

MARCELO RODRIGUES DE MELO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM SORO DE QUEIJO POR
BACTÉRIA DO RÚMEN BOVINO**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.**

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCELO RODRIGUES DE MELO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO EM SORO DE QUEIJO POR
BACTÉRIA DO RÚMEN BOVINO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 19 de março de 2007

Prof. Flávia Maria Lopes Passos
Co-Orientadora

Prof. Frederico José Vieira Passos
Co-Orientador

Prof^ª. Míriam Teresinha dos Santos

Prof^ª. Andréa de Oliveira Barros Ribon

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
Orientador

Aos meus pais pelo amor e
amizade dedicados durante
todos estes anos

AGRADECIMENTOS

A Deus,

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela possibilidade e apoio na participação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Aos meus pais, Mário e Luzia, à minha namorada, Ana Paula, e ao meu irmão, Fernando, pelo apoio, compreensão e carinho.

Ao Prof. Hilário pela oportunidade no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, pela orientação e ensinamentos.

À Profa. Flávia e ao Prof. Frederico pela ajuda e ensinamentos.

Às Profa. Míriam e Andréa Ribon pela contribuição na banca de defesa de tese.

À todos os professores que pelos ensinamentos e convivência contribuíram para meu crescimento intelectual e pessoal.

Aos Professores Maria Catarina Megumi Kasuya, Maria Cristina Dantas Vanetti e Mauricio Dutra Costa pela oportunidade de conhecer seus laboratórios e o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

À Dra. Noemia Kazue Ishikawa pelos primeiros ensinamentos microbiológicos,

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, Aline, Ana Andréa, André, Claudinha, Fernanda, Isabela, Janaina, José Carlos, Marcelo, Rafael e alguém que por ventura eu tenha esquecido, por tudo de bom que trouxeram à minha vida.

Aos amigos dos laboratórios de Microbiologia de Alimentos, Patógenos Alimentares e Fisiologia de Microrganismos, que dariam outra tese se tivessem seus nomes escritos aqui, e que tornaram meus trabalhos mais alegres.

Aos amigos Aline, Camila, Ernane e Sérgio que mesmo a distância sempre estiveram presentes nessa caminhada alegrando e dando forças.

Enfim, à todos aqueles que de contribuíram para que estas palavras estivessem sendo escritas aqui neste momento.

MUITO OBRIGADO!!!

BIOGRAFIA

Marcelo Rodrigues de Melo, filho de Mario Rodrigues de Melo e Luzia Ignês Tonin Rodrigues, nasceu em Primeiro de Maio, Estado do Paraná, em 14 de Janeiro de 1982.

Iniciou o curso de Bacharelado em Biomedicina, na Universidade Estadual de Londrina, em Março de 2001, pelo qual graduou-se Biomédico em Fevereiro de 2005.

Iniciou em Março de 2005 o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 ÁCIDO PROPIÔNICO	3
2.2 RUMINANTES E ÁCIDO PROPIÔNICO	4
2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO PROPIÔNICO	6
2.4 FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA	7
2.4.1 Via dos Succinato	8
2.4.2 Via do Acrilato	10
2.5 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS NA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA	12
2.5.1 Soro de Queijo	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS MICRORGANISMOS E ESTOCAGEM DAS CULTURAS	15

3.2 PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE MEIO DE CULTIVO E SOLUÇÕES	16
3.3 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO PROPIÔNICO	16
3.4 SELEÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ÁCIDO PROPIÔNICO	18
3.5 EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO BACTERIANO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO	18
3.6 CULTIVO EM SORO DE QUEIJO	19
3.7 CULTIVO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LACTOSE	20
3.8 EFEITO DO PH SOBRE O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO.....	20
3.9 ANÁLISE DO CRESCIMENTO MICROBIANO E DO METABOLISMO MICROBIANO	21
3.10 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE RENDIMENTO E BIOMASSA	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO PROPIÔNICO	23
4.2 SELEÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE ÁCIDO PROPIÔNICO	23
4.3 EFEITO DO EXTRATO DE LEVEDURA E DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO PELO ISOLADO 22A	25
4.4 CULTIVO EM SORO DE QUEIJO	31
4.5 CULTIVO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LACTOSE	33
4.5.1 Cultivo em Diferentes Concentrações de Lactose sem Controle de Lactose	33
4.5.2 Cultivo em Diferentes Concentrações de Lactose com Controle de Lactose	38
4.6 EFEITO DO PH INICIAL SOBRE O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO PELO ISOLADO 22A	40
5. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE	52
APÊNDICE A	53
APÊNDICE B	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fermentação propiônica pela Via do Succinato	9
Figura 2. Fermentação propiônica pela Via do Acrilato	11
Figura 3. Efeito da concentração de extrato de levedura no crescimento (A), no consumo de lactose e produção de ácido propiônico (B) pelo isolado 22A	26
Figura 4. Efeito da concentração de extrato de levedura no rendimento de ácido propiônico pelo isolado 22A	28
Figura 5. Crescimento do isolado 22A em soro de queijo, consumo de lactose (A) e produção de ácido propiônico (B)	32
Figura 6. Crescimento do isolado 22A em diferentes concentrações de lactose, expresso na forma do logaritmo neperiano da DO_{600nm} (A) e variação do pH da cultura (B)	34
Figura 7. Efeito da concentração de lactose na produção de ácido propiônico	36
Figura 8. Crescimento do isolado 22A em diferentes pH iniciais	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características culturais dos isolados observadas durante o isolamento em meio YELA substituído e produtos da fermentação (S, succinato; L, lactato; F, formato; A, acetato; P, propionato; E, etanol) em meio basal adicionado de lactose (8 g/L) e extrato de levedura (4 g/L) após 72 h de incubação	24
Tabela 2. Parâmetros fermentativos do isolado 22A cultivado em meio basal adicionado de 2 g/L de extrato de levedura durante 48 h de incubação a 39 °C	29
Tabela 3. Crescimento do isolado 22A em meio basal adicionado de diferentes concentrações de lactose (133,16, 294,63, 519,24 e 796,56 g/L) e de extrato de levedura (2 g/L) durante 72 h de incubação a 39 °C, sem controle de pH	37
Tabela 4. Crescimento do isolado 22A em meio basal adicionado de diferentes concentrações de lactose (139,53, 338,70, 524,94 e 727,52 mM) e de extrato de levedura (2 g/L) durante 72 h de incubação a 39 °C, com controle de pH (6,8 . ± 0,2) e agitação a 150 rpm	39

RESUMO

MELO, Marcelo Rodrigues de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2007. **Produção de ácido propiônico em soro de queijo por bactéria do rúmen bovino.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Co-Orientadores: Flávia Maria Lopes Passos e Frederico José Vieira Passos.

O ácido propiônico é um ácido orgânico de três carbonos, e sua principal aplicação é como conservante de rações, grãos e alimentos. Estratégias alternativas de aplicação do ácido propiônico têm sido propostas, entre elas sua utilização na alimentação animal. Dentre as principais limitações para a produção fermentativa deste ácido orgânico estão o baixo rendimento e a baixa produtividade. Neste trabalho, foram isoladas 38 bactérias do rúmen bovino capazes de produzir ácidos orgânicos a partir da lactose do soro de queijo. Dentre estas, apenas o isolado 22A produziu ácido propiônico como principal produto da fermentação, sendo este selecionado para os experimentos posteriores. O isolado 22A apresentou-se como bacilo Gram-negativo, capaz de metabolizar diversos açúcares (glicose, lactose, maltose, sacarose, celobiose e manose), ácidos orgânicos (lactato, piruvato, malato, fumarato e succinato) e glicerol, produzindo ácido propiônico como principal produto final da fermentação. Os resultados indicaram que glicerol e succinato foram as fontes de carbono que propiciaram maior rendimento de produto e recuperação de carbono. A produção de biomassa e o rendimento de produto em meio mineral foram afetados pela concentração de extrato de levedura no meio de cultivo. Quando 2 g/L de extrato de levedura foram utilizadas, a concentração de biomassa e o rendimento de produto aumentaram cerca de 270 % e 260 %, respectivamente, em relação ao

controle sem extrato de levedura. O cultivo do isolado 22A em soro de queijo diluído (14 mM de lactose) indicou que a lactose foi completamente consumida após 16 horas de incubação e que o coeficiente de rendimento de produto para o ácido propiônico e a relação acetato/propionato foram 2,37 mol/mol e 0,51, respectivamente. Quando concentrações crescentes de lactose foram adicionadas ao meio basal sem controle de pH, observou-se a redução no rendimento de ácido propiônico e o aparecimento de outros produtos finais na fermentação. Nestas condições, o pH do meio de cultura decresceu rapidamente, atingindo valores de aproximadamente 4,3 após 24 horas de incubação, para todas as concentrações de lactose testadas. O controle do pH do meio em 6,8 pela adição de NaOH não estimulou a produção de ácido propiônico pelo isolado 22A, mas observou-se consumo de aproximadamente 80% do substrato em concentrações de até 338,70 mM. O isolado 22A cresceu em meio basal com pH inicial de 8,0 e apresentou velocidade específica de crescimento de $0,317 \text{ h}^{-1}$ e rendimento de ácido propiônico de 2,01 mol/mol. Esses resultados foram superiores aos obtidos com o isolado 22A quando cultivado em pH 7,0. Os resultados deste trabalho indicam que o isolado 22A possui potencial para produção de ácido propiônico em soro de queijo. Entretanto, outros estudos deverão ser realizados para a adequação do sistema de cultivo e a otimização do rendimento de produto.

ABSTRACT

MELO, Marcelo Rodrigues de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2007.

Propionic acid production in cheese whey by ruminal bacteria. Adviser: Hilario Cuquetto Mantovani. Co-advisers: Flávia Maria Lopes Passos and Frederico José Vieira Passos.

Propionic acid is an organic acid of three carbons that has been mainly used to preserve rations, grains and foods. Alternative strategies for application of propionic acid have been proposed, including their utilization in animal feeds. In this work, 38 bacteria were isolated from the bovine rumen and showed to produce organic acids using lactose from cheese whey. Only six isolates produced propionic acid, and the isolate named 22A showed the highest propionic acid production, and was selected for further study. The isolate 22A was a Gram-negative rod that utilized several carbon sources, including carbohydrates (glucose, lactose, maltose, saccharose, cellobiose and mannose), organic acids (lactate, piruvate, malate, fumarate and succinate) and glycerol. Regardless of the carbon source used, propionic acid was always the major fermentation end-product. Our results indicated that glycerol and succinate were the carbon sources that provided highest product yield and carbon recovery. Biomass production and product yield in mineral media were both affected by yeast extract concentration. When yeast extract (2 g/L) was added to the culture medium, the concentration of biomass and product formation increased about 270 % and 260 % respectively, compared to control treatments without yeast extract. The cultivation of the isolate 22A in diluted cheese whey (14 mM lactose) showed that the carbon source was being completely consumed after 16

hours of incubation and that the propionic acid yield and the acetate:propionate ratio were 2,37 mol/mol and 0,51, respectively. When increasing concentrations of lactose were added to the basal medium without pH control, a decrease in propionic acid yield and the appearance of other end-products was observed. Under these conditions, the pH of the culture medium decreased rapidly, reaching values of approximately 4,3 after 24 hours of incubation, for all the lactose concentrations tested. The control of pH in 6,8 using NaOH did not stimulate the production of propionic acid by isolate 22A, but lactose consumption increased to approximately 80 % in concentrations up to 338,70 mM. When isolate 22A was cultivated in basal medium with initial pH of 8,0 the specific growth rate and yield of propionic acid were $0,317 \text{ h}^{-1}$ and 2,01 mol/mol, respectively. These results were better than those obtained at pH 7,0. These results indicated that isolated 22A has potential for propionic acid production in cheese whey. However, further work is needed to improve the cultivation system and to optimize the propionic acid yield.

1. INTRODUÇÃO

O ácido propiônico é um importante ácido orgânico utilizado por vários segmentos da indústria química, para a produção de plásticos e herbicidas, e no mercado de produtos alimentícios, como conservante. Além das atuais aplicações do ácido propiônico, novas estratégias para uso deste composto têm sido estudadas, como sua administração na alimentação animal. Além disso, o aumento do interesse por tecnologias alternativas e ambientalmente limpas e a valorização de tecnologias que visem à utilização de subprodutos da agroindústria têm estimulado estudos da produção de ácido propiônico a partir de vias fermentativas.

A produção de ácido propiônico por meio de processos fermentativos tem enfatizado a utilização de bactérias do gênero *Propionibacterium*. Contudo, o rúmen apresenta diferentes bactérias produtoras de ácido propiônico que podem ser estudadas para a produção fermentativa de ácido propiônico. Em ruminantes o ácido propiônico atua como uma das principais fontes de energia, uma vez que é o principal ácido orgânico absorvido como substrato para a gliconeogênese hepática do animal. Além disso, com a proibição da União Européia à utilização de antibióticos promotores do crescimento em animais de produção, existe a possibilidade de utilização do ácido propiônico como alternativa para a manipulação da fermentação ruminal.

Suplementos energéticos e protéicos à base de ácido propiônico, ou fermentados contendo biomassa microbiana e ácido propiônico tem sido estudado para aplicação em ruminantes. Além disso, a utilização de substratos abundantes e de baixo custo para a fermentação propiônica, como resíduos agroindustriais, pode

reduzir os custos de produção do suplemento, além de representar uma forma ecologicamente correta para obtenção do ácido propiônico.

Desta forma, o ácido propiônico produzido por bactérias isoladas do rúmen e utilizado como suplemento energético para ruminantes pode dispensar a purificação (extração e separação) do ácido propiônico, que responde por 60 a 70 % dos custos de produção, utilizando o microrganismo como fonte de proteína para o animal. Em face do exposto, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias do rúmen bovino capazes de utilizar a lactose do soro de queijo como substrato para a produção de ácido propiônico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÁCIDO PROPIÔNICO

O ácido propiônico, também chamado de ácido propanóico ou ácido etanocarboxílico, é um ácido orgânico com fórmula molecular $C_3H_6O_2$, incolor, oleoso, levemente ácido-picante e com forte odor (THE MERCK INDEX, 1989). Sua importância deve-se principalmente à sua utilização em diversos segmentos das indústrias químicas e de alimentos.

Dentre as principais aplicações do ácido propiônico, está a sua utilização como conservante de alimentos e rações, devido principalmente à atividade antimicrobiana contra fungos e outros microrganismos. O ácido propiônico é um ácido orgânico fraco e que exerce atividade antimicrobiana através de alterações do gradiente de pH da membrana. Moléculas de ácido propiônico não dissociadas são capazes de atravessar a membrana plasmática e dissociarem-se no citosol, onde o pH é mais alcalino que no ambiente extracelular. Para manutenção da homeostasia celular, H^+ -ATPase transportam ativamente prótons para fora da célula, levando a diminuição da energia disponível para as demais atividades metabólicas (PÉREZ-CHAIA *et al.*, 1994; GU *et al.* 1998; BEALES, 2004). Os sais de ácido propiônico, como propionato de amônio, são utilizados para conservar rações animais e grãos, e os sais de propionato de cálcio ou de sódio são utilizados como conservantes de alimentos como queijos e pães, respondendo por 45 % e 21 % respectivamente, do mercado de ácido propiônico (SUWANNAKHAM, 2005).

