterium shermanii*. *Acta Biotechnol.* 18, 267–274. <https://doi.org/10.1002/abio.370180312>
- Seeliger, S., Janssen, P. H., Schink, B., 2002. Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 65–70. <https://doi.org/doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11204.x>
- Stowers, C. C., Cox, B. M., Rodriguez, B. A., 2014. Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 837–852. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1423-6>
- Suomalainen, T., Sigvart-Mattila, P., Mättö, J., Tynkkynen, S., 2008. In vitro and in vivo

- gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. *Int. Dairy J.* 18, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.09.004>
- Tashiro, Y., Kaneko, W., Sun, Y., 2011. Continuous D -lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp . *lactis* QU 41. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 1741–1750. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-3011-7>
- Thierry, A., Deutsch, S., Falentin, H., Dalmaso, M., Cousin, F. J., Jan, G., 2011. New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026>
- Vidra, A., Németh, Á., 2018. Bio-produced propionic acid: A review. *Period. Polytech. Chem. Eng.* 62, 57–67. <https://doi.org/10.3311/PPch.10805>
- Wang, P., Jiao, Y., Liu, S., 2014. Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 1811–1815. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1513-5>
- Wang, X., Salvachúa, D., Sánchez i Nogué, V., Michener, W. E., Bratis, A. D., Dorgan, J. R., Beckham, G. T., 2017. Propionic acid production from corn stover hydrolysate by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biotechnol. Biofuels* 10, 200. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0884-z>
- Wang, Z., Jin, Y., Yang, S., 2014. High Cell Density Propionic Acid Fermentation with an Acid Tolerant Strain of *Propionibacterium acidipropionici* 102, 1–10. <https://doi.org/10.1002/bit.25466>
- Wang, Z., Yang, S. T., 2013. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. *Bioresour. Technol.* 137, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.012>
- Werpy, T., Petersen, G., Aden, A., Bozell, J., Holladay, J., White, J., Manheim, A., Elliot, D., Lasure, L., Jones, S., Gerber, M., Ibsen, K., Lumberg, L., Kelley, S., 2004. Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Department of Energy Washington DC, p. 77.
- Yang, H., Wang, Z., Lin, M., Yang, S. T., 2018. Propionic acid production from soy molasses

by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresour. Technol.* 250, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>

Zhuge, X., Liu, L., Shin, H. D., Li, J., Du, G., Chen, J., 2014. Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy. *Bioresour. Technol.* 152, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.063>

5. Artigo 3: Partição e purificação de ácido propiônico obtido por fermentação em Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo polietilenoglicol e citrato de sódio

Autores: Moisés Tomás Ngome¹, José Guilherme Lembi Ferreira Alves^{2*}, Kellen Cristiny Ribeiro da Silva², Fernanda de Almeida Saint'yves², Olga Lucía Mondragón Bernal², Roberta Hilsdorf Piccoli²

¹*Department of Agricultural Production, Eduardo Mondlane University (UEM-ESUDER), Julius Nyerere Road, Post Office Box nº 254, Moçambique*

²*Federal University of Lavras, Department of Food Science, Lavras/MG, Brazil, B.O.: 3037, Zip: 37.200.000*

Journal-Elsevier: Separation and Purification Technology

Partição e purificação de ácido propiônico obtido por fermentação em Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo polietilenoglicol e citrato de sódio

Resumo

Este trabalho visou desenvolver uma estratégia de purificação do ácido propiônico de meio fermentado em Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) do tipo polietilenoglicol e sal (PEG/sal) em 2 sistemas (modelo e real) e em 2 massas moleculares do polímero (PEG1500/citrato e PEG4000/citrato). Para isso, foram realizados 4 delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR), com duas variáveis independentes (concentração do PEG em % m m⁻¹ e do citrato de sódio em % m m⁻¹), totalizando 44 ensaios. Foram determinados coeficientes de partição e relação de fases no processo de purificação do ácido propiônico. As melhores condições de partição do ácido propiônico, nos sistemas modelos, foram 24 (% m m⁻¹) de PEG1500 e 15 (% m m⁻¹) do citrato. Usando meio fermentado (sistema real), as melhores condições foram 16,7 e 24 (% m m⁻¹) de PEG, 13,5 e 15 (% m m⁻¹) de citrato nos sistemas PEG1500/citrato e PEG4000/citrato, respectivamente. A análise dos modelos de regressão indicou que os modelos polinomiais quadráticos podem ser empregados com confiabilidade para purificação.

Palavras-chaves: extração, coeficiente de partição, metodologia de superfície de resposta, citrato de sódio.

Abstract

This work aimed to develop a strategy of purification of the propionic acid of the fermented medium in aqueous two-phase system (ATPS) of type polyethylene glycol and salt (PEG/salt) in 2 systems (model and in fermentation medium) and 2 polymer molecular weights (PEG1500/citrate and PEG4000/citrate). For this purpose, 4 Central Composite Rotational Design (CCRD) with two independent variables (concentration of PEG (% w w⁻¹) and sodium citrate (% w w⁻¹) were performed, totaling 44 trials. Partition coefficients and phase relationships were determined in the purification process of propionic acid. The best conditions for the partitioning of propionic acid, using fermented medium, in the model systems were 24 (% w w⁻¹) of PEG1500 and 15 (% w w⁻¹) of citrate. The best conditions were 16.7 and 24 (% w w⁻¹) PEG, 13.5 and 15 (% w w⁻¹) citrate in the PEG1500/citrate and PEG4000/citrate systems, respectively. The analysis of the mathematical regression models indicated that quadratic polynomial models can be used reliably for purification.

Keywords: extraction, partition coefficient, response surface methodology, sodium citrate.

1. Introdução

O desenvolvimento de processos biotecnológicos industriais que utilizam recursos naturais renováveis é uma necessidade que se faz presente, nos dias de hoje, dada a preocupação com o abastecimento de petróleo e o desenvolvimento sustentável. Por isso, há um grande interesse pelos processos fermentativos, para a produção de ácidos carboxílicos, a partir de recursos renováveis. [1] verificaram que o interesse pela recuperação dos ácidos, a partir do caldo de fermentação, aumentou pelo crescimento da demanda de ácidos produzidos, a partir de produtos naturais, principalmente, para a indústria de alimentos.

O ácido propiônico é um dos principais ácidos carboxílicos que tem amplos usos nas indústrias de alimentos, em especial, para a preservação de alimentos para animais, incluindo feno, silagem e grãos e, em alimentos humanos, como produtos de panificação e queijo; em indústrias químicas e farmacêuticas, para a fabricação de fármacos antiartríticos, perfumes e bioaromas, plastificantes, preparações de moldes em silagem e feno e como solvente [2- 3,4]. Assim, a crescente importância da produção de ácidos orgânicos por fermentação faz com que se busquem métodos eficientes para a separação e purificação do produto.

