

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JÉSSICA CRISTINE TELES

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO POR *Propionibacterium acidipropionici* A
PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS

PONTA GROSSA

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ- REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JÉSSICA CRISTINE TELES

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO POR *Propionibacterium acidipropionici* A
PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Programa de Pós Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Claudia Barana

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Teles, Jéssica Cristine
T269 Produção de ácido propiônico por
propionibacterium acidipropionici a partir
da fermentação de efluentes
agroindustriais/ Jéssica Cristine Teles.
Ponta Grossa, 2016.
60f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e
Tecnologia de Alimentos - Área de
Concentração: Ciências e Tecnologia de
Alimentos), Universidade Estadual de Ponta
Grossa.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Claudia
Barana.

1.Ácidos orgânicos. 2.Processos
fermentativos. 3.Resíduos. 4.Valorização.
I.Barana, Ana Claudia. II. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD: 664

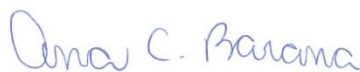
TERMO DE APROVAÇÃO

JÉSSICA CRISTINE TELES

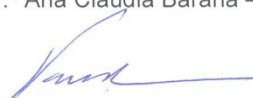
PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIONICO POR *Propionibacterium acidipropionici* A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE EFLUENTES AGROINDUSTRIAIS.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Barana – UEPG/PR



Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi – UNESP/SJRP



Prof.^a Dr.^a Marina Tolentino Marinho – UEPG/PR



Prof.^a Dr.^a Renata Dinnies Santos Salem – UEPG/PR

Ponta Grossa, 29 de abril de 2016.

Dedico aos meus pais, noivo, irmãs e avós.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças e coragem para continuar, apesar das adversidades que surgem ao longo do caminho.

À minha querida professora e orientadora Ana Cláudia Barana, pela confiança depositada em mim e por sempre estar disponível para me auxiliar em todas as dúvidas.

Aos meus pais, irmãs e avós pelo incentivo e paciência durante estes dois anos, vocês são a minha fonte de alegria e persistência.

Ao meu noivo que sempre acreditou em mim e apoiou meus sonhos.

Às alunas Stela Koloda e Elaine Macedo pela ajuda, convivência e companhia de cada dia.

Aos funcionários Denise de Souza Mendes e Vitor Feliciano da Silva que sempre estiveram disponíveis para me ajudar quando precisei.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro, à Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Departamento de Engenharia de Alimentos pela estrutura disponibilizada, e a todas as empresas que forneceram materiais para serem utilizadas neste estudo.

Aos colegas de turma, pelo aprendizado, conversas e pelos momentos de descontração.

A todos que contribuíram para que este sonho fosse realizado.

Muito obrigada.

RESUMO

O ácido propiônico é um ácido orgânico utilizado como conservante em alimentos e sementes e como ingrediente em termoplásticos, drogas, perfumes, aromas e solventes. Sua produção convencional ocorre por síntese química, utilizando-se matérias primas obtidas do petróleo. Porém, com o aumento da preocupação ambiental e procura por alternativas ao uso de produtos derivados de petróleo, a produção de ácidos orgânicos por fermentação tem se mostrado uma opção interessante. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a produção de ácido propiônico a partir da fermentação de efluentes agroindustriais, utilizando a cultura *Propionibacterium acidipropionici* CCT 4843. Os efluentes utilizados como substrato foram soro de leite, milhocina e efluente da produção de ração animal. A composição dos substratos foi determinada a partir de um planejamento experimental de misturas, resultando em 10 ensaios. Os substratos foram fermentados em batelada em reatores de vidro borosilicato à temperatura de 35°C, pH inicial de 6,5 e 20 mL.L⁻¹ de inóculo em suspensão. Após definida a composição do substrato, foi realizado o planejamento fatorial 3³⁻¹, para verificar como as variáveis Tempo de Detenção Hidráulica (TDH), concentração de inóculo e correção inicial de pH afetam a produção de ácido propiônico. A determinação do ácido propiônico e demais ácidos orgânicos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). No planejamento fatorial para estudo das variáveis de processo foi utilizado como substrato apenas a milhocina, pois nos ensaios do planejamento experimental de misturas foi o que possibilitou o maior rendimento, com 0,79 g ácido propiônico.g substrato⁻¹, com uma produtividade de ácido propiônico de 5,20 mg/L.h e produção de 0,40g.L⁻¹. No segundo planejamento foi constatado que as variáveis tempo de detenção (TDH) e o pH inicial influenciam no rendimento e na produtividade de ácido propiônico, porém a concentração inicial de inóculo não influenciou nas respostas. O melhor rendimento obtido foi de 0,6275 g.g⁻¹, com o ensaio com TDH de 96h, concentração inicial de inóculo de 20mL.L⁻¹ em suspensão e pH inicial 6,0 ; e o melhor valor de produtividade obtido foi para o ensaio com tempo de detenção hidráulica de 60h, concentração inicial de inóculo de 30 mL.L⁻¹ e pH inicial de 6,5. Foi concluído que é possível a produção de ácido propiônico a partir de efluentes agroindustriais, porém as condições de processo devem ser otimizadas para torná-lo economicamente viável.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos, Processos Fermentativos, Resíduos, Valorização.