Outras importantes aplicações para o ácido propiônico são a produção de herbicidas, que responde por 19 % do mercado de ácido propiônico, e a produção de plásticos como o propionato de acetato de celulose (CAP), que é responsável por 11 % do consumo deste ácido orgânico. Os 4 % restantes do mercado de ácido propiônico estão divididos entre a produção de perfumes e aromas de frutas (geranil e citronelil propionato), plastificantes (glicerol tripropionato e fenil propionato), medicamentos veterinários para o tratamento dermatoses, infecções, conjuntivite e artrite (BOYAVAL e CORRE, 1995; SUWANNAKHAM, 2005).

Além das atuais aplicações para o ácido propiônico, novas utilidades vêm sendo encontradas para este ácido, como a produção de solventes não poluentes ao ar (non-HPAs), obtidos a partir da esterificação do ácido propiônico, estes solventes podem substituir tipos poluidores como xilenos e certas cetonas (BOYAVAL e CORRE, 1995). A suplementação de dietas para ruminantes é outra potencial alternativa para o ácido propiônico, visto que estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado efeitos benéficos ao ruminante, como aumento da digestibilidade de forragens por microrganismos ruminais e aumento do rendimento de leite, respectivamente (RIGOUT *et al.*, 2003; XAVIER, 2004).

Atualmente, a produção mundial de ácido propiônico é de aproximadamente 200.000 toneladas/ano, produzidas através de modificações químicas de derivados de petróleo e sendo comercializado ao preço de U.S.\$ 1,12 – 1,80/Kg (SUWANNAKHAM, 2005). Embora a produção de ácido propiônico por via petroquímica seja economicamente viável, a instabilidade do preço do petróleo, a exigência crescente com o uso de tecnologias ambientalmente limpas, o uso de fontes renováveis, e a busca por produtos naturais têm aumentado o interesse pela produção de ácido propiônico por vias fermentativas (YANG *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 2002).

2.2 RUMINANTES E ÁCIDO PROPIÔNICO

O ácido propiônico é uma das principais fontes de energia para os ruminantes. Esses animais apresentam estômago composto por quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso. Destes compartimentos, o rúmen é o maior, sendo o local onde a maior parte do alimento ingerido é

metabolizado através da associação simbiótica com microrganismos anaeróbios. Os microrganismos anaeróbios são responsáveis pela degradação do alimento, produzindo acetato, propionato, butirato, dióxido de carbono, amônia, metano e calor, principalmente, e pela produção de biomassa microbiana (HUNGATE, 1966; RUSSELL e RYCHLIK, 2001). Apesar dos carboidratos perfazerem a maior parte da dieta dos ruminantes, apenas pequena quantidade de açúcares são absorvidos pelo trato gastrointestinal (ANNISON e LEWIS, 1959). Parte dos ácidos orgânicos voláteis (acetato, propionato e butirato) é absorvida pelo epitélio ruminal, e atuam como as principais fontes de energia para o ruminante (ANNISON e LEWIS, 1959).

A maioria do butirato absorvido é convertido pelo epitélio ruminal a β -hidroxibutirato, um corpo cetônico que pode atuar como fonte de energia em vários tecidos do corpo. Por outro lado, a maior parte do acetato e do propionato absorvidos pela parede ruminal alcançam a corrente sanguínea e são transportados até o fígado, onde o propionato pode ser utilizado no metabolismo oxidativo de hepatócitos ou ser convertido a glicose (ALLEN *et al.*, 2005). Como a maior parte dos carboidratos ingeridos pelo ruminante é fermentada no rúmen, a gliconeogênese hepática a partir do ácido propiônico torna-se a principal fonte de glicose disponível para o animal (ANNISON e LEWIS, 1959). Em animais em lactação, por exemplo, na deficiência de ácido propiônico o metabolismo animal mobiliza outras fontes de energia corporais, levando a perda de peso e diminuição da quantidade de lactose no leite (MORAN, 2005).

Apesar das especializações digestivas dos ruminantes, que permitem que se alimentem de polissacarídeos estruturais de plantas, altos níveis de produtividade animal não podem ser mantidos apenas por forrageiras (RUSSELL e RYCHLIK, 2001). Isto porque as forrageiras apresentam limitações no seu valor energético devido as suas células serem ricas em lignina, sílica e cutina, que limitam a fermentação dos carboidratos estruturais. Além disso, forragens apresentam baixos níveis de proteínas e minerais, e sua lenta digestão e prolongado tempo de retenção podem limitar a ingestão (BELLO e ESCOBAR, 1997). Desta forma, alternativas para maximizar a produtividade animal têm sido buscadas, como a adição de ácido propiônico à dieta (RIGOUT *et al.*, 2003; XAVIER, 2004).

Experimentos *in vivo* utilizando infusão intravenosa de ácido propiônico apresentaram aumento na concentração de glicose sanguínea dos animais

(RUTTER *et al.*, 1983; SANO *et al.*, 1993), o mesmo acontecendo em experimentos utilizando infusão intraruminal de ácido propiônico (OBA e ALLEN, 2003; RIGOUT *et al.*, 2003). Estudos *in vitro* realizados por Xavier (2004) utilizando soro de queijo fermentado contendo ácido propiônico apresentaram aumento na concentração total de ácidos orgânicos voláteis, diminuição da relação acetato/propionato e aumento da digestibilidade *in vitro* de forragens por microrganismos ruminais, parâmetros estes que demonstram, em resumo, um aumento na quantidade de energia potencialmente disponível ao animal. Além disso, segundo a lista de aditivos alimentares da União Européia, os ácidos orgânicos se enquadram no grupo dos conservantes com uso permitido para todos os animais de produção comercial. Ao contrário, outras substâncias utilizadas para manipulação da fermentação ruminal, como os ionóforos tiveram seu uso proibido pela União Européia a partir de 1 de janeiro de 2006 (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2001; CASTILLO *et al.*, 2004; PRESS RELEASE, 2005).

2.3 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO PROPIÔNICO

O rúmen apresenta uma variedade de gêneros e espécies bacterianas produtoras de ácido propiônico como principal produto final do metabolismo, das quais *Prevotella*, *S. ruminantium*, *Succinomonas amilolitica*, *Megasphaera elsdenii*, *Anaerovibrio lipolitica* e *Clostridium sticklandii* são as principais (RUSSELL, 2002). Esta variedade é importante para o ruminante, uma vez que estes diferentes microrganismos ocupam nichos alimentares diferentes. Desta forma, diferentes alimentos e produtos da sua quebra por outros microrganismos do rúmen podem ser utilizados para produção de ácido propiônico, dentre eles, açúcares, amido, hemicelulose, pectina, maltodextrinas, peptídeos, aminoácidos, glicerol e lactato (RUSSELL, 2002).

A produção de ácido propiônico não está circunscrita às bactérias ruminais. Outras bactérias anaeróbias também são capazes de produzir este ácido como principal produto final do metabolismo. Dentre os gêneros mais importantes estão *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Clostridium* e *Selenomonas* (SESHADRI e MUKHOPADHYAY, 1993; BOYAVAL *et al.*, 1994). Algumas espécies de *Propionibacterium* têm sido as mais amplamente utilizadas nos estudos de produção

fermentativa de ácido propiônico, em parte devido às restrições fisiológicas para o metabolismo de certos substratos apresentadas por bactérias dos gêneros *Veillonella* e *Clostridium*, incapazes de utilizar açúcares (HSU e YANG, 1991; WOSKOW e GLATZ, 1991; LEWIS e YANG, 1992a,b,c; PAIK e GLATZ, 1994). Além disso, algumas espécies de *Propionibacterium* são reconhecidas como GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (United States Food and Drug Administration) e são utilizadas na produção de queijo suíço (HETTINGA e REINBOLD, 1972; LANGSRUD e REINBOLD, 1973) e probióticos (MANTERE-ALHONEN, 1987; JAN *et al.*, 2001).

Limitações impostas devido a restrições fisiológicas para o metabolismo de certos substratos podem ser superadas através do co-cultivo de duas espécies de bactérias. Neste caso, uma das espécies converte o substrato inicial em um produto utilizável pelo segundo microrganismo. Através desta estratégia e utilizando bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Veillonella* isoladas do rúmen bovino, Xavier (2004) produziu ácido propiônico a partir de soro de queijo, sendo a bactéria do gênero *Enterococcus* responsável pelo consumo da lactose e produção de lactato, o qual é metabolizado pela bactéria do gênero *Veillonella* em ácido propiônico. Contudo, a utilização de co-culturas pode trazer algumas desvantagens como o consumo de nutrientes essenciais à cultura de menor velocidade específica de crescimento, pela bactéria de maior velocidade específica de crescimento, além de poder ocasionar a inibição entre as culturas por produtos de seus metabolismos e maior trabalho necessário, em geral, com co-culturas. Assim, tem-se optado pela utilização de um único microrganismo capaz de realizar a conversão do substrato até o produto final. (JAIN *et al.*, 1991).

2.4 FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA

A produção de ácido propiônico como resultado do metabolismo microbiano foi inicialmente descrita por Strecker em 1854, e também por Pasteur em 1879. Em ambos, a observação foi feita a partir de culturas mistas, não sendo possível obter informações precisas sobre a fermentação propiônica. Entre 1878 e 1880, Fitz realizou vários trabalhos sobre fermentação microbiana e foi o primeiro a propor um modelo estequiométrico para a fermentação propiônica. Após Fitz, pouca

atenção foi dada à fermentação propiônica, até se descobrir o papel do ácido propiônico como um dos principais produtos envolvidos na cura de certos tipos de queijo, como o queijo suíço (SHERMAN e SHAW, 1923) Desde então, vários trabalhos vêm sendo realizados visando elucidar o metabolismo e a produção de ácido propiônico.

A fermentação propiônica pode ocorrer por meio de duas vias metabólicas distintas: a Via do acrilato ou a Via do succinato, também chamada de Via da Metilmalonil-CoA. As duas vias diferenciam-se tanto em relação aos intermediários formados, quanto em relação à quantidade de energia derivada de cada via. Porém em ambos o balanço teórico de produtos formados é o mesmo, sendo de dois mol de propionato por mol de acetato quando se utilizam substratos como lactato ou carboidratos metabolizados pela via de Embden-Meyerhof-Parnas. Consequentemente, o mesmo rendimento teórico de ácido propiônico (mol de ácido propiônico/mol de substrato) é obtido através das duas vias quando se utilizam os mesmos substratos, como lactato (0,66 mol/mol), glicose (1,33 mol/mol) ou lactose (2,66 mol/mol).

2.4.1 Via do Succinato

A Via do succinato foi a primeira via microbiana de produção de ácido propiônico a ser conhecida e se caracteriza pela formação de intermediários de quatro carbonos (WOOD, 1946) e pela utilização de sistemas enzimáticos que possibilitam o acoplamento do fluxo de elétrons à formação de potencial de membrana (HEDERSTEDT, 1999). Como consequência da formação de intermediários de quatro carbonos, dois deles simétricos (fumarato e succinato) e que podem ser descarboxilados em ambas as extremidades, culturas bacterianas incubadas com lactato ou glicose marcados no segundo carbono apresentam distribuição randômica das marcas radioativas, que se distribuem entre o primeiro e o segundo carbono do ácido propiônico (Figura 1) (COUNOTTE *et al.*, 1981; WOOD, 1981). Esta via é utilizada por bactérias do gênero *Propionibacterium*, e a entrada os substratos na via ocorre pela carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP) ou do piruvato (Figura 1), pela ação da PEP carboxilase ou da oxaloacetato transcarboxilase (5), respectivamente (DEBORDE *et al.*, 1999).

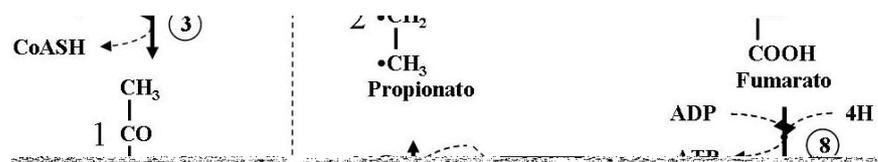
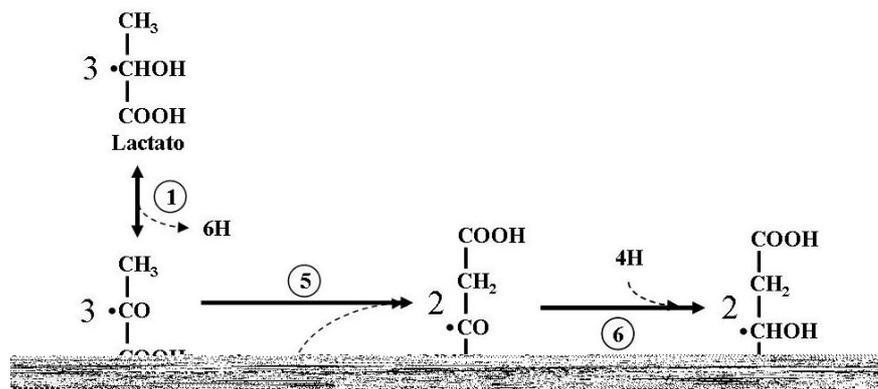


Figura 1. Fermentação propiônica pela Via do succinato. Os números dentro dos círculos referem-se as seguintes enzimas: 1. Lactato desidrogenase; 2. Piruvato ferridoxina oxidoreductase; 3. Fosfotransacetilase; 4. Acetato quinase; 5. Oxaloacetato transcarboxilase; 6. Malato desidrogenase; 7. Fumarase; 8. Fumarato redutase; 9. CoA transferase; 10. Metilmalonil-CoA mutase. O número à esquerda da estrutura de cada composto refere-se à estequiometria da reação e •C indica carbono marcado com ^{14}C .

O produto das carboxilações acima é o oxaloacetato, que por ação da enzima malato desidrogenase (6) é convertido à malato e consome dois equivalentes redutores (H). Através de uma reação de desidratação catalisada pela enzima fumarase (7), o malato é convertido em fumarato. A próxima reação é catalisada pela fumarato redutase (8), que reduz fumarato em succinato com consumo de mais dois equivalentes redutores (H). Esta reação é incomum em bactérias anaeróbias, pois utiliza citocromos, transporte de elétrons e a síntese de ATP por meio da formação de gradiente iônico (HEDERSTEDT, 1999; MÜLLER, 2001). Pela ação de uma CoA transferase (9) o succinato anteriormente formado recebe um grupamento CoA e em seguida é convertido a metilmalonil-CoA pela ação da enzima metilmalonil-CoA mutase (10) (MARSH e LEADLAY, 1989). Neste ponto, pela ação da oxaloacetato transcarboxilase o metilmalonil-CoA é descarboxilado, porém o CO₂ removido não é liberado, mas sim transferido para outra molécula de piruvato, e assim dispensando a célula de investir energia para sua carboxilação (RUSSELL, 2002). Para a formação do propionato, o propionil-CoA formado na reação anterior transfere o grupamento CoA para a CoA transferase que reutilizará o grupamento para ativar uma nova molécula de succinato.

Como apresentado na figura 1, as bactérias propiônicas utilizam uma via oxidativa da qual obtém equivalentes redutores e energia, esta via é paralela ao ramo redutivo do qual resulta o ácido propiônico (MÜLLER, 2001). Neste caso, o piruvato é oxidado até acetil-CoA pela ação da enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (2), com liberação de dois equivalentes redutores (H). Pela ação da enzima fosfotransacetilase (3) acetil-CoA é convertido a acetil fosfato, que pela ação da enzima acetato quinase (4) é convertido em acetato além da geração de ATP (WOOD, 1981).