Uma das alternativas de purificação é o processo de extração líquido-líquido por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB). Esse método tem-se mostrado uma opção promissora para a separação de várias substâncias biológicas. Alguns autores mostraram que sistemas aquosos bifásicos formam-se, espontaneamente, misturando soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos ou então um polímero hidrofílico e um sal, em determinadas concentrações [5-6-7]. Cada um dos constituintes do sistema tende a se concentrar em uma das fases, oferecendo diferentes ambientes físico-químicos, para a partição de solutos como proteínas, células, partículas celulares e ácidos nucleicos (Figura 1).

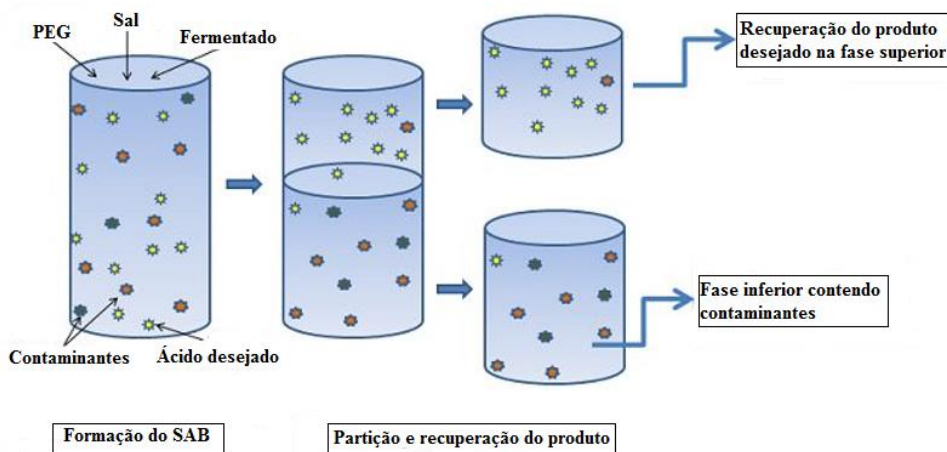


Figura 3. Extração em batelada utilizando sistemas aquosos bifásicos
Adptado: [8].

Muitos trabalhos sobre a extração, usando sistemas aquosos bifásicos foram relatados [8-6-9-10,11,12,13,14-15-7,16,17]. As principais vantagens de se utilizar tais sistemas são: facilidade de *scale-up*; rápida transferência de massa, com o equilíbrio sendo atingido com relativo pouco uso de energia (só para agitação); os equipamentos podem ser operados de forma contínua; os polímeros estabilizam as enzimas; a separação dos componentes biológicos de diferentes origens pode ser rápida [7], sendo conduzida à temperatura ambiente e é mais econômico que outros processos de separação [18].

O polietilenoglicol (PEG) é um polímero não tóxico, inflamável e não volátil, em sistemas aquosos bifásicos, portanto os sistemas aquosos bifásicos, baseados em PEG, podem ser considerados ambientalmente amigáveis, ao contrário dos sistemas convencionais de extração por solvente que utilizam solventes orgânicos imiscíveis em água. Ácidos orgânicos como o ácido propiônico podem se distribuir, seletivamente, nas fases superior e inferior de SAB [13]. Vários fatores como pH, massa molar e concentração do polímero hidrossolúvel, concentração e tipo de sal e propriedades biomoleculares podem afetar fortemente o comportamento de particionamento de biomoléculas em sistemas aquosos de duas fases. Esses fatores são inerentes ao sistema (por exemplo, escolha dos componentes do sistema, massa molar do polímero, concentração de polímeros e pH) [19].

A extração líquido-líquido é um método eficiente, econômico e fácil de escalonamento, para a separação de ácido propiônico em soluções. No entanto alguns extractantes tradicionais, como álcoois, cetonas, éteres, ésteres e hidrocarbonetos alifáticos provaram ser inadequados. A possível razão é que a alta afinidade dos ácidos à água induz baixos coeficientes de distribuição [20,21]. O método convencional inclui a adição de hidróxido de cálcio, para formar sal (propionato de cálcio), ao qual é adicionado, posteriormente, o ácido sulfúrico para libertar ácido propiônico livre [22]. Este método de recuperação é caro e hostil ao meio ambiente, já que consome muita cal e ácido sulfúrico e, também, gera resíduo sólido de sulfato de cálcio [23]. A concentração dos ácidos carboxílicos em meios fermentados, geralmente, é baixa (menos de 10%), tornando as técnicas tradicionais de purificação menos eficientes [24], [22]. Portanto sistemas aquosos bifásicos têm sido intensivamente pesquisados para a recuperação e purificação parcial de compostos biológicos de interesse industrial [9,12–15, 25–29].

Sistemas aquosos bifásicos preparados com polímeros + sal, polímero + polímero, copolímeros + sal ou copolímero + polímero são adequados à purificação contínua e em larga escala de compostos de origem biológica [6,18]. Adicionalmente, a maioria das operações unitárias que compõem um processo de biotecnologia estão focadas na recuperação e

purificação do produto de interesse. Neste contexto, o desenvolvimento de métodos, para a purificação, eficientes e econômicos representa uma área de pesquisa de grande interesse. Os tradicionais SAB de polimérico/sal têm sido utilizados para a recuperação e purificação de produtos de alto valor [18]. No entanto a purificação do ácido propiônico no meio fermentado não tem sido amplamente abordada como no caso de purificação de proteínas e enzimas.

Assim, este trabalho objetivou desenvolver uma estratégia de purificação do ácido propiônico obtido por fermentação do soro lácteo, usando *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 em Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) do tipo polietilenoglicol e sal (PEG/sal).

2. Material e métodos

O ácido propiônico, polietilenoglicol (PEG), com massa molar de 1500 e 4000 e outros produtos químicos utilizados, foram de grau analítico. Marca e pureza/Brasil.

2.1 Preparação, montagem dos Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) e partição do ácido propiônico

Foram preparadas soluções estoques de PEG1500 + água destilada (concentração de 60% m.m⁻¹) e citrato + água destilada (concentração de 30% m m⁻¹). Após solubilização, as soluções foram ajustadas ao pH = 7, com ácido cítrico 1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio 1 mol L⁻¹.

Para a montagem de cada sistema, foram empregados tubos de centrífuga de 15 mL. Na balança analítica, foram pesadas, inicialmente, as soluções estoque de PEG, de citrato de sódio e água purificada. Após esse procedimento, os tubos foram agitados e levados para a centrífuga, onde foram centrifugados (FANEM modelo Excelsa II 206 BL) a 952 g por 15 min. Terminada a centrifugação, os tubos foram levados à incubadora B.O.D, mantidos a 25 °C durante 24h. Passado esse tempo, os tubos foram retirados da incubadora B.O.D, após terem atingido o equilíbrio termodinâmico. Amostras controle de cada fase foram coletadas e, depois, armazenadas em frascos de vidro. Para a retirada das amostras nas fases topo e fundo, utilizaram-se pipetas automáticas.