ABSTRACT

Propionic acid is an organic acid used as a preservative in foods and seeds, and as an ingredient in thermoplastics, medicaments, perfumes, fragrances and solvents. Its production takes place by conventional chemical synthesis that uses petroleum as raw material. Finding alternatives and more sustainable ways than the use of petroleum products has been shown an interesting option to the production of organic acids. The purpose of this study was to evaluate the propionic acid production from agroindustrial effluents by fermentation, using a culture of *Propionibacterium acidipropionici* CCT 4843. Whey, corn steep liquor and animal feed effluent were used as substrate. The substrates composition was based on an experimental design mixture, resulting in 10 samples. The substrates were fermented in batch borosilicate glasses at a temperature of 35°C, initial pH 6.5 and 20 mL.L⁻¹ suspension of inoculum. After choose the substrate, a 3³⁻¹ factorial design was carried out, to see how the variable hydraulic retention time, inoculum concentration and pH affected the production of propionic acid. The propionic and other organic acids were detected using a high-performance liquid chromatography (HPLC). The corn steep liquor was chosen as the best a substrate for the factorial design, because it showed the highest propionic acid yield, 0.79 g. g substrate⁻¹, propionic acid productivity of 5.20 mg.L⁻¹.h⁻¹ and production of 0.40 gL⁻¹. It was found that hydraulic retention time and initial pH influenced on the yield and propionic acid productivity, but the initial inoculum concentration did not influence the answers. The highest propionic acid yield of 0.6275 g.g⁻¹, was obtained with 96 hours of hydraulic retention time, inoculum of initial concentration of 20 mL.L⁻¹ and initial pH of 6.0. The best propionic acid productivity was obtained for hydraulic retention time of 60h, initial inoculum concentration of 30 mL.L⁻¹ and initial pH of 6.5. It was concluded that propionic acid production is possible from agroindustrial waste, but the process conditions should be optimized to make it economically viable.

Keywords: Organic acids, Fermentation Processes, Waste recovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via dos ácidos dicarboxílicos por Propionibactérias.....	21
Figura 2: Produção de ácido propiônico a partir do lactato.	22
Figura 3: Frasco de vidro de borosilicato Duran®	26
Figura 4: Variação do pH ao longo do processo fermentativo	33
Figura 5: Concentrações de nutrientes ao longo da fermentação.	35
Figura 6. Superfícies de resposta para produtividade volumétrica e rendimento.....	43
Figura 7. Variação do pH ao longo do processo fermentativo.	44
Figura 8. Superfícies de respostas para o rendimento de ácido propiônico.	49
Figura 9. Superfície de resposta para o resultado de produtividade de ácido propiônico.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Padrões de ácido orgânicos e açúcares.....	27
Tabela 2: Matriz do planejamento de misturas Simplex Centróide aumentado com três componentes	29
Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial fracionado 3^{3-1}	30
Tabela 4. Caracterização físico-química dos efluentes de produção de ração animal, milhocina e soro de leite	31
Tabela 5. Concentrações de nutrientes nos tempos de detenção hidráulica de 0 e 78h.	34
Tabela 6. Produção dos ácidos acético, succínico e propiônico.....	36
Tabela 7. Respostas de produtividade e rendimento do ácido propiônico nos diferentes ensaios.	38
Tabela 8: Correlação de Pearson para o planejamento de mistura.....	40
Tabela 9. Valores da produção em $g.L^{-1}$ de ácido acético, propiônico e de biomassa.....	45
Tabela 10: Correlação de Pearson para o planejamento fatorial fracionado	47
Tabela 11. Respostas rendimento e produtividade para o ácido propiônico.....	47
Tabela 12. Efeitos das variáveis no rendimento de ácido propiônico.	48
Tabela 13. Efeitos das variáveis na produtividade volumétrica de ácido propiônico.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DQO	Demanda Química de Oxigênio
M	Milhocina
N-NH ₄ ⁺	Nitrogênio Amoniacal
NTK	Nitrogênio Total de Kjeldahl
RÇ	Água Residuária do Processamento de ração animal
SL	Soro de Leite
ST	Sólidos Totais
STF	Sólidos Totais Fixos
STV	Sólidos Totais Voláteis
SST	Sólidos Suspensos Totais
SSF	Sólidos Suspensos Fixos
SSV	Sólidos Suspensos Voláteis
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	Poluição ambiental	13
3.2	Utilização de subprodutos agroindustriais	14
3.2.1	Água de maceração de milho	15
3.2.2	Soro de leite	16
3.2.3	Efluente da produção de ração animal	17
3.3	Ácido propiônico	18
3.4	Produção de ácido propiônico por processo fermentativo	20
3.4.1	Cultura propiônica	22
3.4.2	Requerimento nutricional e parâmetros do processo	23
3.4.3	Inibição da produção de ácido propiônico	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Substrato	25
4.2	Cultura propiônica	25
4.3	Fermentador	26
4.4	Análises físico-químicas	26
4.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	27
4.6	Quantificação da biomassa	28
4.7	Delineamento experimental	28
4.7.1	Planejamento de misturas	29
4.7.2	Planejamento fatorial fracionado 3^{3-1}	30
4.7.3	Análise estatística	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Caracterização dos efluentes	31
5.2	resultado do Planejamento de misturas	32
5.3	Planejamento fatorial fracionado 3^{3-1}	43
6	CONCLUSÕES	52
7	SUGESTÕES	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1 INTRODUÇÃO

A agroindústria gera resíduos de elevado valor nutricional. Muitos desses resíduos, além de não serem aproveitados, têm elevado custo de tratamento para atenderem aos padrões oficiais de lançamento em cursos d'água. O aumento de custo do tratamento de resíduos acarreta na elevação do preço final dos produtos da agroindústria. Em países da Europa, como Itália, Reino Unido e França, os subprodutos da agroindústria são utilizados para produção de enzimas, ácidos orgânicos e biogás através da fermentação dos mesmos.

Vários são os subprodutos que podem ser utilizados como substratos em processos fermentativos. A água de maceração de milho é um exemplo, pois além de ser de fácil obtenção, contém nitrogênio e aminoácidos livres em sua composição. O soro de leite é um subproduto de laticínios obtido durante o processo de coagulação do leite e que pode causar impactos ambientais consideráveis se descartado no meio ambiente sem o devido tratamento. O efluente da produção de ração animal é composto por resíduos originários da purga das caldeiras e da lavagem de pisos e equipamentos durante o processo de fabricação da farinha animal. Sua composição final é basicamente proteica, para se obter a ração utiliza-se como matéria prima subprodutos do abate de animais.