2.4.2 Via do Acrilato

A Via do acrilato é a rota metabólica de produção de ácido propiônico utilizada por microrganismos como *Megasphaera elsdenii* e *Clostridium propionicum*. A principal característica desta via é a redução direta do piruvato, sem necessidade de carboxilação de intermediários (LEAVER *et al.*, 1955). Assim como

a Via do succinato, esta via possui um ramo redutivo que leva a formação do propionato e um ramo oxidativo que leva a formação de acetato (Figura 2).

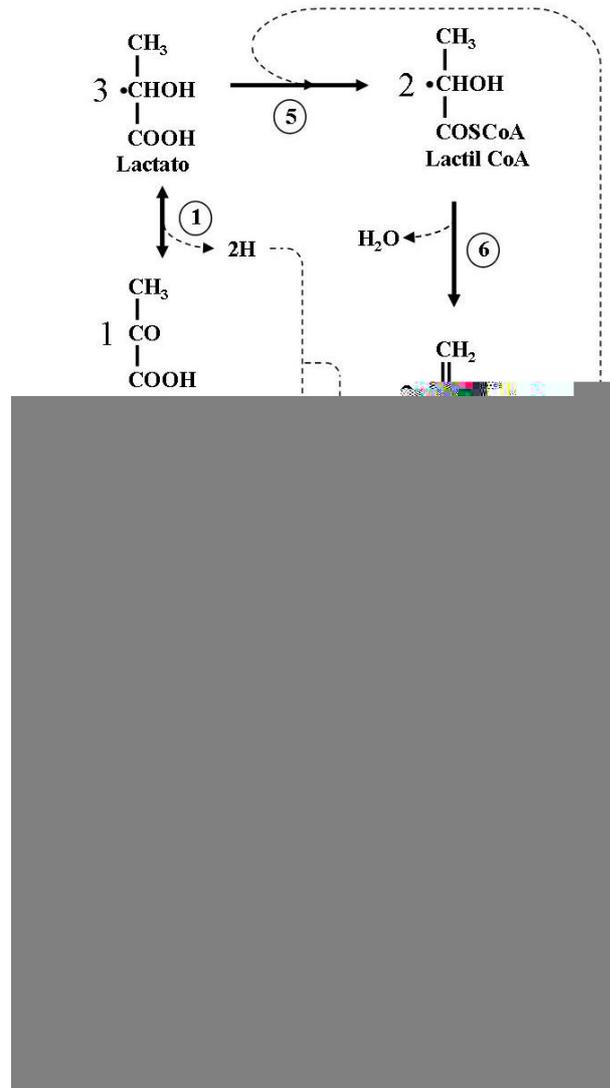


Figura 2. Fermentação propiônica pela Via do acrilato. Os números dentro dos círculos referem-se as seguintes enzimas: 1. Lactato desidrogenase; 2. Piruvato ferridoxina oxidoreductase; 3. Fosfotransacetilase; 4. Acetato quinase; 5. Propionato-CoA transferase; 6. Lactil-CoA desidratase; 7. Acrilil-CoA redutase. O número à esquerda da estrutura de cada composto refere-se à estequiometria da reação e •C indica carbono marcado com ^{14}C .

O ramo redutivo da Via do acrilato inicia-se pela redução do piruvato à lactato, com o consumo de dois equivalentes redutores (H) e catalisada pela enzima lactato desidrogenase (1), seguida pela ativação do lactato pela enzima

propionato-CoA transferase (5) formando lactil-CoA. A desidratação do lactil-CoA pela enzima lactil-CoA desidratase leva a formação do acrilil-CoA, cujo nome do seu ácido dá o nome a via, que será reduzido a propionil-CoA pela enzima acrilil-CoA redutase. Por fim, a enzima propionato-CoA transferase retira o grupamento CoA do propionil-CoA, transferindo-o para uma nova molécula de lactato e liberando o propionato (HETZEL *et al.*, 2003).

Neste caso, o balanço da fermentação é semelhante ao observado na Via do succinato, na qual, para cada três moléculas de piruvato formadas, duas devem ser direcionadas a formação de propionato e uma para a formação de acetato. Uma das diferenças entre as duas vias está na quantidade de energia que o microrganismo pode obter pela utilização de cada uma, já que a Via do acrilato não apresenta fumarato redutase, o que resulta em um menor rendimento de energia por esta via (HEDERSTEDT, 1999). Outra diferença característica entre as duas vias de fermentação propiônica é a distribuição constante de marcas radioativas no ácido propiônico na via do ácido propiônico, as quais aparecem sempre no segundo carbono do propionato quando o substrato das culturas são lactato ou glicose marcada no segundo carbono. Esta distribuição não-randômica se deve a redução direta dos substratos, sem a necessidade da formação de compostos de quatro carbonos simétricos (Figura 2) (COUNOTTE *et al.*, 1981).

2.5 UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS NA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA

Vários resíduos têm sido testados para a produção fermentativa de ácidos orgânicos, incluindo o ácido propiônico. Em geral, a produção por vias fermentativas são ambientalmente limpas e podem ser alimentadas com fontes renováveis e baratas, como os resíduos agroindustriais (HUANG *et al.*, 2002; YANG *et al.*; 1992), diminuindo assim a disposição de resíduos e o gasto com o tratamento de efluentes. Os resíduos agroindustriais são compostos principalmente por biomassa, gorduras, óleos, soro e glicerol (WILKE e VORLOP, 2004). Dentre os principais resíduos testados na produção fermentativa de ácido propiônico estão o soro de queijo, a água de maceração de milho (PAIK e GLATZ, 1994), a xilose obtida de biomassa de plantas (RAMSAY *et al.*, 1998) e o glicerol (BARBIRATO *et al.*, 1997; HIMMI *et al.*, 2000).

Em 2004, o U. S. Department of Energy/Efficiency and Renewable Energy (EERE) publicou um estudo estratégico sobre os compostos passíveis de produção utilizando resíduos, e o ácido propiônico foi selecionado entre os trinta compostos com maior potencial. Contudo, a produção de ácido propiônico por via fermentativa ainda não é comercialmente competitiva, uma vez que, em geral, apresenta baixa concentração de produto ($< 40 \text{ g/L}$), baixo rendimento ($< 0,5 \text{ g/g}$), baixa produtividade ($< 1 \text{ g/L.h}^{-1}$) além de alto custo de separação e purificação do ácido, que respondem por aproximadamente 60 % do custo final do produto (JIN e YANG, 1998; ZEIKUS *et al.*, 1999). Contudo, alternativas de utilização de ácido propiônico como a proposta por Xavier (2004), na qual o propionato produzido durante a fermentação a partir do soro de queijo é utilizada como suplemento energético de ruminantes, e a biomassa gerada como suplemento protéico, podem viabilizar a aplicação de ácido propiônico em áreas como a pecuária.

2.5.1 Soro de Queijo

O soro representa a porção aquosa que se separa do coágulo durante a produção do queijo e contém por volta de 55 % dos nutrientes do leite. Dentre os nutrientes mais abundantes estão a lactose (4,5 a 5 %, p/v), proteínas solúveis (0,6 a 0,8 %, p/v), lipídeos (0,4 a 0,5 %, m/v), sais minerais 8 a 10 % do extrato seco, ácido láctico (0,05 %, p/v), ácido cítrico e vitaminas do grupo B (KOSIKOWSKI, 1979; SISO, 1996). Contudo, este alto conteúdo de matéria orgânica, principalmente lactose, torna sua disposição um grande problema ambiental devido à alta demanda biológica de oxigênio, em torno de 40.000 mg/L (REDDY *et al.*, 1976; SISO, 1996).

Outra dificuldade encontrada na disposição ou reutilização do soro de queijo é o grande volume gerado, com previsão de 4,455 milhões de litros em 2006 no Brasil (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2007). Além disso, se estocado in natura, o soro sofre rápida deterioração microbiana (REDDY *et al.*, 1976). Alternativas para a utilização deste subproduto da manufatura do queijo têm sido propostas, como a utilização na alimentação animal (ANDERSON, 1975; KOSIKOWSKI, 1979; YANG e SILVA, 1995). Contudo, problemas como a redução no ganho de peso e diminuição do pH ruminal podem restringir sua utilização *in*

natura (WEIJERS e VAN DE KAMER, 1965). Desta forma, a fermentação do soro de queijo e a geração de produtos com maior valor nutricional, contendo fontes de proteínas e/ou energia, como o ácido propiônico, torna-se uma alternativa interessante para a utilização do soro de queijo e também para a fermentação propiônica (REDDY *et al.*, 1976; SAMUELOV *et al.*, 1999; XAVIER, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia e no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, no Núcleo de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa.

3.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO DOS MICRORGANISMOS E ESTOCAGEM DAS CULTURAS

Para o isolamento das culturas bacterianas produtoras de ácido propiônico foram utilizados os meios de cultura YEL (*Yeast Extract Lactate*), composto de (por litro): 10 g de triptona de caseína, 10 g de extrato de levedura, 20 mL de lactato de sódio 50 %, 50 mg de $MnSO_4$ e 250 mg de K_2HPO_4 , com pH ajustado para 6,8 com NaOH 1,0 M (DE CARVALHO, 1994); YELA (*Yeast Extract Lactate Ágar*), de mesma composição do meio YEL, adicionado de 15 g de ágar e de púrpura de bromocresol (0,5 g/L); e YEL e YELA substituídos de lactato de sódio por lactose na concentração de 10 g/L, chamados a seguir de YEL e YELA substituídos. Os meios foram levados após sua preparação para câmara de anaerobiose (COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA) onde foram assepticamente distribuídos (20 mL) em placas de Petri e mantidos sob atmosfera de $CO_2:H_2$ (95:5 %) a 39 °C.

As culturas isoladas foram estocadas (alíquotas de 4 mL) a -20 °C em meio contendo glicerol, composto de (por litro): 292 mg de K_2HPO_4 , 240 mg de

KH_2PO_4 , 480 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 480 mg de NaCl, 100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 64 mg de CaCl_2 , 600 mg de hidrocloreto de cisteína, 460 mg de glicerol e 480 mL de água destilada (TEATHER, 1982). O meio de estocagem foi distribuído (3 mL) em frascos anaeróbios de estocagem de 10 mL.

O isolado selecionado como o melhor produtor de ácido propiônico foi rotineiramente cultivado em meio basal, composto (por litro) de: 292 mg de K_2HPO_4 , 240 mg de KH_2PO_4 , 480 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 480 mg de NaCl, 100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 64 mg de CaCl_2 , 600 mg de cisteína, 500 mg de extrato de levedura, 1 g de triptona de caseína e 4 g de Na_2CO_3 . O pH dos meios foram ajustados para 6,8 com NaOH a 1,0 M. Para o cultivo, o meio basal foi adicionado de lactato de sódio ou lactose para concentração final de 4 g/L, exceto quando citado diferente, sendo as respectivas soluções estoque preparadas separadamente e na concentração de 200 g/L.

3.2 PREPARO E ESTERILIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA E SOLUÇÕES

Todos os meios e soluções utilizados neste trabalho foram preparados anaerobiamente, a menos que descrito diferente. Os meios e soluções foram preparados separadamente, aquecidos até a temperatura de ebulição, e mantidos sob atmosfera de CO_2 durante as transferências para os respectivos frascos ou tubos. Os frascos ou tubos foram vedados com rolhas de borracha, lacrados com lacres de alumínio e esterilizados por calor úmido (121 °C, 15 min), exceto no experimento com diferentes concentrações de lactose e com controle de pH, cujo frasco não é lacrado como descrito acima.

3.3 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÁCIDO PROPIONICO

O isolamento de microrganismos produtores de ácido propiônico foi realizado a partir de líquido ruminal coletado de uma bovina fêmea, da raça mestiça. O animal foi mantido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite/UEPE-GL do Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal de Viçosa, e foi alimentado duas vezes ao dia, durante quatro meses, com silagem de milho adicionada de 1 litro de soro de queijo fermentado por uma co-cultura de

Enterococcus sp. e *Veillonella* sp. isolados do rúmen de bovinos (XAVIER, 2004). A digesta ruminal foi coletada por meio de uma sonda (2 cm de diâmetro) introduzida pela boca do animal até alcançar o rúmen, sendo a digesta succionada com a ajuda de uma bomba de vácuo. A digesta ruminal foi filtrada através de quatro camadas de gaze e acondicionada em uma garrafa térmica hermeticamente fechada.

Após o transporte até o Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios, a garrafa térmica foi mantida em repouso por 45 minutos, fazendo com que as partículas de alimento flutuassem para a parte superior do líquido ruminal, enquanto os protozoários sedimentaram para a parte inferior do líquido ruminal. Duas amostras (40 mL cada amostra) foram coletadas anaerobiamente do centro da líquido ruminal contido na garrafa térmica e foram transferidas para dois frascos anaeróbios, onde foram adicionadas de lactato de sódio (10 g/L, concentração final) para enriquecimento das bactérias utilizadoras de lactato. Os frascos foram incubados por 24 horas a 39 °C, e alíquotas de 1 mL foram transferidas para novos frascos anaeróbios contendo meio YEL (9 mL) que foram incubados nas mesmas condições.

O enriquecimento das populações de bactérias utilizadoras de lactato com crescimento mais rápido, foram realizadas cinco transferências (alíquotas de 1 mL) a partir da incubação anterior, em intervalos de 12 horas entre cada transferência, utilizando frascos anaeróbios contendo 9 mL de meio YEL. Os frascos anaeróbios resultantes da última transferência foram levados para câmara de anaerobiose (COY Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA) e com auxílio de alças de repicagem estéreis, alíquotas (10 µL) das culturas foram estriadas em placas de Petri contendo 20 mL de YELA. Este meio contém púrpura de bromocresol como indicador de pH, que confere coloração violeta ao meio em $\text{pH} \geq 6,8$. Contudo, a produção de ácidos orgânicos resultante do metabolismo bacteriano diminui o pH do meio, fazendo com que o indicador de pH mude de cor ao redor da colônia conforme o pH se altera entre 6,8 (violeta) e 5,2 (amarelo).

Após 24 horas do plaqueamento, as colônias que apresentavam halos amarelos ao seu redor foram transferidas com auxílio de palitos de dente estéreis para tubos contendo meio YEL (4 mL). Após o crescimento das culturas nos tubos, os isolados foram novamente estriados (10 µL) em placas de Petri contendo meio YELA substituído (20 mL). O crescimento bacteriano e a conseqüente formação de colônias foram monitorados durante 48 horas após o plaqueamento,

sendo as características morfológicas e culturais das colônias registradas. Utilizando palitos de dente estéreis, as colônias foram transferidas para tubos contendo meio basal (4 mL) adicionado de lactose e extrato de levedura para as concentrações finais de 8 g/L e 4 g/L, respectivamente. As culturas que apresentaram crescimento nos tubos após 72 horas foram então transferidas (4 mL) para frascos anaeróbios contendo meio de estocagem.