Com base nesses sistemas, foram formados outros sistemas de massa final de 10 g (5 g da fase topo e 5 g da fase fundo), em tubos centrífugos graduados de 15 mL. Em seguida, foram adicionados, em cada um dos tubos, 100 µL de ácido propiônico de grau analítico e, logo após, os tubos foram agitados e levados à centrífuga a 2000 rpm (952 g) por 15 minutos. Terminada essa etapa, os tubos foram armazenados novamente em incubadora B.O.D por 24 horas a 25 °C. depois de 24 horas, os tubos foram retirados da incubadora B.O.D, os volumes

das fases medidas e as fases topo e fundo foram retiradas com a pipeta automática e as amostras colocadas em tubos eppendorf, para a determinação de acidez total e para a determinação da relação das fases.

Para o sistema PEG4000/Citrato de sódio/água, foi usado o mesmo procedimento do PEG1500/Citrato de sódio/água. Na segunda fase do trabalho, foram também usados os mesmos sistemas (PEG1500/Citrato de sódio/água e PEG4000/Citrato de sódio/água). Entretanto, após a preparação das soluções estoque de PEG, de citrato de sódio e água purificada foram formados logo sistemas de massa final de 10 g (5 g da fase topo e 5 g da fase fundo), em tubos centrífugos graduados de 15 mL. Depois, foi adicionado 1 mL do meio fermentado, obtido na biossíntese de ácido propiônico por cultura mista de *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 e *Lactobacillus paracasei*, usando soro lácteo como meio de cultura. Adicionado amostra nos tubos foi seguido o passo anterior com ácido propiônico como amostra. Após análise de resultados, foram selecionados os tratamentos que apresentaram menor coeficiente de partição de ácidos orgânicos totais, para a determinação de ácido propiônico, acético e láctico, usando cromatografia líquida.

2.2 Purificação do ácido propiônico no sistema aquoso bifásico PEG/Citrato

Para a purificação do ácido propiônico, foram feitos quatro delineamentos compostos centrais rotacionais (DCCR) [30], com duas variáveis independentes, concentração de PEG e de citrato de sódio. Na Tabela 1, são apresentados os intervalos estudados para as duas variáveis. Dois planejamentos experimentais foram conduzidos, para a partição de ácido propiônico puro (PEG1500/Citrato de sódio/água e PEG4000/Citrato de sódio/água) e dois para a purificação do meio fermentado. Os sistemas com ácido propiônico puro (PEG1500/Citrato de sódio/água e PEG4000/Citrato de sódio/água) e os sistemas com o meio fermentado (PEG1500/Citrato de sódio/água e PEG4000/Citrato de sódio/água) foram designados por sistemas modelos e sistemas reais, respectivamente.

Tabela 5. Relação entre valores codificados e reais das variáveis independentes do DCCR para os Sistemas PEG1500/citrato de sódio/água e PEG4000/citrato de sódio/água

Variáveis		Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	1,41
PEG(%m/m)	x ₁	16,7	18	21	24	25,2
Citrato(%m/m)	x ₂	11,4	12	13,5	15	15,6

2.3 Determinação dos Coeficientes de Partição

O coeficiente de partição do ácido propiônico (K_{AP}) é a razão entre a concentração de equilíbrio de ácido propiônico, na fase superior (C_T) e a concentração de equilíbrio do ácido, na fase inferior (C_F). O K_{AP} foi utilizado para quantificar o grau de partição e separação alcançado num processo de purificação. A relação de fases é a razão dos volumes da fase superior ou topo (V_t) e a fase inferior ou fundo (V_f). Para a seleção do melhor sistema de purificação, foi calculado o rendimento para cada sistema. Assim, os coeficientes de partição, relação de fases e o rendimento foram determinados, usando as equações 1, 2, 3 e 4:

$$K_{AP} = \frac{C_T}{C_F} \quad (1)$$

$$Rf = \frac{V_t}{V_f} \quad (2)$$

$$Y(\%) = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{Rf * K_{AP}}\right)} \quad (3)$$

$$K_{AT} = \frac{C_{AT,T}}{C_{AT,F}} \quad (4)$$

Em que K_{AP} é o coeficiente de partição do ácido propiônico, C_T e C_F são as concentrações de ácido propiônico, nas fases de topo e fundo, em % m m⁻¹, respectivamente, Rf é a relação de fases, V_t é o volume da fase topo enquanto V_f é o volume da fase fundo e $Y(\%)$ é o rendimento de purificação do ácido propiônico do sistema, K_{AT} é o coeficiente de partição dos ácidos orgânicos totais e C_{AT} é a concentração de ácidos totais nas fases topo (T) e fundo (F).

2.4 Determinação dos parâmetros físico-químicos

O pH foi determinado diretamente na amostra com auxílio de potenciômetro digital de bancada (Tecnonon, modelo mPA-210). As concentrações de ácido propiônico nas fases foram determinadas pela titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹ previamente padronizada com a solução do ácido oxálico (99,9%) [31]. Foi pesado em erlenmeyer, em média, 1g das fases brancas (amostra controle) e das fases com ácido propiônico e acidez total, para sistemas modelo e reais, respectivamente. Logo depois, foram adicionadas três a quatro gotas de Fenolftaleína, 1% e 50 mL de água destilada, para iniciar a titulação.

A acidez titulável foi expressa em % (m m⁻¹), conforme a Equação 5:

$$AT (\% \text{ de ácido propiônico}) = \frac{V \times f \times 0,74 \times M \times 10}{A} \quad (5)$$

Sendo:

AT: acidez total (% m v⁻¹);

V: volume da solução de NaOH gasto na titulação, em mL;

A: massa da amostra, em g;

f: fator de correção da solução de hidróxido de sódio (NaOH);

0,74: fator de conversão do ácido propiônico;

M: molaridade da solução de NaOH utilizada (0,1 mol L⁻¹).

2.5 Determinação dos ácidos orgânicos (Lático, Acético, Propiônico)

Os ácidos orgânicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, com sistema de detecção por arranjo de diodos (modelo SPD-M20A), com amostrador automático SIL-20AHT. A coluna utilizada foi da marca Supelcogel C610H, 30 cm x 7,8 mm x 9,0 µm, equipada com pré-coluna, operada a uma temperatura de 40° C. A fase móvel usada foi de ácido perclórico HClO₄ 100Mm (70%) em H₂O, com fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e tempo de corrida de 30 min. Os ácidos foram detectados via UV (absorbância 210 nm). A identificação dos ácidos foi feita por comparação com tempos de retenção das amostras com os respectivos padrões dos ácidos (propiônico acético e lático), todos com a pureza de 99,9% da marca Sigma-Aldrich, e a quantificação foi feita por meio de curva-padrão. As amostras foram diluídas 1/10 e filtradas com filtro de 0,22 µm para posterior análise. Os resultados foram processados com ajuda do software LC-Solutions.