O ácido propiônico é utilizado como ingredientes na formulação de produtos como termoplásticos, medicamentos, perfumes, aromas e solventes, e também como conservante em alimentos e grãos. A produção comercial de ácido propiônico é conduzida principalmente por síntese química utilizando matérias-primas obtidas da síntese do petróleo. Porém, as preocupações ambientais relacionadas às emissões de carbono provenientes de fontes fósseis tornaram a procura por rotas biotecnológicas e fontes renováveis um processo cada vez mais atraente. Uma forma alternativa de obtenção de ácido propiônico é a partir do metabolismo heterofermentativo da bactéria *Propionibacterium acidipropionici*. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de ácido propiônico a partir da fermentação de efluentes agroindustriais, sendo eles o soro de leite, milhocina e efluente da produção de ração animal, utilizando a cultura de *Propionibacterium acidipropionici* CCT4843 como inóculo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir ácido propiônico a partir da fermentação de efluentes agroindustriais, utilizando *Propionibacterium acidipropionici* CCT4843.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar, por meio de análises físico-químicas, os subprodutos, milhocina, soro de leite e efluente da produção de ração animal;
- Definir, por meio do planejamento de mistura, a melhor proporção de substratos para produção do ácido propiônico;
- Definir as condições da fermentação para produção do ácido propiônico utilizando o melhor substrato obtido a partir do planejamento de misturas;
- Quantificar os ácidos propiônico, acético, láctico e succínico através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLUIÇÃO AMBIENTAL

A natureza possui mecanismos que alteram o meio ambiente, sobre os quais o homem possui pouco ou nenhum controle, como é o caso de terremotos, furacões e inundações. Porém, com a industrialização, alterações causadas por ações antropogênicas ganharam importância, surgindo novos problemas. A atividade industrial provoca grande impacto ambiental, interferindo e alterando as características físicas, químicas e biológicas do ambiente, causando danos à sobrevivência dos seres humanos e outras espécies (MARENGO et al., 2015).

A qualidade dos resíduos gerados pela indústria depende das matérias-primas e dos processos que são utilizados, fazendo com que o grau poluidor varie de indústria para indústria. A poluição pode atingir a atmosfera, água e o solo, gerando problemas como o efeito estufa, contaminação de corpos d'água e degradação da vida aquática e terrestre (PIERANGELLI, 1988; SANTOS, 2005). O efeito estufa, por exemplo, ocorre devido a emissão de gases ao meio ambiente, como o dióxido de carbono (CO_2) e o metano (CH_4), e o acúmulo destes gases impede que a radiação escape para o espaço, aquecendo a superfície da Terra mais que o necessário e causando mudanças climáticas (CALLEGARI; GOLDEMBERG; VILLANUEVA, 2014).

A poluição das águas altera as características do ambiente, tornando-a imprópria para a fauna aquática que normalmente abriga e dificultando o tratamento para torná-la própria para o consumo humano. Um exemplo de poluição em corpos d'água no Brasil é o Rio Tietê, situado no estado de São Paulo. Atualmente a maior parte da poluição presente neste rio deve-se ao lançamento de esgoto doméstico não tratado proveniente dos moradores da bacia do Alto Tietê, além dos resíduos industriais e outros tipos de lixo doméstico. O rio possui uma nascente com água limpa e transparente e, conforme percorre as cidades, ocorre sua contaminação. A poluição só não é maior porque existem cachoeiras durante o percurso que auxiliam na oxigenação da água, promovendo a autodepuração do rio. O processo de autodepuração é natural, no qual os agentes poluidores de origem orgânica lançados em um corpo d'água são estabilizados, restabelecendo o equilíbrio do meio aquático que haviam mesmo antes do lançamento de efluentes. Este processo

envolve processos físicos (diluição, sedimentação e reaeração atmosférica), químicos (alteração de pH e nutrientes) e biológicos (oxidação e decomposição) (SILVA; PORTO, 2003; VON SPERLING, 1996). Os microrganismos aeróbios decompõem a matéria orgânica presente no rio, consumindo o oxigênio dissolvido (OD) do meio. Fatores como temperatura, concentração de oxigênio dissolvido na água, luz solar e velocidade do curso d'água interferem no processo de autodepuração.

O despejo de efluentes com alta concentração de matéria orgânica e nutrientes causa diversos problemas para o ecossistema aquático, sendo um deles a eutrofização antrópica, que pode ser considerada uma forma de poluição. Um dos fatores responsáveis por essa ocorrência é o excesso de nutrientes lançados nos corpos d'água, principalmente nitrogênio e fósforo, originários de esgotos domésticos, efluentes industriais e atividades agrícolas. Este excesso é responsável pela proliferação de algas, alterando odor e cor da água, diminuindo o oxigênio dissolvido, ocasionando a mortandade de peixes e outros animais e reduzindo a balneabilidade do local (ANDRADE, 2010; ROCHA; LOUGON; GARCIA, 2009).

3.2 UTILIZAÇÃO DE SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Em todo o mundo há geração de grande volume de subprodutos agroindustriais, que são materiais resultantes do processamento industrial, mas que, no entanto, não são o produto de interesse. Infelizmente, muitas vezes, a utilização destes subprodutos é restringida pelo conhecimento limitado de suas características físico-químicas e nutricionais. Por ser um material de baixo custo e fácil disponibilidade, estes subprodutos poderiam ser utilizados como substrato para processos fermentativos, diminuindo seu acúmulo no ambiente. Além disso, muitos desses subprodutos têm elevado valor nutricional (DISHISHA et al., 2013; SANTOS et al., 2012).

A gestão dos resíduos na indústria passou a ser um fator determinante na escolha dos processos de transformação de alimentos, pois a falta de eficiência nos processos produtivos é uma das principais causas para o aumento da quantidade de resíduos. A tecnologia escolhida para tratamento dos resíduos gerados deve ser suficiente para gerar efluentes que atendem às regras ambientais estabelecidas pelo CONAMA sobre lançamento de efluentes em corpos d'água, decretada na

Resolução 430 de 2011, e também não deve ter custo elevado para não afetar demais no preço final do produto (BRASIL, 2005; BRASIL, 2011; FIGUEIREDO, 2014; ROCHA et al., 2013).