3.4 SELEÇÃO DE ISOLADOS PRODUTORES DE ÁCIDO PROPIONICO

Para avaliar a produção de ácido propiônico dos isolados, cada cultura estoque foi reativada em um frasco anaeróbio contendo meio YEL (10 mL). Os frascos foram incubados a 39 °C por 48 horas e após este tempo as culturas foram transferidas para frascos anaeróbios contendo meio basal (10 mL) adicionado de lactose e extrato de levedura para as concentrações finais de 8 g/L e 4 g/L, respectivamente. Após 72 horas de incubação a 39 °C, amostras das culturas foram coletadas para análise dos produtos de fermentação e seleção do isolado de melhor produção de ácido propiônico, utilizado nos experimentos subsequentes.

3.5 EFEITO DE EXTRATO DE LEVEDURA E DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO BACTERIANO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIONICO

Para a avaliação do efeito do extrato de levedura sobre a eficiência do consumo de substrato e produção de ácido propiônico, foram utilizados tubos contendo meio basal (10 mL) adicionados de lactose (4 g/L) e extrato de leveduras nas concentrações finais de 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 12 g/L. Os tubos foram inoculados para uma densidade óptica de 0,05 e incubados a 39 °C por 48 horas. O experimento foi realizado em duplicata.

A utilização de diferentes substratos para a fermentação propiônica foi testada em tubos contendo meio basal (10 mL) adicionado dos diferentes substratos (glicose, manose, xilose, maltose, celobiose, lactose, sacarose, piruvato de sódio, lactato de sódio, succinato de sódio, ácido málico, ácido fumárico, citrato de sódio e glicerol) e de extrato de levedura para as concentrações finais de 4 g/L e 2

g/L, respectivamente. O experimento foi realizado em duplicata e as amostras foram retiradas após 48 horas de incubação a 39 °C.

3.6 CULTIVO EM SORO DE QUEIJO

Para análise do crescimento e produção de ácido propiônico em soro de queijo, foi utilizado soro de queijo em pó, parcialmente desmineralizado, da marca Conaprole (Montevideu, Uruguai), obtido pelo processo de “spray dry” e contendo 12 % (p/p, mínimo) de proteínas, 70 % (p/p, mínimo) de lactose, 2 % (p/p, máximo) de gorduras, 6 % (p/p, máximo) de sais e umidade máxima de 4 %. Devido a dificuldades técnicas para a formulação de um meio límpido a base de soro de queijo contendo altas concentrações de lactose, foi preparado um meio a base de soro de queijo contendo apenas 4 g/L de lactose, que foi preparado como descrito abaixo.

O soro de queijo foi reconstituído para a concentração de 4 g/L de lactose e adicionado de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) para a concentração final de 0,01 M. Em seguida o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH a 1,0 M. O soro foi aquecido (121 °C por 15 minutos), centrifugado (5000 rpm/10 minutos) e o sobrenadante filtrado em papel de filtro. O soro de queijo resultante deste processo apresentava-se límpido e foi anaerobiamente transferido (10 mL) para tubos sob atmosfera de CO_2 , esterilizado (121 °C por 15 minutos) e o pH foi novamente corrigido pela adição de NaOH a 4,0 M preparado anaerobiamente. O meio foi adicionado de extrato de levedura para concentração final de 2 g/L, inoculados com 1,0 % de inóculo e incubados a 39 °C por 48 h. O experimento foi realizado em duplicata e amostras para análise dos produtos de fermentação foram coletadas em intervalos de quatro horas, entre o momento da inoculação e a décima sexta hora de incubação, sendo coletadas posteriormente nos tempos de 24, 36 e 48 horas. O crescimento microbiano foi acompanhado em intervalos de 30 minutos entre o momento da inoculação e a décima segunda hora de incubação, com acompanhamentos posteriores em 16, 24, 36 e 48 horas de incubação.

3.7 CULTIVO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LACTOSE

Para avaliar o crescimento microbiano em diferentes concentrações de lactose foram realizados experimentos sem controle de pH e com controle de pH, ambos os experimentos foram realizados em duplicata e utilizaram meio basal adicionado de quatro concentrações finais de lactose, (40 g/L), (80 g/L), (160 g/L) e (240 g/L) e extrato de levedura na concentração final de 2 g/L. Nesses experimentos, o meio basal foi preparado concentrado duas vezes em relação ao descrito no item 3.7, o mesmo ocorrendo com as soluções estoque de lactose, em relação à sua concentração final no meio. O meio e as soluções estoque de lactose foram misturadas após a esterilização.

O experimento sem controle de pH foi realizado em tubos anaeróbios e amostras para análise dos produtos da fermentação foram retiradas nos tempos 0, 3, 8, 11, 24, 36, 48 e 72 horas de incubação. O crescimento microbiano foi acompanhado em intervalos de 30 minutos entre a inoculação e a décima primeira hora de incubação, sendo acompanhado em seguida nos tempos de 24, 36, 48 e 72 horas de incubação.

O experimento com controle de pH foi realizado em frascos de 500 mL de capacidade, contendo cada um 200 mL de meio de cultura. Os frascos foram mantidos sob fluxo constante de CO₂ durante todo o tempo de incubação, entre a esterilização dos meios e soluções e o fim do experimento. Após a adição da solução estoque de lactose e de extrato de levedura na concentração final de 2 g/L, os frascos foram inoculados e mantidos a 39 °C sob agitação de 150 rpm durante 72 h. O pH do meio foi controlado ($6,8 \pm 0,2$) pela adição de NaOH a 4,0 M. Amostras para análise dos produtos da fermentação foram retirados após a inoculação e ao final do experimento. O crescimento microbiano foi acompanhado em intervalos de 12 horas.

3.8 EFEITO DO pH INICIAL SOBRE O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIONICO

O efeito do pH inicial sobre o crescimento e a produção de ácido propiônico foi avaliado por meio do cultivo em meio basal contendo lactose e extrato de levedura nas concentrações finais de 40 g/L e 2 g/L, respectivamente. Os

diferentes pH iniciais, 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5 foram obtidos pela adição de HCl a 1,0 M ou NaOH a 1,0 M ao meio basal. O experimento foi realizado em duplicata e cada tubo recebeu 10 mL de meio. Os tubos foram incubados a 39 °C e amostras para análise dos produtos da fermentação foram retiradas no momento da inoculação e após 48 h. O crescimento microbiano foi acompanhado em intervalos de 30 minutos entre o momento da inoculação e 12 horas de incubação, e nos tempos de 24, 36 e 48 horas.

3.9 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DE PRODUTOS DO METABOLISMO MICROBIANO

O crescimento microbiano em meio líquido foi monitorado por meio da leitura de densidade óptica (DO) a 600 nm, utilizando-se espectrofotômetro Spectronic 20D+ (Thermo Electron, Waltham, MA, USA). As leituras de DO foram realizadas sem diluição da cultura até 0,8 unidades, sendo a partir daí diluídas para a faixa de linearidade do aparelho (0,2-0,8 unidades). A velocidade específica de crescimento (μ) foi determinada a partir da regressão linear dos valores obtidos pelo logaritmo neperiano (\ln) da DO_{600nm} durante a fase de crescimento exponencial. O valor μ corresponde ao coeficiente angular da relação do $\ln DO_{600nm}$ pelo tempo expresso na equação de regressão linear. Para correlacionar os valores obtidos em DO_{600nm} com os valores de biomassa (g/L), alíquotas de 5 mL da cultura bacteriana cultivada em meio basal contendo lactose (10 g/L) e extrato de levedura (2 g/L) foram transferidas para cadinhos de alumínio ($n = 3$) previamente tarados e secos em estufa a 105 °C até a constância entre três pesagens consecutivas, em intervalos de 12 h. A partir da relação entre a biomassa e os valores de DO_{600nm} foi obtida a equação da reta utilizada para conversão dos valores de DO_{600nm} em g/L de biomassa, sendo que 1 unidade de DO_{600nm} correspondem a 0,258 g/L de biomassa.

Para a análise dos produtos de fermentação, amostras das culturas foram retiradas e centrifugadas (10.000 rpm, 10 min), sendo o sobrenadante livre de células (20 μ L) analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Para tanto, utilizou-se um cromatógrafo Hewlett-Pacckard série 1050 acoplado a um detector de índice de refração (IR) Hewlett-Pacckard 1047A (Hewlett-Pacckard Company, Wilmington, DE, USA) mantido a 45 °C, e coluna Bio-Rad HPX-87H,

utilizada foi ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM com fluxo de 0,7 mL/min. Os padrões de ácidos orgânicos e açúcares utilizados para calibração do aparelho e comparação com os produtos de fermentação eram compostos por: Padrão de Ácidos Orgânicos (50 mM) – ácido succínico (10,3 min), ácido láctico (11,0 min), ácido fórmico (12,1 min), ácido acético (13,2 min), ácido propiônico (15,4 min), etanol (18,5 min) e ácido butírico (18,9 min); Padrão de Açúcares (10 mM) – lactose (6,5 min), glicose (7,6 min) e galactose (8,2 min); Ácido Fumárico (35,34 mM) – ácido fumárico (12,5 min). Os valores de concentração indicados à frente do nome do padrão referem-se a concentração em que cada constituinte se encontra no padrão, e os valores de tempo junto aos constituintes de cada padrão indicam seus respectivos tempos de retenção nas condições da análise.

3.10 DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE RENDIMENTO E DE BIOMASSA

Para determinar o coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/S}$ – g de células/g de substrato) foi utilizada a seguinte equação:

$$Y_{X/S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i}$$

Onde, X_f é a massa celular final (g/L), X_i a massa celular inicial (g/L), S_f concentração final de substrato (g/L) e S_i concentração inicial de substrato (g/L). De maneira semelhante foi feita a determinação do coeficiente de rendimento dos produtos ($Y_{P/S}$ – g de produto/g de substrato), a partir da seguinte equação:

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i}$$

Onde, P_f é a concentração final de produto (g/L), P_i é a concentração inicial de produto (g/L), S_f concentração final de substrato (g/L) e S_i concentração inicial de substrato (g/L). Através da equação abaixo foi obtida a produtividade volumétrica (Q_P – g de produto/L.h).

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

Onde, ΔP é a variação da concentração do produto (g/L) e Δt é variação de tempo, em horas, na qual a concentração do produto variou.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ÀCIDO PROPIÔNICO

O plaqueamento em meio YELA, das transferências do líquido ruminal, resultou, após 48 h de incubação, no aparecimento de grande diversidade de colônias, que variavam em suas características morfológicas e culturais (Tabela 1). Foram selecionadas 73 colônias isoladas que apresentavam formação de halos amarelos, indicando a produção de ácido. Após a estriagem em meio YELA substituído, observou-se o crescimento de 38 isolados no meio contendo lactose (Tabela 1). Esses isolados foram cultivados em meio basal contendo lactose como única fonte de carbono, estocados em meio contendo glicerol e posteriormente avaliados quanto à produção de ácidos orgânicos.

4.2 SELEÇÃO DE ISOLADOS PRODUTORES DE ÀCIDO PROPIÔNICO

Para seleção dos isolados produtores de ácido propiônico, amostras do sobrenadante das culturas cultivadas em meio basal por 72 h foram colhidas e analisadas para os produtos de fermentação em HPLC (Tabela 1). Dos 38 isolados, apenas seis produziram ácido propiônico a partir da lactose. Destes, o isolado 22A foi o que apresentou maior concentração de ácido propiônico e perfil fermentativo típico de bactérias do ácido propiônico, as quais produzem ácido acético e propiônico como principais produtos da fermentação.

Tabela 1. Características culturais dos isolados observadas durante o isolamento em meio YELA substituído e produtos da fermentação (S, succinato; L, lactato; F, formato; A, acetato; P, propionato; E, etanol) em meio basal adicionado de lactose (8 g/L) e extrato de levedura (4 g/L) após 72 h de incubação.

Isolado	Características Culturais				Produtos (mM)					
	Cor ^a	For. ^b	Bor. ^c	Dia. ^d	S	L	F	A	P	E
1	B	C	R	P	-	66,3	-	-	-	-
8A	C	P	I	G	-	62,1	-	-	-	-
22A	C	C	R	G	-	-	-	22,0	37,8	-
24A	O	P	I	G	6,2	13,6	41,2	18,0	-	-
26B	B	C	R	M	-	56,0	2,3	-	-	-
29A	C	C	R	G	7,0	31,2	35,8	16,8	-	-
30A	C	C	R	G	6,3	14,3	39,8	16,6	-	-
31	B	C	R	G	-	32,0	-	-	-	-
34A	C	C	R	G	6,2	14,4	40,7	15,9	-	-
35A	C	C	R	G	4,0	16,0	40,7	17,6	2,1	-
41A	C	C	R	G	1,9	48,3	27,2	5,3	-	-
43A	C	C	R	G	3,9	12,6	40,1	16,8	-	-
44	C	P	I	G	3,8	12,3	40,4	16,8	-	-
45A	C	C	R	G	5,0	14,0	38,6	16,3	-	-
45B	B	C	R	G	-	52,3	-	-	-	-
46B	B	C	R	G	-	69,8	-	-	-	-
47B	B	C	R	G	-	56,3	14,8	-	-	-
48A	C	C	I	G	-	69,0	-	-	-	-
48B	B	C	R	M	-	56,9	-	-	-	-
52	C	C	R	G	3,0	54,4	40,3	13,2	1,8	-
53	C	C	R	G	5,9	18,7	41,6	18,2	3,3	-
54	A	C	R	M	-	70,2	-	-	-	-
56	B	C	R	M	-	70,5	-	-	-	-
57A	C	C	R	G	-	69,5	-	-	-	-
57B	B	C	R	P	-	53,4	-	-	-	-
58B	B	C	R	M	-	63,9	-	-	-	-
60A	C	C	R	G	-	64,5	-	-	-	-
60B	B	C	R	M	-	54,8	-	-	-	-
61	C	C	R	G	-	-	11,7	11,3	14,2	16,5
63	C	C	R	G	3,4	26,8	24,0	11,1	0,64	-
65	B	C	R	M	-	60,4	-	-	-	-
66A	A	C	R	G	-	32,0	7,5	3,5	-	-
66C	A	C	R	G	5,9	12,6	38,9	17,2	-	-
67	C	C	R	G	6,4	17,1	22,4	7,9	-	-
69A	A	C	R	G	-	50,2	15,4	-	-	-
69B	B	C	R	M	-	66,5	-	-	-	-
70B	M	C	R	G	-	41,4	-	-	-	-
71	B	C	R	M	-	62,6	-	-	-	-

^a Coloração da colônia, A: Amarela; B: Branca; C: Creme; M: Marrom; O: Opaca

^b Forma da colônia, C: Convexa; P: Plana

^c Borda da colônia, I: Irregular; R: Regular

^d Diâmetro da colônia, P ≤ 1 mm; 1 mm < M ≤ 2 mm; G > 2 mm

Em geral, na fermentação propiônica o principal produto final da fermentação é o ácido propiônico, seguido de ácido acético e pequenas quantidades de ácido succínico, se a via metabólica utilizada pelo microrganismo for a Via do succinato, e CO₂ (WOOD e WERKMAN, 1936; WOOD, 1981). O isolado 22A, que se apresentou como bacilo Gram-negativo, produziu ácido propiônico como principal produto final da fermentação e em concentração 50 % superior àquela apresentada pelo isolado 61, que apresentou a segunda maior concentração de ácido propiônico neste isolamento (Tabela 1). Além disso, a relação acetato:propionato obtida, 1:1,71, está próxima do esperado, 1:2. Desta forma o isolado 22A foi selecionado para os experimentos seguintes.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1, observa-se também que a maioria dos isolados compartilham características culturais e produtos de fermentação comuns, com predominância do ácido láctico. Dentre os isolados que produziram ácido láctico, 28 % também produziram ácido succínico, 44 % produziram ácido fórmico e 34 % produziram ácido acético. Apenas o isolado 61 apresentou pequena quantidade de etanol entre os produtos da fermentação. Apesar do rúmen apresentar diversidade de microrganismos produtores de ácido propiônico, estes ocupam nichos ecológicos distintos dentro daquele ambiente (RUSSELL, 2002), de forma que o isolamento baseado no consumo de lactato e lactose, respectivamente, pode ter selecionado as populações bacterianas ruminais mais adaptadas a estes nichos em detrimento de microrganismos de outros nichos.