2.6 Análise estatística

Os cinco níveis codificados de cada variável foram incorporados ao planejamento experimental (DCCR) e foram analisados em 11 ensaios experimentais. O efeito das variáveis independentes nas respostas foi investigado, usando a Equação 6 de regressão polinomial de segunda ordem.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (6)$$

Em que β_0 - é constante do modelo, β_i - é coeficiente linear, β_{ii} - é coeficiente quadrático e β_{ij} - é coeficiente de interação; x_i e x_j - são as variáveis independentes; K - é o número de fatores testados (k=2); e ε é o erro experimental. Foi feita análise de variância

(ANOVA) e foram determinados os coeficientes de regressão dos termos individuais linear, quadrático e de interação. Os modelos foram, então, utilizados para gerar superfícies de resposta e curvas de contorno com auxílio do *software Statistica 8.0* [32], a 5% de significância.

3. Resultados e discussão

Os valores de acidez titulável foram calculados para cada sistema subtraindo a acidez da amostra-controle (branco). Foram determinados os coeficientes de partição (K_{AP}) e relação de fases (Rf), para o ácido propiônico puro e para a purificação, usando o meio fermentado. Para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água destilada e PEG4000/citrato de sódio/água, os resultados para a partição do ácido propiônico puro estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos coeficientes de partição do ácido propiônico (K_{AP}) e relação de fases obtidos no DCCR para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água e PEG4000/citrato de sódio/água, no sistema modelo

Ensaio	PEG (%m/m)	Citrato (%m/m)	PEG 1500		PEG 4000	
	x1	x2	K_{AP}	Rf	K_{AP}	Rf
1	-1,00 (18)	-1,00 (12)	0,78	0,76	0,43	0,48
2	1,00 (24)	-1,00 (12)	0,42	0,49	0,41	0,42
3	-1,00 (18)	1,00(15)	0,46	0,51	0,39	0,40
4	1,00 (24)	1,00 (15)	0,32	0,40	0,34	0,37
5	-1,41 (16,7)	0,00 (13,5)	0,51	0,53	0,46	0,50
6	1,41 (25,2)	0,00 (13,5)	0,39	0,41	0,41	0,43
7	0,00 (21)	-1,41 (11,4)	0,53	0,59	0,44	0,45
8	0,00 (21)	1,41 (15,6)	0,38	0,40	0,39	0,40
9	0,00 (21)	0,00 (13,5)	0,50	0,47	0,42	0,41
10	0,00 (21)	0,00 (13,5)	0,48	0,49	0,41	0,41
11	0,00 (21)	0,00 (13,5)	0,49	0,49	0,40	0,45

K_{AP} – coeficiente de partição do ácido propiônico, Rf- relação de fases.

Os valores dos coeficientes de partição do ácido propiônico puro (K_{AP}), no sistema PEG1500/citrato, variaram de 0,32 a 0,78, mostrando que o mesmo tem preferência pela fase inferior rica em citrato de sódio. O maior valor do coeficiente de partição de 0,78 (Ensaio 1) correspondeu ao sistema com 18% PEG e 12% de citrato de sódio, e o menor valor do coeficiente de partição de 0,32 correspondeu ao Ensaio 4 com 24% PEG e 15% citrato de sódio. Neste último ensaio, com menor K_{AP} , a relação de fases observada foi de 0,40 e resultou na maior recuperação do ácido propiônico na fase inferior. Já para PEG4000/citrato de sódio, o ácido propiônico mostrou também ter preferência pela fase inferior rica em citrato

de sódio e verificou-se que houve menor variação do coeficiente de partição (0,34 a 0,46). O menor valor verificado do coeficiente de partição foi 0,34 no ensaio 4 (24% PEG e 15% citrato de sódio), mesmas concentrações do ensaio com menor K_{AP} do sistema com PEG 1500, com relação de fases (Rf) de 0,37. Nestes sistemas, o volume de fase superior sempre foi menor que o da fase inferior.

Na Tabela 3, são apresentados os dados dos coeficientes de partição dos ácidos orgânicos totais (K_{AT}) e relação de fases para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água e PEG4000/citrato de sódio/água, no sistema real.

Tabela 3. Resultados dos coeficientes de partição dos ácidos orgânicos totais (K_{AT}) e relação de fases obtidos no DCCR para o sistema PEG1500/citrato de sódio/água e PEG4000/citrato de sódio/água, no sistema real

Ensaio	PEG	Citrato	PEG 1500		PEG 4000	
	(%m/m) x1	(%m/m) x2	K_{AT}	Rf	K_{AT}	Rf
1	-1,00 (18)	-1,00 (12)	0,51	1,60	0,51	1,25
2	1,00 (24)	-1,00 (12)	0,55	1,80	0,16	1,65
3	-1,00 (18)	1,00(15)	0,44	1,00	0,41	1,00
4	1,00 (24)	1,00 (15)	0,50	1,31	0,15	1,28
5	-1,41 (16,7)	0,00 (13,5)	0,21	1,11	0,19	1,00
6	1,41 (25,2)	0,00 (13,5)	0,30	1,55	0,19	1,44
7	0,00 (21)	-1,41 (11,4)	0,29	1,85	0,51	1,50
8	0,00 (21)	1,41 (15,6)	0,50	1,11	0,23	1,02
9	0,00 (21)	0,00 (13,5)	0,29	1,40	0,29	1,25
10	0,00 (21)	0,00 (13,5)	0,26	1,37	0,36	1,16
11	0,00 (21)	0,00 (13,5)	0,35	1,33	0,31	1,23

K_{AT} - coeficiente de partição total, Rf- relação de fases.

Ao analisar os valores encontrados no sistema real, foi possível observar o mesmo comportamento dos sistemas modelos em relação à preferência da partição dos ácidos orgânicos pela fase inferior (rica em citrato de sódio). Todos os coeficientes de partição foram inferiores a 1 e variaram de 0,26 a 0,55, para o sistema com PEG 1500 e de 0,15 a 0,51 para o sistema com PEG 4000. No entanto, comparando os sistemas modelo com reais, foi verificado um aumento na relação de fases (Rf), para PEG1500 e PEG4000, em todos os tratamentos, sendo os valores iguais ou superiores a 1. Os sistemas com os menores coeficientes de partição (K_{AT}) foram o Ensaio 5 (16,7 % m m⁻¹ PEG e 13,5% m m⁻¹ citrato), para PEG 1500 com K_{AT} igual a 0,21 e os Ensaios 2 (24% m m⁻¹ PEG e 12% m m⁻¹ citrato) e 4 (24% m m⁻¹ PEG e 15% m m⁻¹ citrato), para os sistemas com PEG 4000 com valores de K_{AT} de 0,16 e 0,15, respectivamente.

A partir dos dados experimentais, apresentados na Tabela 2, foram feitas as análises de regressão múltipla para as variáveis K_{AP} e R_f . Foram considerados significativos os parâmetros com $p < 0,05$. As Tabelas 4 e 5 mostram os coeficientes de regressão para K_{AP} , K_{AT} e R_f para a partição do ácido propiônico puro e de ácidos orgânicos totais, nos sistemas aquosos bifásicos estudados. Em negrito, são demonstrados os parâmetros significativos ($p < 0,05$).