Uma maneira de se baixar o custo com tratamento de resíduos é promovendo seu reaproveitamento. A utilização de subprodutos na alimentação animal é prática comum no Brasil. Porém, alguns subprodutos poderiam ter usos mais nobres, como produção de enzimas celulases a partir dos resíduos do processamento de acerola. As fibras da casca do coco verde podem ser utilizadas para produzir vasos, tapetes e acessórios automotivos e também na produção de bio-óleo. Já o pó da casca de coco verde pode ser utilizado como substrato agrícola no cultivo de plantas envasadas. O pseudocaule da bananeira pode ser utilizado para fabricação de papeis especiais e etanol. Os resíduos do processamento de café e maracujá para produção de ácido cítrico, e a casca de pinhão e capa de pupunha para produção de carvão vegetal (ALVES, 2015; BISPO et al., 2014; FIGUEIREDO, 2014; GOTTI et al., 2013; MELO et al., 2015; ROSA et al., 2011).

3.2.1 Água de maceração de milho

O processo de beneficiamento do milho pode ser realizado por via seca ou úmida. No processo a seco, retira-se o gérmen do grão para ser usado na indústria de alimentos. No processo por via úmida, onde é obtido o amido, o grão passa pelo processo de maceração, onde há a separação do gérmen, fibras e endosperma. O subproduto deste processo é chamado de milhocina ou água de maceração de milho, que contém grande quantidade de matéria orgânica e nitrogênio, entre outros nutrientes. Por possuir elevada quantidade de matéria orgânica, a milhocina é um dos grandes problemas de tratamento para as indústrias (ABIMILHO, 2014; LIGGETT; KOFFLER, 1998).

A milhocina tem pH que varia de 3,7 a 4,5. Os teores de glucose chegam a 5% e de ácido láctico variam entre 5 e 15%, devido a um processo fermentativo que se inicia logo após a sua geração. O valor de DQO pode variar de 3600 mg.L⁻¹ a 14000 mg.L⁻¹. O teor de Nitrogênio Total (NT) tem valor médio de 1026 mg.L⁻¹ e de Sólidos Totais (ST) em torno de 7819 mg.L⁻¹ (LIGGETT; KOFFLER, 1998; LOSS et al., 2009).

A composição da milhocina varia com a condição e qualidade do grão de milho usado no processamento, porém sempre há a presença de açúcares redutores, como glucose e frutose, aminoácidos, como prolina e cisteína, além de minerais e vitaminas, que são fonte de nutrientes para microrganismos. A presença de ácido láctico resultada fermentação que ocorre durante o processo de maceração. A milhocina tem sido usada na fabricação de ração para ruminantes, como fonte de nitrogênio para aves e fonte de nutrientes para o processo de fermentação industrial para produção de antibióticos (AMARTEY, JEFFRIES, 1994; BERGER et al. 2014; FILIPOVIC, RISTIC, SAKAC, 2002; GAO, YUAN, 2011; LIGGETT, KOFFLER, 1998; YANG et al., 2013).

3.2.2 Soro de leite

O soro de leite é um subproduto de laticínios gerado pela coagulação e redução do pH do leite. Tem grande disponibilidade e possui alta qualidade nutricional, pois é rico em proteínas solúveis, aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais (BARBOSA et al., 2010; LIZIEIRE; CAMPOS, 2014). No Brasil, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (Abiq), são produzidas cerca de 850 mil toneladas de queijo por ano, o que gera cerca de $6,8 \times 10^{10}$ litros de soro por ano, já que são gerados 8 litros de soro/quilo de queijo produzido. Indústrias que não apresentam estrutura adequada para recuperação do soro, possuem um efluente com teores mais elevados de matéria orgânica devido à presença de lactose, que é um dissacarídeo composto por glucose e galactose, e por isso deve ser tratado separadamente dos outros efluentes gerados no processamento do leite (MAGANHA, 2006; ROHFES et al, 2011; SANTIAGO, 2013). O soro é constituído de água (93%) e de sólidos (7%). Os sólidos são compostos por lactose (71%), proteína bruta (10%), gordura (12%) e sais minerais (11%) (LIZIEIRE; CAMPOS, 2014).

O soro de leite é considerado um produto de elevado valor nutricional e que movimentava o mercado nacional. Estudos e investimentos têm sido feitos para reaproveitar ao máximo esta matéria-prima. Vem sendo utilizado industrialmente em vários processos por meio de evaporação, concentração e fermentação, para elaboração de novos produtos ou como ingrediente nas indústrias de bebidas, panificação e sobremesas lácteas. A partir do soro pode ser obtido o soro de leite

em pó, lactose ou proteínas do soro, soro fermentado e soro com baixa concentração de lactose. A lactose presente no soro pode ser fonte energética para vários processos biotecnológicos, como para obtenção de álcool. O soro em pó também pode substituir o leite em pó em produtos panificados e sorvetes, tendo um bom desempenho industrial (MAGANHA, 2006; MIZUBUTI, 1994; ROHFES et al., 2011; SANTIAGO, 2013).

3.2.3 Efluente da produção de ração animal

Em 2002 a indústria de nutrição animal cresceu 7,17%, com um faturamento de mais de US\$ 7 bilhões. Porém, com o aumento dos preços de matérias-primas, os produtores de ração animal tiveram que readequar seus produtos, sem perder a qualidade dos mesmos. Com isso a utilização de subprodutos industriais para fabricação de ração animal se tornou uma opção viável. Estes subprodutos são constituídos por penas, ossos, gorduras, vísceras e sobras de carnes do abate e processamento de frangos, suínos e perus (BELLAYER, 2001; MOREIRA, 2013; WOSIACK et al., 2013).

A produção da farinha animal consiste basicamente na cocção dos subprodutos em digestores, com ou sem pressão, por tempo variável dependendo do processo, separando a fração gordurosa, através de drenagem, prensagem ou centrifugação, do resíduo sólido, que é moído de acordo com a granulometria requerida pelas especificações da empresa. O efluente gerado nesse processo é muito poluente e é composto por resíduos originários da purga das caldeiras e da lavagem de pisos e equipamentos, e pode ter a presença de sangue, gorduras, pelos, penas, carne, osso, pedaços de órgãos internos, vísceras e microrganismos que podem causar malefícios aos seres humanos. Em estudo realizado por Wosiack et al. (2013) este efluente apresentou teores de Demanda Química de Oxigênio (DQO) de 10528 mg.L⁻¹, Nitrogênio Total (NT) de 1927 mg.L⁻¹ e Nitrogênio Amoniacal de 1383 mg.L⁻¹ (BELLAYER, 2001; MOREIRA, 2013; WOSIACK et al., 2013). Devido aos elevados teores de DQO e NT, este efluente deve passar por tratamento antes de ser lançado em corpos d'água.