4.3 EFEITO DE EXTRATO DE LEVEDURA E DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO PELO ISOLADO 22A

A adição de extrato de levedura aumentou tanto a produção de biomassa quanto a eficiência de fermentação do isolado 22A. No primeiro caso, a adição de 2 g/L de extrato de levedura quase triplicou a produção de biomassa, e a adição de 8 g/L de extrato de levedura resultou em aumento de 4,5 vezes na produção de biomassa em relação ao tratamento sem adição de extrato de levedura (Figura 3A). A adição de extrato de levedura também aumentou a produção de ácido propiônico, principalmente até a concentração de 2 g/l, valor a partir do qual a adição de extrato de levedura teve pouco efeito sobre os produtos de fermentação (Figura 3B).

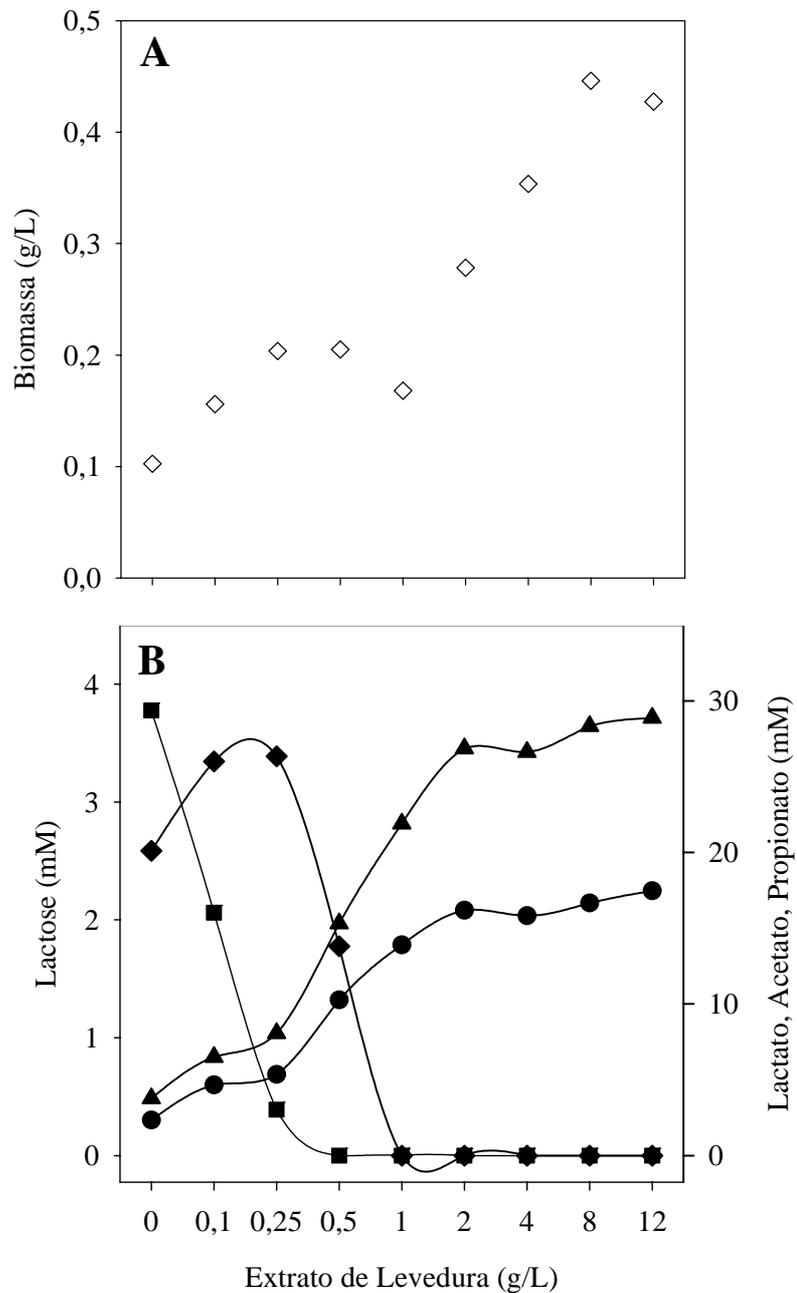


Figura 3. Efeito da concentração de extrato de levedura no crescimento (A), no consumo de lactose e na produção de ácido propiônico (B) pelo isolado 22A. O isolado 22A foi cultivado em meio basal adicionado de lactose (4 g/L) e diferentes concentrações de extrato de levedura (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12 g/L) por 48 h a 39 °C. Foram determinadas a biomassa (◇), a concentração de lactose (■), lactato (◆), acetato (●) e propionato (▲).

Além disso, pode-se observar na Figura 3B que a ausência ou concentrações de extrato de levedura a partir de 0,5 g/L afetam também a eficiência de consumo do substrato e de intermediários como o lactato. Estes resultados confirmam os resultados apresentados para a co-cultura de bactérias dos gêneros *Enterococcus* e *Veillonella* isoladas do rúmen, na qual a adição de 6 g/L de extrato de levedura em soro de queijo ultrafiltrado aumentou em quase três vezes a biomassa microbiana final, apresentando também menores valores de pH final, o que sugere maior produção de ácidos orgânicos (XAVIER, 2004). Estudos realizados para a elucidação dos compostos presentes no extrato de levedura responsáveis pelo estímulo sobre a produção de ácido propiônico não foram conclusivos, contudo, altas concentrações de extrato de levedura são necessários para produção de altas quantidades de ácido propiônico por linhagens comerciais de *P. acidipropionici*. (QUESADA-CHANTO *et al.*, 1994). Por outro lado, em trabalho realizado com a bactéria a *Prevotella ruminicola* observou-se que vitamina B12, a qual é encontrada no extrato de levedura, é essencial para a produção de ácido propiônico (STROBEL, 1992).

Além da biomassa e da concentração final de ácido propiônico, a adição de extrato de levedura também melhorou o rendimento de ácido propiônico, potencializando a conversão do substrato em ácido propiônico e aproximando-se do rendimento máximo teórico, 2,33 mol/mol, nas concentrações de 1 a 12 g/L de extrato de levedura (Figura 4). Em experimentos realizados com *P. shermanii*, utilizando soro de queijo ultrafiltrado, observou-se que a adição de extrato de levedura em concentrações de até 20 g/L aumentou tanto o rendimento quanto a produtividade de ácido propiônico (JAIN *et al.*, 1991). Desta forma, considerando os resultados obtidos e que a adição de extrato de levedura resulta também em aumento do produto fermentado contendo o ácido propiônico, a concentração de 2 g/L de extrato de levedura foi selecionada para a realização dos experimentos subsequentes.

Uma vez definida a concentração de extrato de levedura a ser adicionada ao meio, avaliou-se a utilização de 14 diferentes substratos pelo isolado 22A, dos quais apenas a xilose e o citrato não foram metabolizados. Os açúcares testados foram quase completamente consumidos ou completamente consumidos, assim como o glicerol, enquanto a utilização de ácidos orgânicos variou de 31,90 a 99,78 % (Tabela 2).

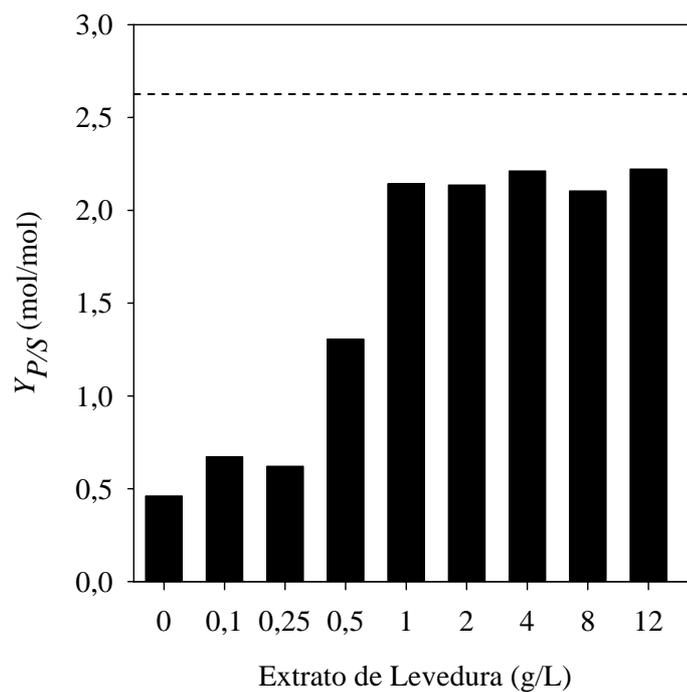


Figura 4. Efeito da concentração de extrato de levedura no rendimento de ácido propiônico pelo isolado 22A. O isolado 22A foi cultivado em meio basal adicionado de lactose (4 g/L) e diferentes concentrações de extrato de levedura (0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12 g/L) por 48 h a 39 °C. A linha pontilhada indica o rendimento teórico de propionato obtido a partir de lactose (2,66 mol/mol).

Tabela 2. Parâmetros fermentativos do isolado 22A cultivado em meio basal adicionado de 2 g/L de extrato de levedura durante 48 h de incubação a 39 °C.

Parâmetros	Açúcares						Ácidos Orgânicos					Poliol
	Glicose	Lactose	Sacarose	Maltose	Celobiose	Manose	Lactato	Piruvato	Malato	Fumarato	Succinato	Glicerol
S ₀ ^a (mM)	26,03	15,64	16,07	16,44	16,33	30,66	79,05	65,65	33,21	40,12	64,99	73,45

Pode-se observar na Tabela 2 que, em geral, tanto a biomassa final quanto o rendimento de biomassa obtidos com os açúcares, acima de 0,30 g/L e 0,055 g/g respectivamente, foram superiores àqueles obtidos com os ácidos orgânicos. A exceção foi o fumarato, cujos resultados ficaram acima de 0,16 g/L e 0,035 g/g, respectivamente. Estudo comparando o efeito de lactose, glicose e lactato sobre a fermentação propiônica por *P. acidipropionici* apresentou rendimento de biomassa até cinco vezes maior quando a lactose foi utilizada, em comparação com lactato (LEWIS e YANG, 1992b). Por outro lado, utilizando o isolado 22A, apesar dos açúcares apresentarem melhores resultados que os ácidos orgânicos no rendimento de biomassa, observou-se aumento de apenas duas vezes quando utilizou-se lactose em relação à lactato.

Em relação a concentração final de ácido propiônico, tanto açúcares quanto ácidos orgânicos apresentaram, em geral, resultados semelhantes, com valores entre 19 a 35 mM. Entretanto, considerando a quantidade de carbono recuperada em produtos, observou-se que a conversão de substratos em produtos foi mais eficiente com ácidos orgânicos do que com açúcares. Com o isolado 22A, e com consumos equivalentes (em massa), observa-se também que o rendimento de ácido propiônico foi melhor com lactato (0,63 mol/mol, máximo teórico: 0,66 mol/mol) do que com glicose (1,20 mol/mol, máximo teórico: 1,33 mol/mol). Este resultado aproxima-se do obtido por Lewis e Yang (1992b) que obtiveram rendimentos de 0,62 mol/mol e 0,95 mol/mol, quando utilizaram lactato e glicose como substrato para *P. acidipropionici*, respectivamente.

Contudo, os melhores resultados foram obtidos quando glicerol foi utilizado como fonte de carbono, o qual apresentou rendimento de biomassa de 0,059 g/g, semelhante aos valores encontrados com açúcares como substrato, e rendimento e concentração final de ácido propiônico de 0,92 mol/mol e 67,36 mM, respectivamente, maiores que os obtidos com glicose, lactose e lactato, que são os substratos utilizados em vários outros estudos para produção de ácido propiônico. O glicerol tem o mesmo valor de oxido-redução que o ácido propiônico, desta forma, a produção de ácido propiônico a partir de glicerol dispensa a geração de co-produtos para que seja alcançado o balanço de oxido-redução entre substratos e produtos, como ocorre com a produção de ácido propiônico a partir de substratos como carboidratos e lactato (BARBIRATO *et al.*, 1997; HIMMI *et al.*, 2000). Isso pode

explicar a conversão mais eficiente de glicerol em ácido propiônico. Além disso, a utilização de ácido fumárico com bons rendimentos de ácido propiônico e de biomassa, quando comparado com os demais substratos, sugerem a presença da enzima fumarato redutase, a qual possibilita a utilização de ácido fumárico com geração de energia, e a utilização da via do succinato, uma vez que o isolado produziu ácido propiônico a partir deste ácido e também a partir de ácido succínico.

4.4 CULTIVO EM SORO DE QUEIJO

O isolado 22A consumiu rapidamente a lactose presente no meio entre quatro e 12 horas de cultivo, período este que corresponde a fase de crescimento exponencial da bactéria (Figura 5A). Observa-se também, que após a entrada da cultura em fase estacionária, há uma diminuição da biomassa. Segundo modelo proposto por Doyle *et al.* (1988), bactérias em rápido crescimento apresentam alto potencial de membrana e acumulam prótons na face externa da membrana, o que diminui o pH externo e inibe as autolisinas. Por outro lado, durante a fase estacionária o potencial seria dissipado e o aumento do pH externo ativaria as autolisinas, o que poderia explicar o resultado obtido com o isolado 22A. Já o controle da lise da bactéria ruminal *Fibrobacter succinogenes* parece diferir do modelo acima, uma vez que bactérias em alta taxa de crescimento e alto potencial de membrana apresentam taxas de lise maiores que bactérias em fase estacionária (WELLS e RUSSELL, 1996).

Um rápido aumento na concentração de ácido propiônico e ácido acético ocorreu entre 8 e 16 horas de cultivo, correspondendo com o pico de acúmulo de ácido láctico, que foi rapidamente consumido (Figura 5B). Assim como observado com o isolado 22A, o acúmulo de intermediários da via de produção de ácido propiônico, como o lactato, e seu posterior consumo após a depleção do substrato principal é um evento encontrado também em propionibactérias (YANG *et al.*, 1994; GOSWAMI e SRIVASTAVA, 2000). O rendimento de ácido propiônico e de biomassa obtidos foram de 2,37 mol/mol de lactose e de 0,147 g/g de lactose, respectivamente, com produtividade volumétrica máxima de ácido propiônico de 0,20 g/L•h e velocidade específica de crescimento de 0,35 h⁻¹.