Tabela 4. Coeficientes de regressão para as respostas K_{AP} e R_f da partição do ácido propiônico puro (sistema modelo)

Sist/ Mod	Var.	FV	Mean/ Interc.	(1)PEG (%mm ⁻¹)(L)	PEG (%mm ⁻¹)(Q)	(2)Citrato (%mm ⁻¹)(L)	Citrato (%mm ⁻¹)(Q)	1L by 2L	R ²
Sist. Mod PEG1500/ citrato	K_{AP}	Regressão	0,49	-0,08	-0,01	-0,08	-0,01	0,05	0,85
		p-valor	0,0000	0,0169	0,7415	0,0185	0,7812	0,1566	
Sist. Mod PEG1500/ citrato	R_f	Regressão	0,48	-0,07	0,01	-0,08	0,02	0,04	0,88
		p-valor	0,0000	0,0131	0,7078	0,0087	0,3704	0,1545	
Sist. Mod PEG4000/ Citrato	K_{AP}	Regressão	0,4113	-0,02	0,00	-0,02	-0,01	-0,01	0,76
		p-valor	0,0000	0,0723	0,7659	0,0281	0,5298	0,6334	
Sist. Mod PEG4000/ Citrato	R_f	Regressão	0,43	-0,02	0,01	-0,02	-0,01	0,01	0,79
		p-valor	0,0000	0,0393	0,2381	0,0346	0,4710	0,5121	

Sist. -Sistemas, Mod- Modelos, Var. – variável, K_{AP} – coeficiente de partição do ácido propiônico e R_f – relação de fases ou de volumes superior e inferior.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, os termos lineares da concentração de PEG1500 e 4000 e de citrato de sódio apresentaram efeitos significativos negativos sobre K_{AP} e R_f ($p < 0,05$), nos sistemas modelos, exceto sobre K_{AP} do PEG4000, que não foi significativo. Isso significa que um aumento de PEG e do citrato de sódio proporciona uma diminuição da resposta (K_{AP}) que pode ser uma situação interessante para o processo da purificação do ácido propiônico.

Analisando os dados da Tabela 5, quando foram usados sistemas reais, nem a concentração de PEG, nem a concentração de citrato exerceram efeitos significativos (5%) sobre o coeficiente de partição dos ácidos orgânicos totais. Entretanto, para a relação de fases, os termos lineares da concentração do PEG1500 e PEG4000 apresentaram efeitos significativos positivos em nível de 95% de confiança. Para o termo linear de citrato, o efeito foi significativo e negativo para estes modelos. Esse fato significa que um aumento de PEG e uma diminuição de citrato proporciona um aumento da R_f . Em negrito, são demonstrados os parâmetros significativos ($p < 0,05$).

Tabela 5. Coeficientes de regressão para as respostas KAT e Rf para os sistemas com partição de meio fermentado (sistema real)

Sist/	Var.	FV	Mean/ Interc.	(1)PEG (%mm ⁻¹)(L)	PEG (%mm ⁻¹)(Q)	(2)Citrato (%mm ⁻¹)(L)	Citrato (%mm ⁻¹)(Q)	1L by 2L	R ²
Sist. Real PEG1500/ Citrato	K _{AP}	Regressão	0,30	0,03	0,02	0,02	0,09	0,01	0,40
		p-valor	0,0108	0,6217	0,7818	0,6479	0,1630	0,9283	
	Rf	Regressão	1,37	0,14	-0,01	-0,27	0,06	0,03	0,99
		p-valor	0,0000	0,0001	0,3952	0,0000	0,0054	0,1428	
Sist. Real PEG4000/ Citrato	K _{AP}	Regressão	0,32	-0,08	-0,06	-0,06	0,03	0,02	0,65
		p-valor	0,0039	0,1091	0,2460	0,1620	0,5109	0,7154	
	Rf	Regressão	1,21	0,16	0,02	-0,16	0,04	-0,03	0,97
		p-valor	0,0000	0,0002	0,4415	0,0002	0,1168	0,2848	

Sist. -Sistemas, Var. – variável, K_{AP} – coeficiente de partição do ácido propiônico e Rf – relação de fases ou de volumes superior e inferior.

Os modelos, para K_{AP} e de Rf obtidos nos sistemas PEG1500/citrato e nos sistemas reais (PEG1500 e 4000)/citrato, foram significativos pelo Teste F ($F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$). O bom ajuste do modelo foi também verificado pelo coeficiente de determinação -R², como pode ser visto nas Tabelas 4 e 5. Os restantes modelos não apresentaram bom ajuste. Khayati. (2013), no seu artigo de otimização da extração do ácido propiônico, usando metodologia de superfície de resposta, encontrou rendimento máximo de ácido propiônico extraído com o sistema 30,71% m m⁻¹ PEG4000/31,77% m m⁻¹ sulfato de amônio, à temperatura de 37,37 °C e adicionando-se 0,72% m m⁻¹ de ácido propiônico. A variação da temperatura de 20 a 40 °C e a concentração do ácido propiônico de 0,2 a 1,8% m m⁻¹ foram os fatores mais importantes que afetaram o rendimento da extração, enquanto a concentração de PEG4000 de 20 a 40% m m⁻¹, concentração do sulfato de amônio de 15 a 35% m m⁻¹ e todos os termos de interação não tiveram efeitos estatisticamente significativos (p-valor > 0,05).

Os modelos de regressão com variáveis codificadas para K_{AP} e Rf são apresentados nas Equações 7, 8, 9 e 10. Estes modelos podem ser usados, para prever o desempenho de partição do processo, especialmente, a Equação 7 para o coeficiente de partição.

$$K_{AP} (\text{PEG1500/citrato/mod}) = \mathbf{0,49} - \mathbf{0,08x_1} - \mathbf{0,08x_2} - 0,01x_1^2 - 0,01x_2^2 + 0,05x_1x_2 \quad (7)$$

$$Rf (\text{PEG1500/citrato/mod}) = \mathbf{0,48} - \mathbf{0,07x_1} - \mathbf{0,08x_2} + 0,01x_1^2 + 0,02x_2^2 + 0,04x_1x_2 \quad (8)$$

$$Rf (\text{PEG1500/citrato/real}) = \mathbf{1,37} + \mathbf{0,14x_1} - \mathbf{0,27x_2} - 0,01x_1^2 + \mathbf{0,06x_2^2} + 0,03x_1x_2 \quad (9)$$

$$Rf (\text{PEG4000/citrato/real}) = \mathbf{1,21} + \mathbf{0,16x_1} - \mathbf{0,16x_2} + 0,02x_1^2 + 0,04x_2^2 - 0,03x_1x_2 \quad (10)$$

As curvas de contorno, para o K_{AP} e Rf nos sistemas com ácido propiônico puro (Figura 2), foram geradas empregando-se as Equações 7 e 8. Nas Figuras 2A e 2B, observa-se que, aumentando-se a concentração do PEG1500, acima de 21% m m⁻¹ e do citrato de sódio acima de 13,5% m m⁻¹, os coeficientes de partição do ácido propiônico são menores, concentrando-se mais na fase inferior, rica em citrato. A influência sobre a relação das fases é

semelhante, ou seja, com aumento das concentrações de PEG e de citrato, diminui-se a relação de fases, aumentando-se, portanto o volume da fase inferior, o que aumenta a recuperação dos ácidos (Figura 2B).