3.3 ÁCIDO PROPIÔNICO

Devido às preocupações com os custos e ao impacto ambiental dos combustíveis fósseis, a produção sustentável de produtos químicos a partir de matérias-primas de origem renovável tem sido meta de muitas empresas. O ácido propiônico, ou ácido propanóico, é obtido principalmente da indústria petroquímica, através da oxo-síntese ou através da oxidação em fase líquida de propano, propionaldeído ou propanol. Sua produção atual sofre oscilações pela variação das matérias primas como propano e gás natural. O processo de oxo-síntese envolve uma reação de etileno e monóxido de carbono para obter propionaldeído, um intermediário, o qual é posteriormente oxidado para se obter, finalmente, o ácido propiônico. Embora a síntese química seja economicamente viável, o petróleo é um recurso finito e de alto custo. Os desafios e restrições para seu uso estão cada vez maiores, incluindo a oferta limitada de petróleo e a necessidade de catalisadores complexos. Com o aumento da poluição, existem estudos para aperfeiçoar a sua produção de forma ambientalmente adequada. Uma das alternativas estudadas é a produção do ácido propiônico a partir de processos fermentativos que utilizam resíduos agroindustriais como substrato (DISHISHA; ALVAREZ; HATTI-KAUL, 2012; GONZALEZ; CLOMBURG, 2013; MAGALHÃES et al., 2014; SUWANNAKHAM; YANG, 2005; YANG; EL-ENSASHY; THONGCHUL, 2013; ZHUGE et al., 2014).

Este ácido orgânico possui um alto valor agregado. Em 2009, a demanda mundial de ácido propiônico foi de 293,4 mil toneladas, representando um mercado de aproximadamente 530 milhões de dólares (BIZZARI; GUBLER, 2004). Uma das maiores produtoras de ácido propiônico mundial, a BASF, produz este ácido e seu propionato para conservação de grãos. No Brasil, de acordo com o banco de dados Alice Web (2016), a importação de ácido propiônico quase dobrou nos últimos 5 anos, atingindo em 2015 o valor de aproximadamente 4,3 mil toneladas de ácido propiônico.

Alguns fatores tornam a produção de ácido propiônico por processos fermentativos interessante quando comparado à rota petroquímica. Porém, a baixa concentração e rendimento do produto obtido pelos processos fermentativos são pontos negativos. Assim, torna-se necessário o aperfeiçoamento do processo de produção para que seja eficiente e competitivo com o processo químico (LIND;

JONSSON; SCHNURER, 2005; MOCKAITIS et al., 2012; ZHANG; YANG, 2009; ZHUGE et al., 2014).

O ácido propiônico possui fórmula molecular $C_3H_6O_2$, é incolor, levemente ácido-picante e com forte odor. Este ácido carboxílico e seus sais podem ser utilizados como ingredientes na formulação de vários produtos como termoplásticos, herbicidas, aromatizantes, medicamentos, perfumes e solventes. Os sais do ácido propiônico foram listados como conservantes que pertencem à categoria conhecida como aditivos alimentares seguros pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (2015). Devido a isso, existe um grande interesse na produção de ácido propiônico por via fermentativa. Seu éster é muito utilizado como um aditivo para aroma artificial de fruta, como citronela e geranyl propionato (BOYAVAL; CORRE, 1995; GOSWAMI; SRIVASTAVA, 2000; SUWANNAKHAM; YANG, 2005; ZHANG; YANG, 2009; LIU, MA, XU, 2012). O ácido propiônico também é usado para evitar a proliferação de mofo e formação de elementos filamentosos na indústria de panificação, pois afeta a permeabilidade da membrana (VALSECHI, 2006). Tem grande importância na preservação de cereais ensilados e rações animais, pois possui ação fungicida e bactericida. Seus sais são usados na conservação de queijos e produtos panificados. Mais de 65% da demanda total de ácido propiônico é para produção de seus sais de cálcio e sódio que são utilizados na alimentação animal, conservação de grãos e para conservação de alimentos (SUWANNAKHAM; YANG, 2005). Em trabalho realizado por Tinzi-Malang et al. (2015), foi utilizado ácido propiônico para aumentar o prazo de validade e melhorar a textura em produtos panificados. O ácido propiônico, segundo o Departamento de Energia dos EUA, está entre os 30 melhores produtos químicos utilizados como componentes para produtos com diversas aplicações (DISHISHA; ALVAREZ; HATTI-KAUL, 2012; ZHUGE et al., 2014).

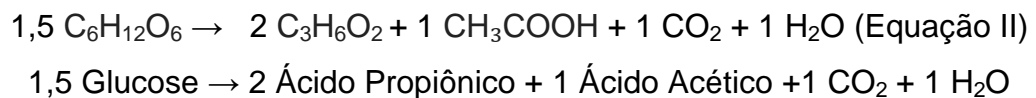
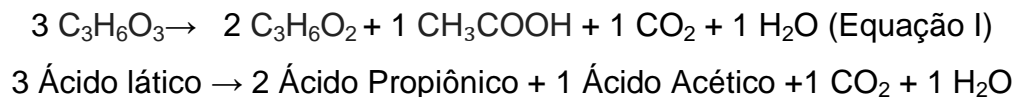
Novas aplicações têm sido estudadas para o ácido propiônico, como produção de solventes não poluentes ao ar que podem substituir poluidores como xilenos e certas cetonas, obtidos através da sua esterificação. Outra potencial alternativa é para suplementação de dietas de ruminantes, visto que estudos *in vitro* e *in vivo* mostram resultados benéficos ao ruminante, como aumento da digestibilidade de forragens por microrganismos ruminais e aumento do rendimento de leite (DOSSIÊ CONSERVANTES, 2014; GOULARTE et al., 2011; MELO, 2007).