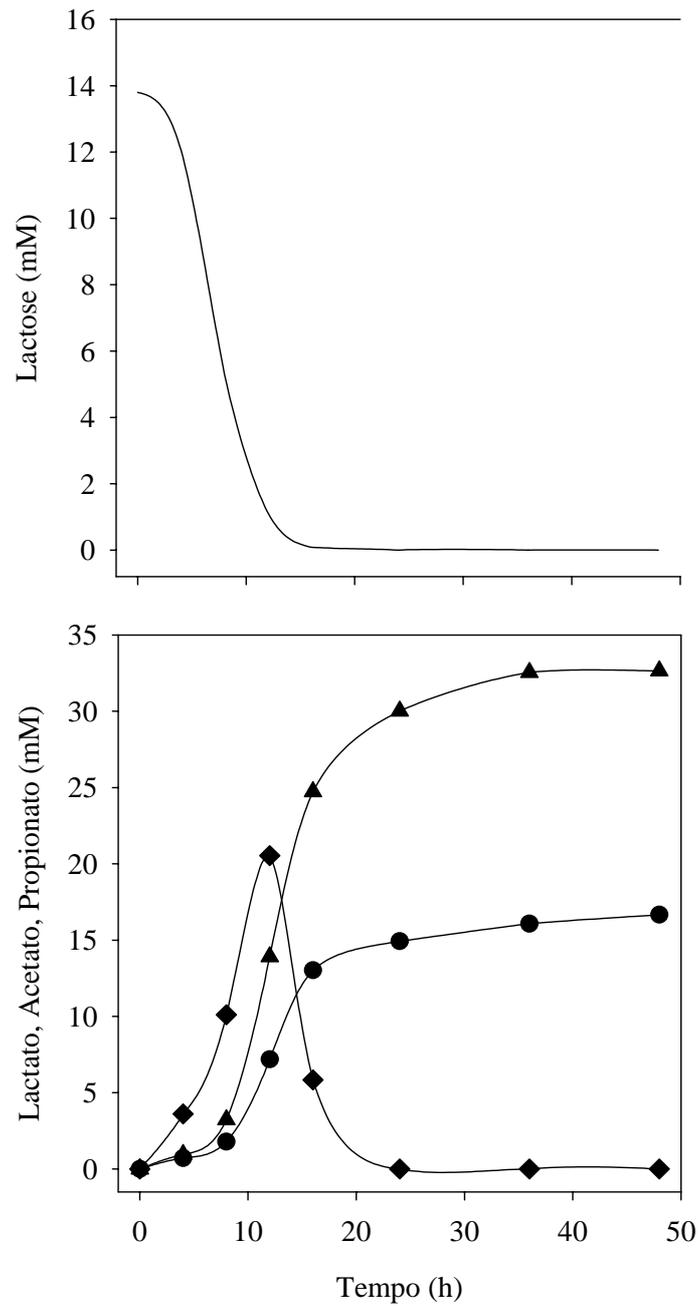


Figura 5. Crescimento do isolado 22A em soro de queijo, consumo de lactose (A) e produção de ácido propiônico (B). O isolado 22A foi cultivado em soro de queijo (lactose 4 g/L) adicionado de extrato de levedura (2 g/L) por 48 h a 39 °C. Foram determinadas a biomassa (\diamond), a concentração de lactose (\blacksquare), lactato (\blacklozenge), acetato (\bullet) e propionato (\blacktriangle).

O rendimento de ácido propiônico nas condições testadas aproximou-se do rendimento teórico máximo, 2,66 mol/mol de lactose, e próximo também ao encontrado com *P. acidipropionici* P9 em batelada com soro de queijo, 2,56 mol/mol de lactose (WOSKOW e GLATZ, 1991). Em relação aos rendimentos de ácido propiônico de *P. microaerophilum* e *Sporotalea propionica*, 0,55 mol/mol de glicose e 1,24 mol/mol de glicose, respectivamente, o rendimento obtido pelo isolado 22A foi superior a *P. microaerophilum* e semelhante à *Sporotalea propionica* (KOUSSÉMON *et al.*, 2003; BOGA *et al.*, 2007). O rendimento de biomassa do isolado 22A foi cerca de 50 % inferior a *P. acidipropionici* P9, no entanto, a velocidade específica de crescimento e a produtividade volumétrica do isolado 22A, 0,35 h⁻¹ e 0,20 g/L•h respectivamente, foram superiores aos obtidos para *P. acidipropionici* P9, 0,05 h⁻¹ e 0,044 g/L•h (WOSKOW e GLATZ, 1991).

4.5 CULTIVO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LACTOSE

4.5.1 Cultivo em Diferentes Concentrações de Lactose sem Controle de pH

Nos tubos contendo as concentrações 133,16, 294,63 e 519,24 mM de lactose, praticamente não houve fase de adaptação do isolado 22A, com o crescimento iniciando-se rapidamente após a inoculação, porém, no tubo contendo a concentração de lactose 796,56 mM, o isol

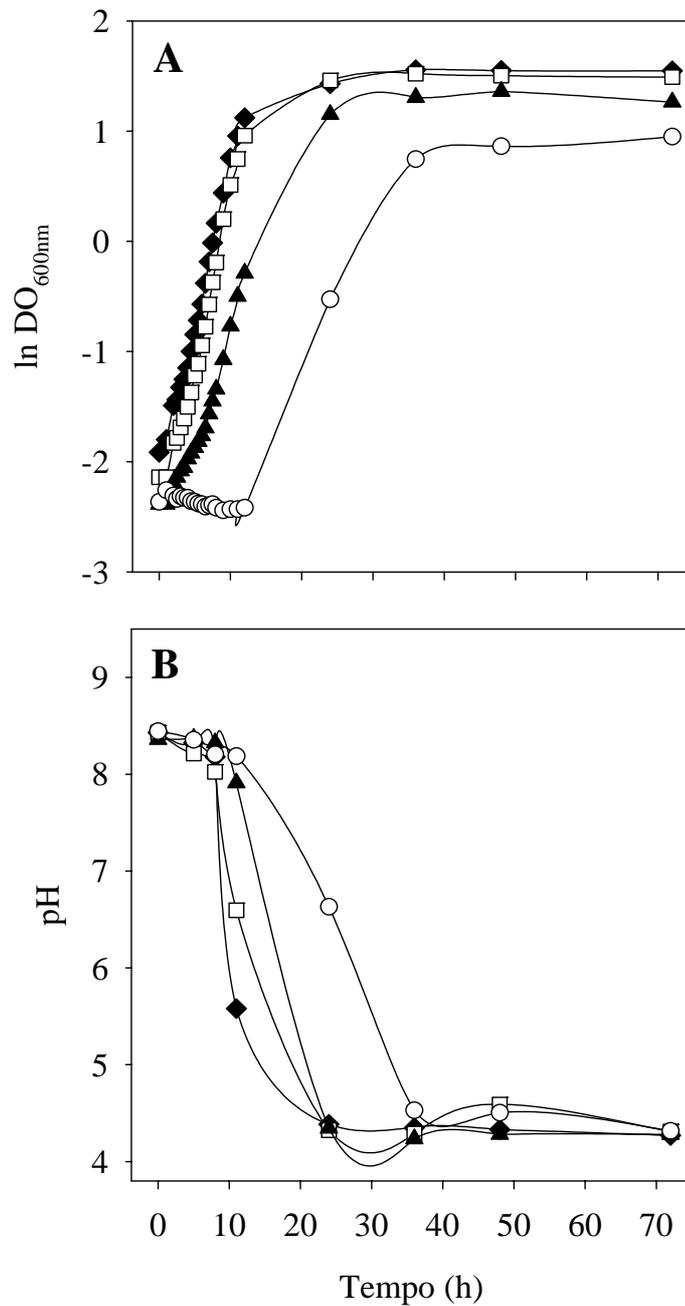


Figura 6. Crescimento do isolado 22A em diferentes concentrações de lactose, expresso na forma do logaritmo neperiano da DO_{600nm} (A) e variação do pH da cultura (B). O isolado 22A foi cultivado em meio basal adicionado de diferentes concentrações de lactose (133,16 - ◆, 294,63 - ◻, 519,24 - ▲ e 796,56 - ○ mM) e de extrato de levedura (2 g/L) por 72 h a 39 °C.

Com a entrada das culturas em fase estacionária e a diminuição do pH do meio após as primeiras 24 horas de cultivo, observou-se também a redução da taxa de consumo de lactose, que ainda permaneceu no meio ao final da fermentação, em quantidades acima de 85 mM (Figura 7A-D). Por outro lado, durante o período de rápido consumo lactose, observa-se também rápido aumento na concentração de ácido láctico e também da biomassa.

Para os ácidos propiônico e acético, o período de rápido aumento de concentração ocorreu entre 11 e 24 horas, o que coincide com o observado no experimento utilizando soro de queijo, no qual a rápida produção desses ácidos ocorre após acúmulo de certa quantidade de ácido láctico. Além disso, as concentrações finais de ácido propiônico e ácido acético, independentemente da concentração de lactose inicial, foram semelhantes e em torno de 40 mM e 20 mM, respectivamente. Em adição, o período de rápido aumento da concentração dos ácidos propiônico e acético é também o período no qual as culturas entram em fase estacionária e o pH atinge os valores mais baixos. O pH do meio é um dos principais fatores que afetam a fermentação propiônica em batelada, sendo que pH ácido ou altas concentrações de íon hidrogênio inibem o crescimento de bactérias propiônicas (YANG e LEWIS, 1992a). Diferentemente do crescimento ótimo de propionibactérias que ocorre entre pH 6-7, a produção de ácido propiônico a partir de glicose, lactose ou lactato pode ser aumentada em pH levemente ácido (PIVETEAU, 1999).

Comparando os rendimentos de ácido propiônico obtidos com as diferentes concentrações de lactose testadas e os rendimentos obtidos nos experimentos com lactose (Tabela 2) e de cultivo em soro de queijo, observou-se redução de pelo menos duas vezes no rendimento de ácido propiônico obtido com diferentes concentrações de lactose (Tabela 3). Este resultado pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo acúmulo de ácido láctico e pelo acúmulo de pequenas quantidades de ácido fumárico e ácido succínico (Tabela 3). Em estudo utilizando a bactéria ruminal *P. ruminicola*, a não conversão de succinato em propionato, bem como seu acúmulo no meio foram revertidos por meio da adição de vitamina B₁₂, a qual está presente na enzima metilmalonil-CoA mutase (STROBEL, 1992).

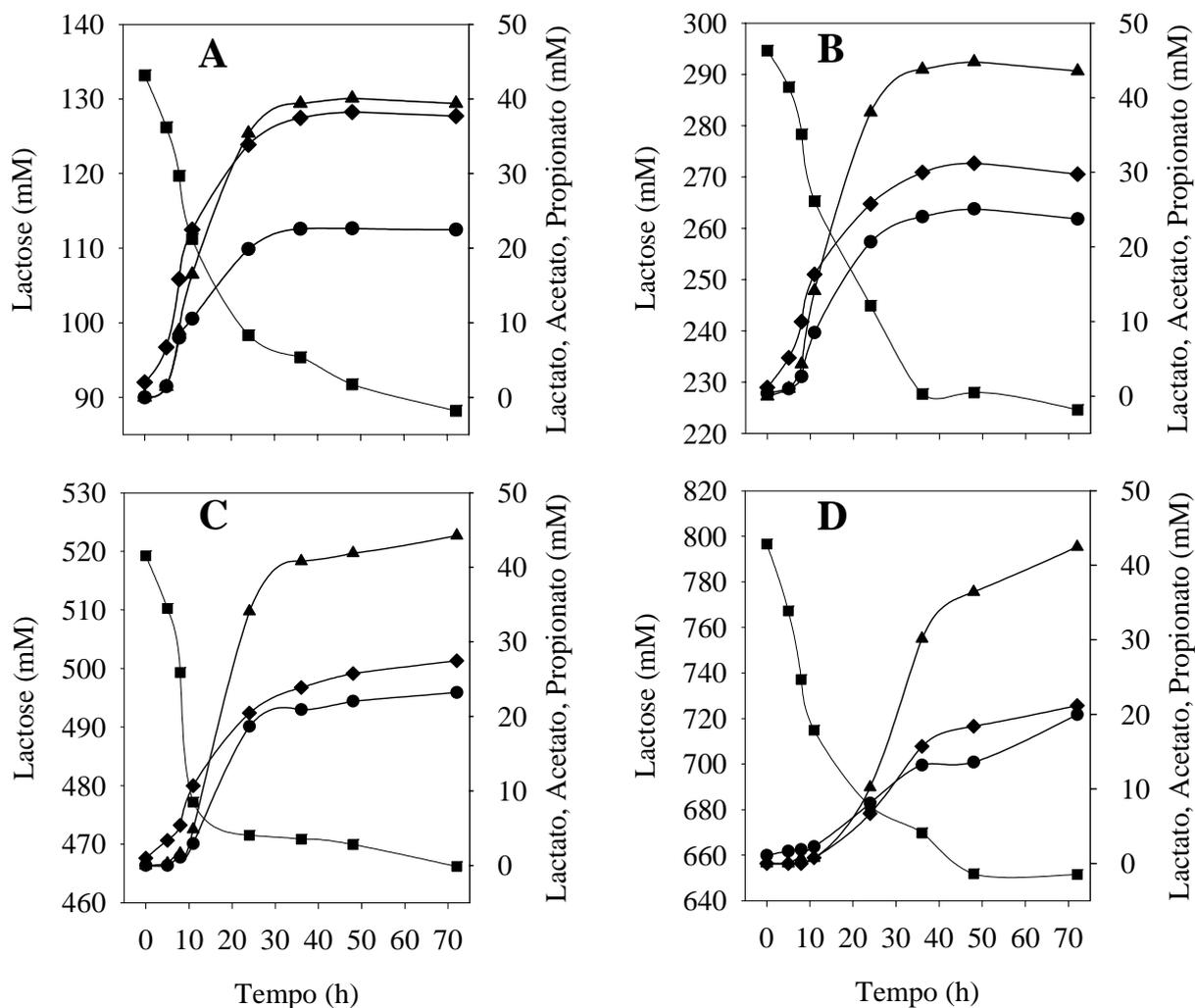


Figura 7. Efeito da concentração de lactose na produção de ácido propiônico. Foram utilizadas as concentrações de lactose de 133,16 (A), 294,63 (B), 519,24 (C) e 796,56 (D) mM. O isolado 22A foi cultivado em meio basal adicionado das diferentes concentrações de lactose e de extrato de levedura (2 g/L) por 72 h. a 39 °C. Foram determinadas a concentração de lactose (■), lactato (◆), acetato (●) e propionato (▲).

Tabela 3. Crescimento do isolado 22A em meio basal adicionado de diferentes concentrações de lactose (133,16, 294,63, 519,24 e 796,56 g/L) e de extrato de levedura (2 g/L) durante 72 h de incubação a 39 °C, sem controle de pH.

Parâmetros	Lactose			
	1	2	3	4
S ₀ ^a (mM)	133,16	294,63	519,24	796,56
S _f ^b (mM)	88,21	224,58	466,20	651,55
Galactose ^c (mM)	4,36	8,19	11,98	34,50
Glicose ^c (mM)	0	0	0	44,60
Fumarato ^c (mM)	1,14	0,94	0,73	0,47
Etanol ^c (mM)	0	0	0	0
Succinato ^c (mM)	1,42	1,73	1,78	1,27
Lactato ^c (mM)	37,71	29,75	27,47	19,98
Propionato ^c (mM)	39,40	43,59	44,25	42,48
Acetato ^c (mM)	22,48	23,75	23,22	21,19
μ (h ⁻¹)	0,389	0,366	0,286	nd ^g
X _{max} ^d (g/L)	1,224	1,183	1,005	0,668
Y _{X/S} max(g/g) ^e	0,081	0,051	0,061	0,081
Y _{P/S} (mol/mol) ^f	0,92	0,66	0,94	0,40
C _{prod.} (%) ^h	55,83	35,15	48,06	18,70

^a Concentração inicial de lactose.