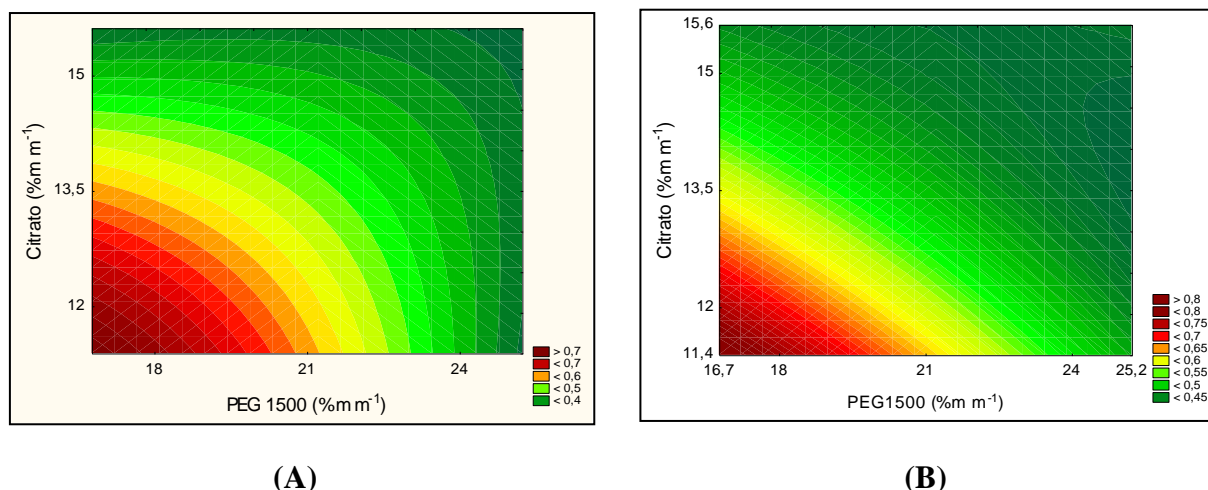


Figura 2. Curvas de contornos para coeficiente de partição do ácido propiônico (A) e relação de fases (B) para partição do ácido propiônico nos sistemas com PEG1500/Citrato (sistema modelo)

As curvas de contorno para a R_f nos sistemas reais, usando PEG1500 e PEG4000 (Figura 3), foram geradas, empregando-se as Equações 9 e 10. Nas Figuras 3A e 3B, verifica-se que a relação das fases aumenta com o aumento da concentração de PEG e com a diminuição da concentração de citrato, independentemente da massa molar do PEG. No geral, maior R_f melhora o rendimento do processo de purificação, assim, para a Figura 3, foi verificado nos valores acima de 18% do PEG1500 e abaixo de 13,5% do citrato. Para a Figura 3B, foram observados valores acima de 21% de PEG4000 e abaixo de 13,5% de citrato de sódio.

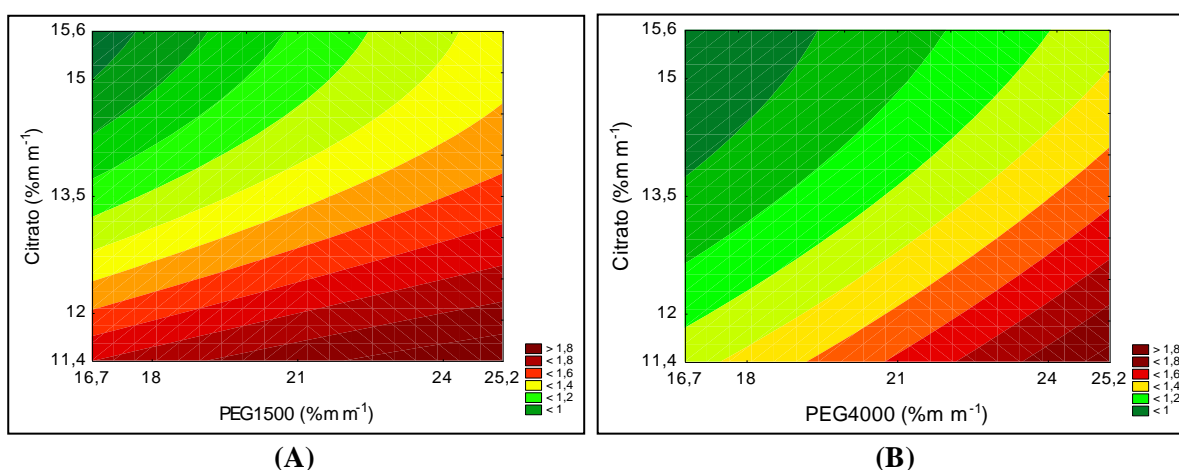


Figura 3. Curvas de contornos da relação de fases (A) e (B), nos sistemas reais, para a purificação do ácido propiônico, usando PEG1500 e PEG4000, respectivamente

Em termos de eficiência, pode ser visto, na Tabela 7, que os rendimentos de recuperação, para o ácido propiônico, foi de 68,15% no sistema PEG4000/citrato de sódio. Neste sistema, foram usadas concentrações de 24% m m⁻¹ de PEG4000 e 15% m m⁻¹ de citrato. Os resultados da cromatografia foram divergentes aos resultados dos sistemas modelos, pois, tanto no sistema PEG1500/citrato como nos sistemas PEG4000/citrato, o K_{AP} foi maior que 1, indicando que o ácido propiônico migrou para a fase superior rica em PEG e o K_{AA} menor que 1, verificado para PEG4000, mostrou que o ácido acético tem preferência pela fase salina (Tabela 7). A maior força iônica do ácido acético (pK_a do AA < pK_a do AP) pode ter contribuído, em grande escala, para deslocar o ácido propiônico para a fase superior, aumentando a capacidade da eficiência da purificação logo no primeiro estágio. Este estágio foi adequado, para a purificação primária, ou seja, remoção de resíduos celulares e outros contaminantes.

O mecanismo que rege o comportamento de particionamento de biomoléculas em SAB é complexo e não pode ser facilmente previsto [10,31]. Entretanto a massa molecular do polímero utilizado influencia a partição do produto. Quanto maior o peso molecular dos polímeros, menor é a concentração de polímero necessária para a separação de fases. À medida que a concentração do polímero aumenta, as diferenças na densidade, índice de refração e viscosidade entre as fases aumentam [34].