3.4 PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO POR PROCESSO FERMENTATIVO

A fermentação é uma rota ambientalmente adequada para produção de ácido propiônico, pois pode utilizar substratos de baixo custo, como biomassa e resíduos agroindustriais, entre eles soro de leite e água de maceração de milho, reduzindo a eliminação desses resíduos na natureza. Outro fator interessante é que o ácido propiônico obtido deste processo é considerado natural e também pode ser utilizado para conservação de alimentos e rações (SUWANNAKHAM; YANG, 2005).

O ácido propiônico é produzido por duas principais vias: via do succinato, conhecida também como via dos ácidos dicarboxílicos, em que o CO₂ é fixado ao piruvato para formar o succinato, o qual é subsequentemente descarboxilado para propionato; e a via de acrilato, em que o ácido propiônico é produzido a partir de acrilato, com o lactato como um precursor. As diferenças entre as duas vias estão nos intermediários formados e na quantidade de energia derivada de cada via (MELO, 2007).

A equação estequiométrica da formação de ácido propiônico por *Propionibactéria* foi primeiramente descrita por Fitz, em 1978, a qual é conhecida por Equação de Fitz (BOYAVAL; CORRE, 1995):

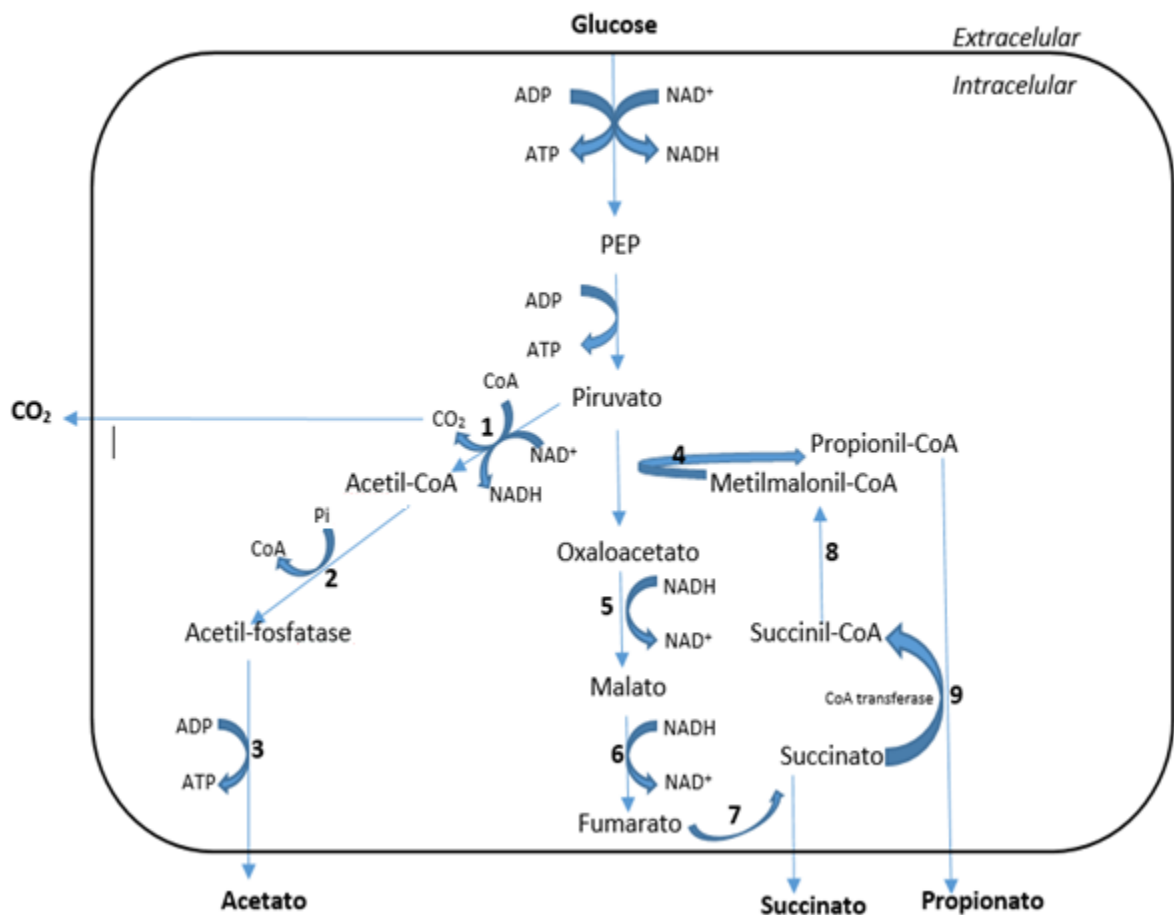


Teoricamente, o rendimento máximo de ácido propiônico a partir da glucose é de 54,8% (g/g), tendo a proporção de 2:1 (mol/mol) entre os ácidos propiônico e acético. Porém, na prática, o rendimento é inferior, pois parte do substrato é consumido para crescimento celular (BOYAVAL; CORRE, 1995).

As Propionibactérias produzem ácido propiônico a partir da via heterofermentativa, conhecida como ciclo dos ácidos dicarboxílicos. Na Figura 1 é apresentado a produção de ácido propiônico a partir da glucose, obtendo acetato, succinato e dióxido de carbono como subprodutos. Já na Figura 2, é apresentado a via de produção do ácido propiônico a partir do lactato como fonte de carbono.

Porém os rendimentos podem variar com as condições de fermentação e são altamente dependentes do pH. O ácido propiônico pode ser produzido diretamente a partir do soro de leite pela fermentação da lactose, gerando ácido propiônico, ou convertendo a lactose em lactato, para então fermentar o lactato a propionato através da Propionibactéria. Há relatos de que o lactato tem sido preferido como substrato à glucose e lactose para a produção do ácido propiônico (BARBIRATO, CHEDAILLE, BORIES, 1997; LEWIS, YANG, 1992; ZHANG; YANG, 2009).