^b Concentração final de lactose.

^c Concentração final no meio de cultivo (72 h).

^d Biomassa máxima.

^e Rendimento máximo de biomassa.

^f Rendimento de ácido propiônico.

^g Não determinado.

^h Porcentagem do carbono consumido recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e a formação de biomassa.

Além do acúmulo dos ácidos fumárico e succínico, também houve acúmulo de galactose e de glicose, em concentrações crescentes à medida que a concentração de lactose no meio aumentava (Tabela 3). Inversamente, uma diminuição nos valores de velocidade específica de crescimento, biomassa máxima e da porcentagem de carbono consumido recuperado em produtos é encontrada à medida que concentração do meio aumento, com exceção da concentração de lactose de 519,24 mM. Porém, a melhor recuperação de carbono em produtos deste experimento 55,83%, obtida na concentração de lactose de 133,16 mM, está muito

abaixo dos 83,81 % de carbono recuperado em produtos, que foi obtida em meio com 15,64 mM de lactose. Este resultado pode estar relacionado com o habitat natural do isolado 22A, pois no rúmen a disponibilidade de alimentos é controlada, de forma que os substratos não se encontram em quantidades excessivas. Em adição, algumas bactérias ruminais quando em condições de alto fluxo metabólico através das vias catabólicas de açúcares, na tentativa de equilibrar os processos anabólicos e catabólicos, acabam utilizando-se de um ciclo fútil de gasto de energia (RUSSELL, 1998). Outra estratégia que pode ser utilizada em condições de excesso de carboidratos é a produção de lactato através de um desvio, com metilglioxal como intermediário, porém, metilglioxal é altamente tóxico para a célula e pode causar diminuição significativa da viabilidade celular (RUSSELL, 1998).

4.5.2 Cultivo em Diferentes Concentrações de Lactose com Controle de pH

Devido à queda no pH do meio no experimento anterior e suas conseqüências sobre o metabolismo do isolado 22A, um sistema de batelada com controle de pH foi utilizado para avaliar a produção de ácido propiônico e outros parâmetros fermentativos do isolado 22A. O controle de pH possibilitou aumento significativo na quantidade de lactose consumida, porém, a quantidade de ácido propiônico produzida não aumentou na mesma proporção (Tabela 4). Experimento utilizando co-cultura de bactérias ruminais, constituída por *Enterococcus* sp. e *Veillonella* sp., e concentração de lactose semelhantes a menor concentração utilizada neste experimento, 139,53 mM, obteve concentração final de ácido propiônico obtida foi quase quatro vezes superior àquelas obtida neste experimento (XAVIER, 2004).

Houve novamente acúmulo de quantidades consideráveis de lactato, além do acúmulo de succinato e produção de etanol. Quantidades de galactose e glicose também se acumularam no meio de cultivo (Tabela 4). Em *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a lactose é transportada para o citoplasma por um sistema fosfotransferase e a lactose-6-fosfato é intracelularmente hidrolisada em glicose e galactose-6-fosfato. Contudo, durante o metabolismo da lactose, o fluxo de glicose pela via glicolítica é maior que o fluxo de galactose, que é metabolizada pela via da tagatose-6-fosfato, de forma que a galactose é desfosforilada e expulsa da

célula, acumulando-se no meio (BENTHIN *et al.*, 1994). A bactéria ruminal *F. succinogenes* também apresenta mecanismos de expulsão de carboidratos, como a hidrólise de celobiose e a expulsão de glicose da célula em situações na qual o meio apresenta excesso de celobiose e limitação de nitrogênio (RUSSELL, 1998).

Tabela 4. Crescimento do isolado 22A em meio basal adicionado de diferentes concentrações de lactose (139,53, 338,70, 524,94 e 727,52 mM) e de extrato de levedura (2 g/L) durante 72 h de incubação a 39 °C, com controle de pH (6,8 . ± 0,2) e agitação a 150 rpm.

Parâmetros	Lactose			
	1	2	3	4
S ₀ ^a (mM)	139,53	338,70	524,94	727,52
S _f ^b (mM)	0,00	132,92	219,02	532,88
Galactose ^c (mM)	3,01	60,62	101,62	25,11
Glicose ^c (mM)	0,00	42,59	91,30	19,07
Fumarato ^c (mM)	0	0	0	0
Etanol ^c (mM)	36,12	52,87	76,58	45,95
Succinato ^c (mM)	6,11	12,05	41,91	9,70
Lactato ^c (mM)	252,88	178,17	133,51	56,48
Propionato ^c (mM)	77,04	75,61	102,05	37,23
Acetato ^c (mM)	68,59	42,99	80,48	54,64
X _{max} ^d (g/L)	1,640	1,09	1,161	1,362
Y _{X/S} max (g/g) ^e	0,141	0,059	0,044	0,037
Y _{P/S} (mol/mol) ^f	0,56	0,49	0,48	0,21
C _{prod.} (%) ^g	73,88	54,12	47,28	25,17

^a Concentração inicial de lactose.

^b Concentração final de lactose.

^c Concentração final no meio de cultivo (72 h).

^d Biomassa máxima.

^e Rendimento máximo de biomassa.

^f Rendimento de ácido propiônico.

^g Porcentagem do carbono consumido recuperado em produtos, desconsiderando a produção de CO₂ e a formação de biomassa.

Além dos compostos apresentados na Tabela 4, dois compostos não identificados, representados nos cromatogramas por picos com tempos de retenção de 9,1 e 16,2 minutos, foram observados. Os tempos de retenção apresentados por

estes produtos do metabolismo do isolado 22A não foram encontrados em nenhum dos padrões utilizados nas análises por HPLC e conseqüentemente não puderam ser identificados e quantificados. Mesmo desconsiderando os produtos do metabolismo do isolado 22A não identificados e quantificados, a porcentagem de recuperação de carbono nos produtos neste experimento aumentou em relação ao experimento com diferentes concentrações de lactose e sem controle de pH. A presença de compostos não identificados juntamente com o acúmulo de lactato podem ajudar a explicar o baixo rendimento de ácido propiônico obtido. Um dos maiores problemas da fermentação propiônica é o forte efeito inibitório do ácido propiônico, que inibe tanto o crescimento do microrganismo quanto a produção de ácido propiônico (BLANC e GOMA, 1987; LEWIS e YANG, 1992; GU *et al.*, 1998). Concentrações de ácido propiônico acima de 27 mM já apresentam efeitos inibitórios (RAMSAY *et al.*, 1998), e o aumento dessa concentração para 410 mM resultou em diminuição de dois terços no crescimento celular e diminuição na produção específica de ácido propiônico de 0,80 mol/g de célula/h para 0,20 mol/g de célula/h (GU *et al.*, 1998).

4.6 EFEITO DO pH INICIAL SOBRE O CRESCIMENTO E A PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO PELO ISOLADO 22A

O pH inicial do meio afetou a velocidade específica de crescimento até o pH 6,5, a partir do qual, a velocidade específica de crescimento foi em torno de 0,3 h⁻¹. No pH 8,0 foi observada a maior velocidade específica de crescimento, 0,317 h⁻¹ (Figura 8A). Padrão semelhante pode ser visto em relação ao rendimento de ácido propiônico, com aumento acentuado no rendimento até o pH 6,5, e o melhor resultado no pH 8,5 (Figura 7B). O consumo de lactose variou de 3,44 a 22,63 mM, seguindo o aumento do pH do meio, até o pH 7,5, a partir do qual não houve mais efeito sobre o consumo de lactose (Figura 7C). A formação de biomassa foi bastante reduzida até pH 6,0, aumentando rapidamente até o pH 8,0 (Figura 7D).

Apesar de apresentar bons rendimentos de ácido propiônico, semelhantes aos obtidos em condições de baixa concentração de substrato, a concentração final de ácido propiônico foi semelhante àquelas obtidas nos experimentos com diferentes concentrações de lactose (dados não mostrados). Assim como visto no experimento com diferentes concentrações de lactose, o pH final dos cultivos estavam todos em torno de 4,3, independente do pH inicial do meio.

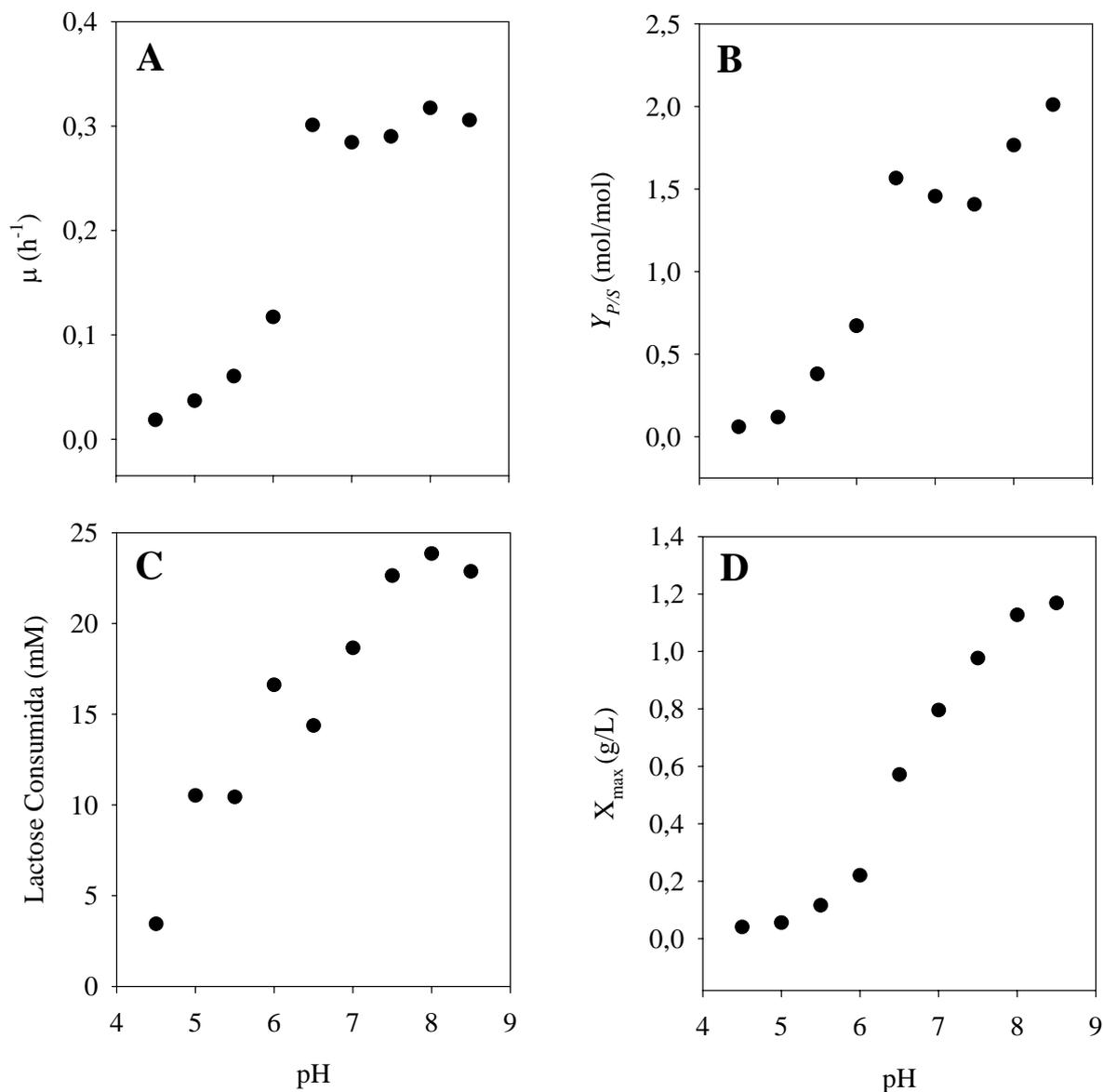


Figura 8. Crescimento do isolado 22A em diferentes pH iniciais. O isolado 22A foi cultivado em meio basal com diferentes pH iniciais (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5) e adicionado de lactose (40 g/L) e de extrato de levedura (2 g/L) por 48 h a 39 °C. Foram determinadas a concentração a velocidade específica de crescimento (A), o rendimento de ácido propiônico (B), o consumo de lactose (C) e a biomassa máxima (D).

Os resultados obtidos acima podem representar uma característica importante para a fermentação propiônica, uma vez que a ação inibitória do ácido propiônico se dá principalmente pela perturbação da força próton motora. Quando na forma não dissociada, o ácido propiônico pode atravessar a membrana plasmática e no pH alcalino intracelular se dissociar, criando um excesso de prótons dentro da célula (GU *et al.*, 1998). Para manter o gradiente através da membrana, a célula utiliza ATPases para bombear os prótons novamente para fora da célula, como resultado, menos ATP fica disponível para o metabolismo celular, o que inibe o crescimento celular e a produção de ácido propiônico (PÉREZ CHAIA *et al.*, 1994; GU *et al.*, 1998). Desta forma, a eficiência da fermentação propiônica em pH alcalinos pode ser devida ao aumento da fração de ácido propiônico ionizado no meio de cultivo, diminuindo assim seu efeito inibitório.

Considerando os resultados obtidos com o isolado 22A nos experimentos em realizados em batelada, observa-se que em baixas concentrações de lactose houve maior eficiência de conversão do substrato em ácido propiônico. Desta forma, a utilização de sistemas de batelada alimentada e cultura contínua tornam-se alternativas para o cultivo do isolado 22A. Além disso, apesar do baixo rendimento de ácido propiônico obtido nos experimentos com diferentes concentrações de substrato, o isolado 22A foi capaz de utilizar completamente concentrações de lactose semelhantes aquelas encontrada no soro de queijo. Em adição, o crescimento em soro de queijo apresentou melhores rendimentos do que os obtidos em meio basal, o que se configura em uma boa alternativa para a produção de ácido propiônico pelo isolado 22A.

5. CONCLUSÕES

O isolado 22A foi capaz de fermentar vários substratos, como açúcares (glicose, lactose, maltose, sacarose, celobiose e manose), ácidos orgânicos (lactato, piruvato, malato, fumarato e succinato) e glicerol, produzindo ácido propiônico e acético como os principais produtos finais do metabolismo.

A produção de ácido propiônico pelo isolado 22A foi estimulada pela adição de extrato de levedura ao meio.

O isolado 22A foi capaz de utilizar a lactose do soro de queijo, em concentrações em torno de 14 Mm, com rendimento de ácido propiônico de 2,37 mol/mol de lactose, próximo ao rendimento teórico máximo, 2,66 mol/mol de lactose.

A concentração de lactose de 133,16 mM de lactose não é completamente consumida pelo isolado 22A em bateladas sem controle de pH. Em batelada com controle de pH o isolado 22A foi capaz de consumir completamente a concentração de lactose de 133,16 mM.