A caracterização do meio fermentado, quanto à variação do pH, de lactose e de produção de ácidos propiônico e acético, é apresentada na Tabela 6. A Tabela 7 mostra as concentrações dos ácidos, coeficientes de partição e rendimento na purificação dos ácidos.

Tabela 6. Caracterização do meio fermentado quanto ao pH, de lactose e de produção de ácidos

Parâmetros	pH	Lactose (g L ⁻¹)	AP (g L ⁻¹)	AA (g L ⁻¹)	AL (g L ⁻¹)
Média	5,77 ± 0,07	0,17 ± 0,02	11,47* ± 0,31	6,36* ± 0,51	0,83* ± 0,06

*- concentração determinada por cromatografia líquida.

Tabela 7. Concentração dos ácidos, nas fases topo e fundo dos sistemas reais, rendimento de extração de ácido propiônico e acético, nos dois tratamentos selecionados, para a análise por cromatografia em diferentes sistemas aquosos bifásicos

Par	16,7% m m ⁻¹ PEG 1500/ 13,5% m m ⁻¹ Citrato de sódio			24% m m ⁻¹ PEG 4000/ 15% m m ⁻¹ Citrato de sódio		
	Rf	Topo (g L ⁻¹)	Fundo (g L ⁻¹)	Rf	Topo (g L ⁻¹)	Fundo (g L ⁻¹)
AP	1,11	1,45* ± 0,06	1,00* ± 0,24	1,28	1,45* ± 0,10	0,86* ± 0,03
AA	1,11	0,90* ± 0,07	0,90* ± 0,02	1,28	0,97* ± 0,06	1,06* ± 0,24
K _{AP}		1,3 ± 0,4			1,7 ± 0,2	
K _{AA}		1,0 ± 0,1			0,9 ± 0,2	
Y _{AP} (%)		58,0 ± 1,4			68,2 ± 2,2	
Y _{AA} (%)		52,7 ± 2,5			54,4 ± 4,7	

Par- parâmetro, Rf- relação de fases, AP- ácido propiônico, AA- ácido acético, K_{AP}- coeficiente de partição do ácido propiônico purificado, K_{AA}-coeficiente de partição do ácido acético purificado, Y_{AP} (%) - rendimento da purificação do ácido propiônico, Y_{AA} (%) - rendimento da purificação do ácido acético e *- concentração determinada por cromatografia líquida.

De acordo com [18], os processos industriais com SAB podem representar uma alternativa à cromatografia de afinidade ou à cromatografia tradicional, a fim de reduzir os custos operacionais e facilitar a intensificação do processo. Considerando-se a biocompatibilidade, a grande disponibilidade no mercado e a baixa toxicidade dos polímeros tornam os SAB atraentes. Segundo [27], os SAB são uma alternativa ecologicamente correta aos sistemas líquidos-líquidos convencionais feitos de solventes orgânicos.

[36] afirmam que a massa molar do polímero tem um impacto na partição do produto, uma vez que os deslocamentos de volume são vistos em polímeros de alta massa molar. Além disso, [18] mostraram que a concentração de polímero também pode aumentar os rendimentos de recuperação e purificação nos SAB. Níveis apropriados, porém devem ser estudados, dado que a alta concentração de polímero pode gerar problemas de impedimento estérico entre as moléculas-alvo. [29] verificaram que concentrações crescentes de PEG/fosfato, em um sistema de extração, geram um incremento de miscibilidade entre os constituintes do sistema. Portanto, maiores concentrações de polímero e sais são necessárias, para formar o sistema bifásico, o que favorece o comportamento de partição de moléculas-alvo em direção a uma fase particular.

4. Conclusões

Nos sistemas modelos, o ácido propiônico teve maior afinidade pela fase rica em citrato nos sistemas aquosos bifásicos do tipo PEG/Citrato de sódio. Nos sistemas reais, o ácido propiônico teve maior afinidade pela fase rica em PEG nos sistemas aquosos bifásicos do tipo PEG/Citrato de sódio. Os menores coeficientes de partição de ácido propiônico foram

obtidos nos sistemas 24% PEG e 15% citrato de sódio, tanto para PEG1500, como para PEG 4000, com valores inferiores a 0,4. Usando meio fermentado, os melhores sistemas obtidos, para a purificação dos ácidos orgânicos, com os menores coeficientes de partição (K_{AT}), foram 16,7 %m m⁻¹ PEG e 13,5% m m⁻¹ citrato, para PEG 1500 com K_{AT} igual a 0,21 com uma eficiência de 58,03% e 24% m m⁻¹ PEG e 12% m m⁻¹ citrato, 24% m m⁻¹ PEG e 15% m m⁻¹ citrato, para os sistemas com PEG4000, com valores de K_p de 0,16 e 0,15, respectivamente. Este último sistema obteve uma boa eficiência de 68,15%, logo Sistemas Aquosos Bifásicos têm potencial para ser aplicados no processo de purificação de ácido propiônico obtido por fermentação.

Bibliografia

- [1] D. Yankov, J. Molinier, J. Albet, G. Malmary, and G. Kyuchoukov, "Lactic acid extraction from aqueous solutions with tri- n -octylamine dissolved in decanol and dodecane," *Biochem. Eng. J.*, vol. 21, pp. 63–71, 2004.
- [2] F. Chen, X. Feng, H. Xu, D. Zhang, and P. Ouyang, "Propionic acid production in a plant fibrous-bed bioreactor with immobilized *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015," *J. Biotechnol.*, vol. 164, no. 2, pp. 202–210, 2012.
- [3] H. Yang, Z. Wang, M. Lin, and S. T. Yang, "Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis," *Bioresour. Technol.*, vol. 250, no. October 2017, pp. 1–9, 2018.
- [4] N. Ahmadi, K. Khosravi-Darani, and A. M. Mortazavian, "An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 28, pp. 67–75, 2017.
- [5] C. A. S. Silva, J. S. R. Coimbra, E. E. G. Rojas, and J. A. C. Teixeira, "Partitioning of glycomacropeptide in aqueous two-phase systems," *Process Biochem.*, vol. 44, pp. 1213–1216, 2009.
- [6] J. A. Asenjo and B. A. Andrews, "Aqueous two-phase systems for protein separation : Phase separation and applications," *J. Chromatogr. A*, vol. 1238, no. September 2011, pp. 1–10, 2012.
- [7] N. Patel, D. G. Bracewell, and E. Sorensen, "Dynamic modelling of aqueous two-phase systems to quantify the impact of bioprocess design , operation and variability," *Food Bioprod. Process.*, vol. 7, pp. 10–24, 2018.
- [8] C. A. B. DE SOUSA, "Produção e recuperação de celulases produzidas por *Trichoderma reesei* LCB 48 na fermentação semissólida da palma forrageira," in *Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia*, São Paulo, SP, 2014, p. 139.
- [9] A. Durán, M. Claros, and Y. P. Jimenez, "Molybdate ion partition in the aqueous two-phase system formed by $\text{CuSO}_4 + \text{PEG 4000} + \text{H}_2\text{O}$ at different pH and temperatures," *J. Mol. Liq.*, vol. 249, pp. 562–572, 2018.
- [10] Ö. Aydoğan, E. Bayraktar, and Ü. Mehmetoğlu, "Aqueous two-phase extraction of