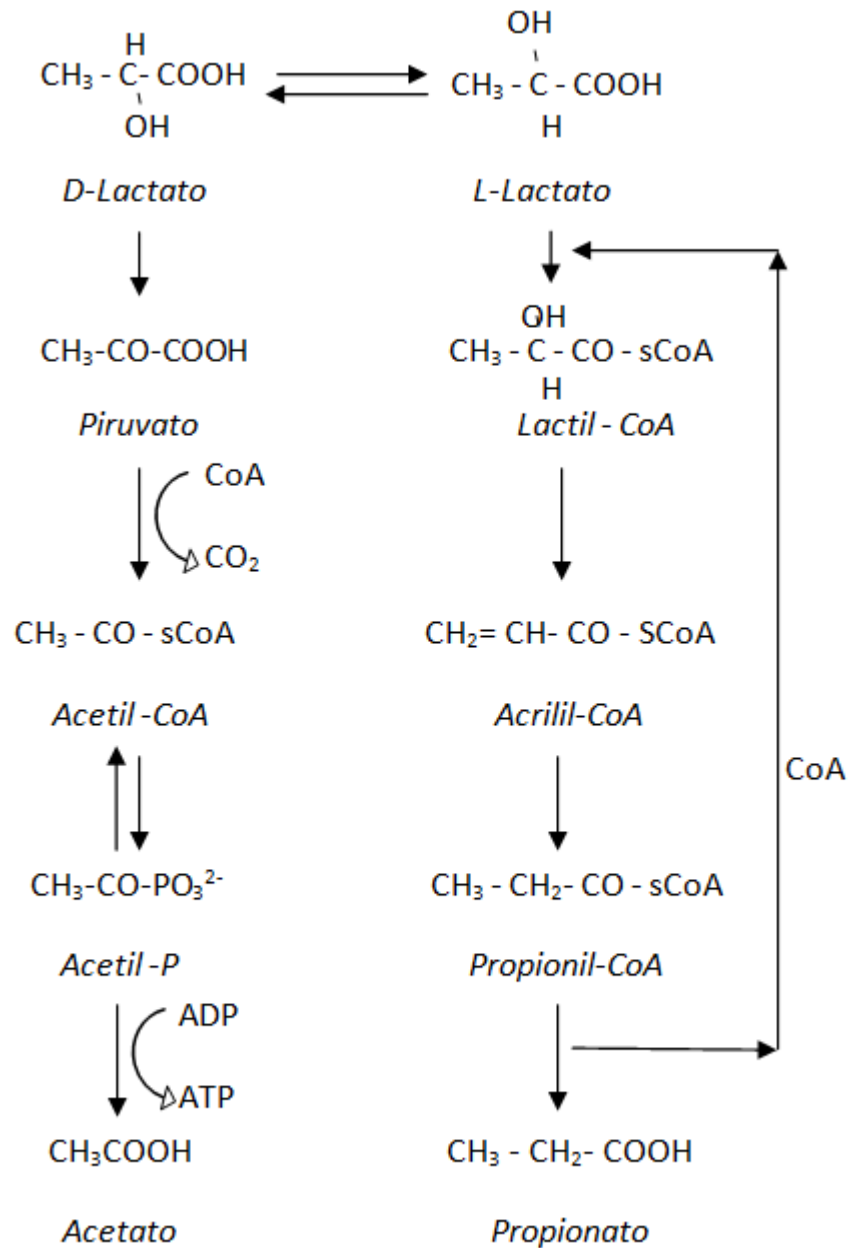
Figura 1: Via dos ácidos dicarboxílicos por Propionibactérias.



Fonte: Adaptado Zhang (2009).

Os números representam as enzimas que catalisam as reações correspondentes: 1. Complexo piruvato desidrogenase; 2. Fosfotransacetilase; 3. Acetato quinase; 4. Oxalacetato transcarboxilase; 5. Malato desidrogenase; 6. Fumarase; 7. Succinato desidrogenase; 8. Metilmalonil isomerase; 9. CoA transferase.

Figura 2: Produção de ácido propiônico a partir do lactato.



Fonte: RHEM e REED (1981).

3.4.1 Cultura propiônica

As Propionibactérias são utilizadas para produção do ácido propiônico, queijos com olhaduras, vitamina B12 e probióticos. Na produção de queijos com olhaduras, a Propionibactéria consome o lactato do meio e produz ácido propiônico, ácido acético e CO₂. Os ácidos produzidos, junto com metabólitos de catabolismo de

aminoácidos, são os responsáveis pelo sabor do queijo. Já o CO₂ formado é responsável pelos orifícios no corpo do queijo, que são chamados de "olhaduras" (GARDNER, CHAMPAGNE, 2005; SCHUCK et al., 2013; SUWANNAKHAM, YANG, 2005; ZHANG; YANG, 2009). Há várias espécies de Propionibactérias, entre elas a *P. acidipropionici*, *P. shermanii*, *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, *P. freudenreichii* subsp. *Freudenreichii*. Porém a espécie *P. acidipropionici* é a mais utilizada para produção do ácido propiônico (SUWANNAKHAM, YANG, 2005).

A Propionibactéria é anaeróbia facultativa, mesófila, gram-positiva, não-esporulada, sem motilidade e pode metabolizar diferentes fontes de carbono para obtenção do ácido propiônico, como lactose, sacarose, ácido láctico, glicose, xilose e glicerol. É através da fermentação destes compostos que a Propionibactéria obtém energia e forma, além do ácido propiônico, subprodutos como ácido acético, ácido succínico e dióxido de carbono. Ácido pirúvico é produzido e acumulado no caldo de fermentação, o qual é consumido para produzir ácidos succínico e acético (ARGAÑARAZ-MARTÍNEZ et al., 2013; EL-ENSASHY; THONGCHUL, YANG 2013; FILIPPONE; SINIGAGLIA; ALTIERI, 2014; GOSWAMI; SRIVASTAVA, 2000; LIND; JONSSON; SCHNURER, 2005).