O rendimento de produtos em bateladas com concentrações de lactose a partir de 133,16 mM diminuem drasticamente em relação ao rendimento observado com concentração de lactose em torno de 14 mM, de 2,37 mol/mol de lactose para 0,92 mol/mol de lactose sem controle de pH do meio, e para 0,56 mol/mol de lactose com controle de pH do meio.

A utilização de diferentes sistemas de cultivo, como cultura contínua e batelada alimentada, deverão ser testadas para avaliar a fermentação do

isolado 22A, uma vez que este isolado apresentou bom potencial de produção de ácido propiônico em concentrações em torno de 14 mM de lactose.

O isolado 22A apresenta potencial para a fermentação de soro de queijo para a produção de ácido propiônico.

REFERÊNCIAS

ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; HARVATINE, K. J. The cow as a model to study food intake regulation. **Annual Review of Nutrition**. v. 25, p. 523-547, 2005.

ANDERSON, M. J. Metabolism of liquid whey fed to sheep. **Journal of Dairy Science**. v. 58, p. 1856-1859, 1975.

ANNISON, E. F.; LEWIS, D. **Metabolism in the rumen**. London: Methuen & Co LTD, 1959. 184 p.

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

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 3, p. 1-20, 2004.

BELLO, M. G. D.; ESCOBAR, A. Rumen manipulation for improved utilization of tropical forages. **Animal Feed Science and Technology**. v. 69, p. 91-102, 1997.

BENTHIN, S.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Galactose expulsion during lactose metabolism in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FD1 due dephosphorylation of intracellular galactose 6-phosphate. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 60, p. 1254-1259, 1994.

BLANC, P.; GOMA, G. Kinetics of inhibition in propionic acid fermentation. **Bioprocess Engineering**. v. 2, p. 175-179, 1987.

BOGA, H. I.; JI, R.; LUDWIG, W.; BRUNE, A. *Sporotalea propionica* gen. nov. sp. nov., a hydrogen-oxidizing, oxygen-reducing, propionigenic firmicute from the intestinal tract of a soil-feeding termite. **Archives of Microbiology**. v. 187, p. 15-27, 2007.

BOYAVAL, P.; CORRE, C. Production of propionic acid. **Lait**. v. 75, p. 453-461, 1995.

BOYAVAL, P.; CORRE, C.; MADEC, M-N. Propionic acid production in a membranebioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16, p. 883-886, 1994.

CASTILLO, C.; BENEDITO, J. L.; MÉNDEZ, J.; PEREIRA, B.; LÓPEZ-ALONSO, M.; MIRANDA, M.; HERNÁNDEZ, J. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**. v. 115, p. 101-116, 2004.

COUNOTTE, G. H. M.; PRINS, R. A.; JANSSEN, R. H. A. M.; DEBIE, R. J. A. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-¹³C]lactate in the rumen of dairy cattle. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 42, p. 649-655, 1981.

DE CARVALHO, A. F. **Systematique des bacterias propioniques laitières: classification, nomenclature et identification**. (D. Sc.). Renes-ENSA, 1994. 227 p.

DEBORDE, C.; ROLIN, D. B.; BOYAVAL, P. *In vivo* ¹³C NMR study of the bidirectional reactions of the Wood_Werkman cycle and around the pyruvate node in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* and *Propionibacterium acidipropionici*. **Metabolic Engineering**. v. 1, p. 309-319, 1999.

DOYLE, R. J.; CHALOUPKA, J.; VINTER V. Turnover of cell walls in microorganisms. **Microbiological Reviews**. v. 52, p. 554-567, 1988.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Estatísticas do Leite**. <http://www.cnpqgl.embrapa.br/>. Acesso em: 11 de março de 2007.

EUROPEAN UNION. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. **Press Release**, Brussels, IP/05/1687, 22 Dec. 2005.

EUROPEAN UNION. Communication from the Commission on a Community Strategy Against Antimicrobial Resistance. **Comission of the European Communities**, Brussels, v. 1, 20 Jun. 2001.

FITZ, A. Ueber Spaltpilzgährungen. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**. v. 11, p. 1890-1899, 1878.

FITZ, A. Ueber Spaltpilzgährungen. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**. v. 13, p. 1309-11312, 1880.

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

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

HEDERSTEDT, L. Respiration without O₂. **Science**. v. 284, p. 1941-1942, 1999.

HETTINGA, D. H.; REINBOLD, G. W. Review: The propionic-acid bacteria II. Metabolism. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 35, p. 358-372, 1972.

HETZEL, M.; BROCK, M.; SELMER, T.; PIERIK, A. J.; GOLDING, B. T.; CUCKEL, W. Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum* – an enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron transferring flavoprotein. **European journal of Biochemistry**. v. 270, p. 902-910, 2003.

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

HSU, S-T.; YANG, S-T. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effects of pH. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 38, p. 571-578, 1991.

HUANG, Y. L.; WU, Z.; ZHANG, L.; CHEUNG, C. M.; YANG, S-T. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor. **Bioresource Technology**. v. 82, p. 51-59, 2002.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966. 533 p.

JAIN, D. K.; TYAGI, R. D.; KLUEPFEL, D.; AGBEBAVI, T. J. Production of propionic acid from whey ultrafiltrate by immobilized cell of *Propionibacterium shermanii* in batch process. **Process Biochemistry**. v. 26, p. 217-223, 1991.

JAN, G.; PICHEREAU, V.; BOYAVAL, P. Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2029-2036, 2001

JIN, Z.; YANG, S-T. Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biotechnology Progress**. v. 14, p. 457-465, 1998.

KOSIKOWSKI, F. V. Whey utilization and whey products. **Journal of Dairy Science**. v. 62, p. 1149-1160, 1979.

KOUSSÉMON, M.; COMBET-BLANC, Y.; OLLIVIER, B. Glucose fermentation by *Propionibacterium microaerophilum*: effect of pH on metabolism and bioenergetic. **Current Microbiology**. v. 46, p. 141-145, 2003.

LANGSRUD, T.; REINBOLD G. W. Flavour development and microbiology of Swiss cheese. A review. II Starters, manufacturing process and procedure. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 36, p. 531-542, 1973.

LEAVER, F. W.; WOOD, H. G.; STJERNHOLM, R. The fermentation of three carbon substrates by *Clostridium propionicum* and *Propionibacterium*. **Journal of Bacteriology**. v. 70, p. 521-530, 1955.

LEWIS, V. P.; YANG, S-T. Continuous propionic acid fermentation by immobilized *Propionibacterium acidipropionici* in a novel packed-bed bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 40, p. 465-474, 1992a.

LEWIS, V. P.; YANG, S-T. Propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici*: effect of growth substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 37, p. 437-442, 1992b.

LEWIS, V. P.; YANG, S-T. A novel extractive fermentation process for propionic acid production from whey lactose. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 23, p. 1517-1525, 1992c.

MANTERE-ALHONEN S. A new type of sour milk with propionibacteria. **Meijeritiet Aikak**. v. 45, p. 49-61. 1987.

MARSH, E. N.; LEADLAY, P. F. The methylmalonyl-CoA mutase from *Propionibacterium shermanii* – evidence for the presence of two masked cysteine residues. **Biochemistry Journal**. v. 260, p. 339-343, 1989.

MORAN, J. **Tropical Dairy Farming: feeding management for small holder dairy farmers in the humid tropics**. Collingwood Victoria:Landlinks Press, 2005. 312 p.

MÜLLER, V. Bacterial fermentation. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. London: Macmillan. 2001.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Intraruminal infusion of propionate alters feeding behavior and decreases energy intake of lactating dairy cows. **The Journal of Nutrition**. v. 133, p. 1094-1099, 2003.

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

PASTEUR, L. **Studies on Fermentation**. London:Mcmillan, 1879. 418 p.

PÈREZ-CHAIA, A.; DE SAAS, A. M. S.; PESCE DE RUIA HOLGADO, A.; OLIVER, G. Influence of propionate on growth and fermentative activity of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**. v. 77, p. 134-139, 1994.

PIVETEAU, P. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: a review. **Le Lait**. v. 79, p. 23-41, 1999.

QUESADA-CHANTO, A.; AFSCHAR, A. S.; WAGNER, F. Optimization of a *Propionibacterium acidipropionici* continuous culture utilizing sucrose. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 42, p. 16-21, 1994.

RAMSAY, J. A.; ALY HASSAN, M-C.; RAMSAY, B.A Biological conversion of hemicellulose to propionic acid. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 22, p. 292-295, 1998.

REDDY, C. A.; HENDERSON, H. E.; ERDMAN, M. D. Bacterial fermentation of cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in crude protein. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 32, n. 36, p. 769-776, 1976.

RIGOUT, S.; HURTAUD, C.; LEMOSQUET, S.; BACH, A.; RULQUIN, H. Lactational effect of propionic acid and duodenal glucose in cows. **Journal of Dairy Science**. v. 86, p. 243-253, 2003

RUSSELL, J. B. **Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition**. Ithaca:James B. Russell, 2002. 119 p.

RUSSELL, J. B. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. **Journal of Animal Science**. v. 76, p. 1955-1963, 1998.

RUSSELL, J. B.; RYCHLIK, J. L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**. v. 292, p. 1119-1122, 2001.

RUTTER, L. M.; RANDEL, R. R.; SCHELLING, G. T.; FORREST, D. W. Effect of abomasal infusion of propionate on the GnRH induced luteinizing hormone release in prepubertal heifers. **Journal of Animal Science**. v. 56, p. 1167-1173, 1983.

SAMUELOV, N. S.; DATTA, R.; JAIN, M. K.; ZEIKUS, J. G. Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production a succinate-based animal feed additive. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n.5, p. 2260-2263, 1999.

SANO, H.; HATORI, N.; TODOME, Y.; TSURUOK, J.; TAKAHASHI, H.; TERASHIMA, Y. Plasma insulin and glucagons responses to intravenous infusion of propionate and their autonomic control in sheep. **Journal of Animal Science**. v. 71, p. 3414-3422, 1993.

SESHADRI, N.; MUKHOPADHYAY, S. N. Influence of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocessing by *Propionibacterium acidi-propionici*. **Journal of Biotechnology**. v. 29, p. 321-328, 1993.

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

SHERMAN, J. M.; SHAW, R. H. The propionic acid of lactose. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 56, p. 695-700, 1923.

STRECKER, A. Ueber eine eigenthümliche Bildungsweise der Propionsäure und einige Salze derselben. **Liebigs Annalen der Chemie**. v. 92, p. 80-90, 1854.

STROBEL, H. J. Vitamin B₁₂-dependent propionate production by the ruminal bacterium *Prevotella ruminicola* 23. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 58, p. 2331-2333, 1992.

SUWANNAKHAM, S. **Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici***. 2005. 258 p. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Graduate School of Chemical Engineering, The Ohio State University.

THE MERCK INDEX. **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. Rahway: Merck & CO., Inc. 1989. 1606 p.

TEATHER, R. M. Maintenance of laboratory strains of obligately anaerobic rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 44, p. 499-501, 1982.

U. S. DEPARTMENT OF ENERGY, ENERGY EFFICIENCY AND RENEWABLE ENERGY. **Top Value Added Chemicals from Biomass – Results of screening for potential candidates from sugars synthesis gas**. Oak Ridge: U. S. Department of Energy. 2004. 69 p.

WEIJERS, H. A.; VAN DE KAMER, J. H. Alteration of intestinal bacterial flora as a cause of diarrhoea. **Nutrition Abstracts Reviews**. v. 35, n. 3, p. 591-604, 1965.

WELLS, J. E.; RUSSELL, J. B. Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly. **Journal of Dairy Science**. v. 79, p. 1487-1495, 1996.

WILKE, T. H.; VORLOP, K.-D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 66, p. 131-142, 2004.

WOOD, H. G. The fixation of carbon dioxide and the interrelationships of tricarboxylic acids. **Physiological Reviews**. v. 26, p. 198-246, 1946.

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

WOOD, H. G.; WERKMAN, C. H. Mechanism of glucose dissimilation by the propionic acid bacteria. **Biochemical Journal**. v. 30, p. 618-623, 1936.

WOSKOW, S. A.; GLATZ B. Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 57, p. 2821-2828, 1991.

XAVIER, B. M. **Fermentação de soro de queijo por bactérias produtoras de ácido propiônico isoladas do rúmen de bovinos e efeitos nos parâmetros de fermentação ruminal *in vitro***. 2004. 59 p. Tese (Magister Scientiae) – Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.

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

YANG, S-T.; TANG, I. C.; ZHU, H. A novel fermentation process for calcium magnesium acetate (CMA) production from cheese whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 34/35, p. 569-583, 1992.

YANG, S-T.; ZHU, H.; LI, Y. Continuous propionate production from whey permeate using a novel fibrous bed reactor. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 43, p. 1124-1130, 1994.

ZEIKUS, J. G.; JAIN, M. K.; ELANKOVAN, P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 51, p. 545-552, 1999.

APÊNDICE

APÊNDICE A

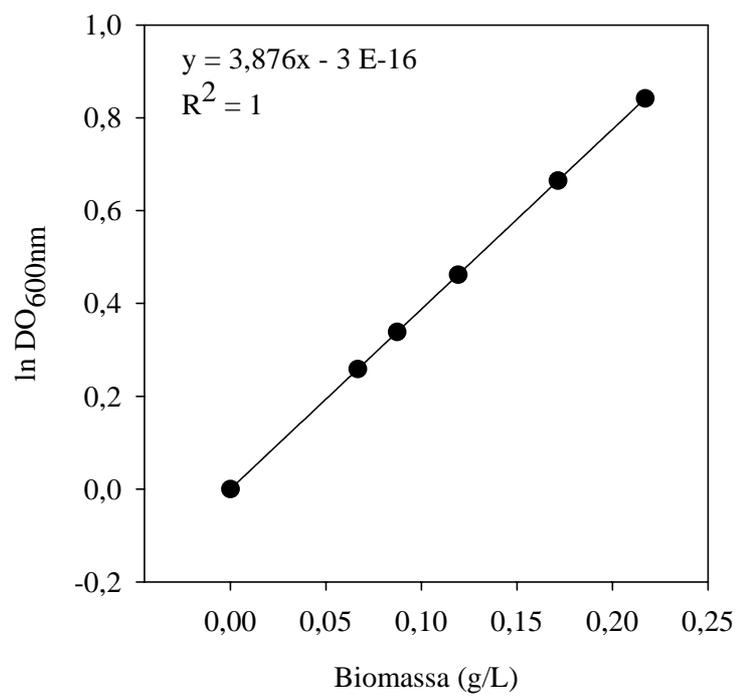


Figura 1A. Curva padrão de biomassa do isolado 22A em meio basal adicionado de lactose (10 g/L) e extrato de levedura (2 g/L).

APÊNDICE B

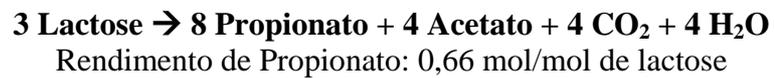
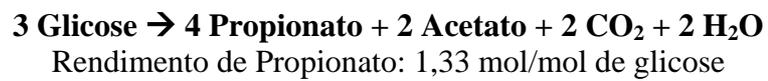
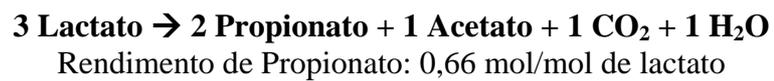


Figura 1B. Equações estequiométricas para a conversão de lactato, glicose, lactose e glicerol em propionato por bactérias propiônicas.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)