- lactic acid: Optimization by response surface methodology,” *Sep. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 7, pp. 1164–1171, 2011.
- [11] A. Glyk, T. Scheper, and S. Beutel, “PEG–salt aqueous two-phase systems: an attractive and versatile liquid–liquid extraction technology for the downstream processing of proteins and enzymes,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 99, no. 16, pp. 6599–6616, 2015.
- [12] A. Glyk, D. Solle, T. Scheper, and S. Beutel, “Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Optimization of PEG – salt aqueous two-phase systems by design of experiments,” *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 149, pp. 12–21, 2015.
- [13] A. L. Grilo, M. R. Aires-Barros, and A. M. Azevedo, “Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends,” *Sep. Purif. Rev.*, vol. 45, no. 1, pp. 68–80, 2016.
- [14] G. Khayati, “Optimization of Propionic Acid Extraction By Aqueous Two-Phase System Using Response Surface Methodology,” *Chem. Eng. Commun.*, vol. 200, no. 5, pp. 667–677, 2013.
- [15] Y. Ling, H. Nie, S. Su, C. Branford-white, and L. Zhu, “Optimization of affinity partitioning conditions of papain in aqueous two-phase system using response surface methodology,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 73, no. 3, pp. 343–348, 2010.
- [16] J. J. Malinowski, “Two-phase partitioning bioreactors in fermentation technology,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 19, no. 7, pp. 525–538, 2001.
- [17] D. Sousa, C. Martins, D. Jordana, C. Ilh, O. Reinert, R. Gandol, V. Santos, R. Cristina, F. Bonomo, and L. Ayra, “Equilibrium data and thermodynamic studies of a -amylase partition in aqueous two-phase systems,” *Fluid Phase Equilib.*, vol. 463, pp. 69–79, 2018.
- [18] I. S. B. Do Nascimento, “Partição de glutenina de farinha de trigo especial em sistemas aquosos bifásicos,” *Dissertação - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia Itapetinga/Bahia*, p. 69, 2008.
- [19] F. Ruiz-ruiz, J. Benavides, O. Aguilar, and M. Rito-palomares, “Aqueous two-phase affinity partitioning systems : Current applications and trends &,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1244, pp. 1–13, 2012.

- [20] F. Rahimpour, R. Hatti-kaul, and G. Mamo, "Response surface methodology and artificial neural network modelling of an aqueous two-phase system for purification of a recombinant alkaline active xylanase," *Process Biochem.*, vol. 51, no. 3, pp. 452–462, 2016.
- [21] K. Wang, Z. Chang, Y. Ma, C. Lei, and S. Jin, "Fluid Phase Equilibria Equilibrium study on reactive extraction of propionic acid with N1923 in different diluents," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 278, pp. 103–108, 2009.
- [22] G. Khayati, "Optimization of Propionic Acid Extraction By Aqueous Two-Phase System Using Response Surface Methodology," *Chem. Eng. Commun.*, vol. 200, no. 5, pp. 667–677, 2013.
- [23] A. Keshav, S. Chand, and K. L. Wasewar, "Recovery of propionic acid from aqueous phase by reactive extraction using quarternary amine (Aliquat 336) in various diluents," *Chem. Eng. J.*, vol. 152, no. 1, pp. 95–102, 2009.
- [24] A. Keshav and K. L. Wasewar, "Back extraction of propionic acid from loaded organic phase," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 65, no. 9, pp. 2751–2757, 2010.
- [25] S. Yang, H. Huang, A. Tay, W. Qin, and L. De Guzman, "Chapter 16 . Extractive Fermentation for the Production of Carboxylic Acids," in *Elsevier*, Columbus, USA, 2007, pp. 421–446.
- [26] S. Y. Lee, I. Khoiroh, C. W. Ooi, T. C. Ling, and P. L. Show, "Recent Advances in Protein Extraction Using Ionic Liquid-based Aqueous Two-phase Systems," *Sep. Purif. Rev.*, vol. 46, no. 4, pp. 291–304, 2017.
- [27] A. J. Daugulis, "Two-phase partitioning bioreactors: A new technology platform for destroying xenobiotics," *Trends Biotechnol.*, vol. 19, no. 11, pp. 457–462, 2001.
- [28] G. J. Pimentel, S. Ferreira, O. Reinert, R. Gandol, L. Ayra, V. Santos, C. M. Veloso, C. Ilh, R. Cristina, and F. Bonomo, "Evaluation of salting-out effect in the liquid e liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na₂SO₄ / MgSO₄ at different temperatures," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 450, pp. 184–193, 2017.
- [29] J. F. Ferreira, "Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos," *Exacta*, vol. 7, no. 1, pp. 49–56, 2009.
- [30] M. R. Gavasane and V. G. Gaikar, "Aqueous two-phase affinity partitioning of

- penicillin acylase from *E. coli* in presence of PEG-derivatives,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 32, pp. 665–675, 2003.
- [31] A. F. Rodrigues, M. I. Iemma, *Experimental Design and Process Optimization*, CRC Press. Boca Raton (USA), 2014.
- [32] W. Horwitz and G. W. Latimer-Junior, *Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International*, 18th ed. Gaythersburg: AOAC Internacional, 2005.
- [33] I. StatSoft, “STATISTICA (data analysis software system),” in *version 8.0.*, 2008, p. www.statsoft.com.
- [34] J. A. Asenjo and B. A. Andrews, “Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 49, pp. 8826–8835, 2011.
- [35] R. M. De Oliveira, J. Sélia, L. A. Minim, L. Henrique, M. Paulo, and F. Fontes, “Liquid – Liquid Equilibria of Biphasic Systems Composed of Sodium Citrate + Polyethylene (glycol) 1500 or 4000 at Different Temperatures,” *J. Chem. Eng. Data*, vol. 53, no. 4, pp. 895–899, 2008.
- [36] J. G. Pimentel, S. F. Bicalho, O. Reinert, R. Gandolfi, L. Ayra, A. Veríssimo, S. D. S. Castro, E. A. Souza, C. M. Veloso, C. Ilhéu, V. S. Sampaio, R. Cristina, and F. Bonomo, “Evaluation of salting-out effect in the liquid–liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of 2-propanol and Na₂SO₄/MgSO₄ at different temperatures,” *Fluid Phase Equilib.*, 2017.
- [37] M. Benavides, Jorge.; Rito-Palomares, “Review Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products,” *Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 83, no. 3, pp. 133–142, 2008.