3.4.2 Requerimento nutricional e parâmetros do processo

As condições de pH ótimas para crescimento bacteriano estão no intervalo de pH de 6 a 7, porém é relatado que 6,5 é o pH ideal para produção de ácido propiônico. A faixa de temperatura é de 30 a 37°C, sob condições anaeróbias. Em pH abaixo de 4,5, não há crescimento e atividade celular. No meio fermentativo deve haver uma fonte de carbono, fonte de nitrogênio e nutrientes para crescimento e manutenção celular e formação de produtos. Cátions metálicos, como Mg²⁺ e Mn²⁺, agem como catalisadores na produção de ácido propiônico, aumentando a eficiência do metabolismo celular, porém as Propionibactérias têm baixas necessidades nutricionais, conseguindo manter sua viabilidade em diversas condições ambientais (FILIPPONE; SINIGAGLIA; ALTIERI, 2014; FREITAS et al., 2015; GOSWAMI; SRIVASTAVA, 2000; SUWANNAKHAM; YANG, 2005).

3.4.3 Inibição da produção de ácido propiônico

As principais dificuldades encontradas no processo de fermentação para obtenção do ácido propiônico são o lento crescimento das bactérias, a forte inibição pelo produto final, a baixa produtividade e rendimento e a dificuldade na recuperação do produto a partir do caldo de fermentação no qual ele foi produzido, o que encarece o custo do processo. Então é importante aperfeiçoar uma tecnologia de fermentação para uma produção econômica de ácido propiônico. Elevar a concentração do produto final iria facilitar a sua separação e recuperação e, assim, reduzir custos de produção (GOSWAMI; SRIVASTAVA, 2000; RICKERT; GLATZ; GLATZ, 1998; SUWANNAKHAM; YANG, 2005).

Um dos fatores que inibe a produção por fermentação do ácido propiônico é o próprio ácido propiônico, pois ele tem um forte efeito inibidor no crescimento da Propionibactéria e na produção do ácido, mesmo com uma concentração muito baixa, como de 2 g.L^{-1} , como resultado da sua atividade antimicrobiana. O que ocorre é que o ácido propiônico perturba o gradiente de pH através da membrana celular, e este gradiente é uma força essencial para os anaeróbios facultativos, como é o caso das Propionibactérias, para fazer o transporte de nutrientes e metabólitos dentro e fora das células bacterianas. Manter um gradiente de pH constante é necessário para as células numa condição normal (MELO, 2007).

A membrana citoplasmática impede que compostos ionizados difundam-se para dentro das células bacterianas e apenas o ácido propiônico não dissociado é capaz de se difundir através da membrana bacteriana para o citoplasma. Com um pH alcalino no interior do citoplasma, o ácido não dissociado, na seqüência, é dissociado em um próton e um ânion de propionato, criando uma fuga para os prótons para dentro. Para manutenção da homeostasia celular, H^+ -ATPase transporta ativamente prótons para fora da célula, levando a diminuição da energia disponível para as demais atividades metabólicas. Isto deixa menos ATP para o metabolismo celular, o que inibe o crescimento celular e produção de ácido propiônico (ADAMS, 1999; GOSWAMI, SRIVASTAVA, 2000; GU, GLATZ, GLATZ, 1998; MELO, 2007).

O excesso de ácido propiônico presente no meio, além de diminuir a produção do ácido propiônico, causada pela alteração no metabolismo das bactérias, provoca maior geração de subprodutos, como o ácido acético e succínico (SUWANNAKHAM; YANG, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SUBSTRATO

Os subprodutos agroindustriais utilizados como substrato para a produção de ácido propiônico foram a milhocina (M), o soro de leite (SL) e a água residuária do processamento de ração animal (RÇ), obtidos na região dos Campos Gerais, estado do Paraná.

A milhocina foi coletada 48 horas após a imersão do milho no tanque de maceração e foi fornecida pela empresa Farinhas de Milho São José, situada no município de Irati, no Paraná, e que produz farinha de milho do tipo biju. O soro de leite foi obtido do processo de produção de queijo mussarela da empresa Queijos Niemeyer, situada em Castro. A água residuária do processamento de ração animal foi obtida da empresa Focam, localizada em Carambeí. A Focam produz ração animal utilizando como matéria-prima subprodutos do abate de animais. O efluente foi coletado após processo de floculação e flotação por ar dissolvido, processo utilizado para remoção de óleos e gorduras, redução de matéria orgânica e sólidos suspensos. Os substratos foram coletados e armazenados em frascos de PET (politereftalato de etileno), mantidos sob congelamento a -18°C até o momento do uso. Todos os substratos, antes de serem utilizados, foram autoclavados a 121°C , 1 atm por 20 minutos, filtrados a vácuo em ambiente estéril e estocados a 4°C . Os substratos de todos os ensaios tiveram seu pH padronizado para 6,5 antes de começar a fermentação, utilizando soluções aquosa de $\text{NaOH } 4 \text{ mol L}^{-1}$ ou $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$.

4.2 CULTURA PROPIÔNICA

A cultura propiônica utilizada foi a cepa reativada *Propionibacterium acidipropionici* CCT 4843, da Orla- Jensen, adquirida da Fundação André Tozello - Coleção de Culturas Tropical. A cultura foi repicada em meio de conservação proposto por CALDERÓN (2012). Uma alçada da cepa reativada foi transferida para tubos de ensaio com tampas de rosca, contendo 8mL de meio de conservação. Estes tubos foram incubados em estufa a 30°C por 48 horas. O meio de conservação foi composto por 1% de glucose, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de

peptona, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e 0,1% das soluções 1 e 2 de micronutrientes. Em ambos os meios, o pH foi ajustado para 7, antes de serem autoclavados, com solução aquosa de NaOH 1 mol.L^{-1} ou HCL 1 mol.L^{-1} . A solução 1 de micronutrientes era composta por 1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25% de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5% de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,5% de $\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. A solução 2 de micronutrientes era composta por 1% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1% de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. No preparo das duas soluções foi utilizada água purificada em sistema Milli-Q.

4.3 FERMENTADOR

Os fermentadores utilizados foram vidros de borossilicato Duran® com tampa de rosca e volume de 250mL (Figura 3), que foram operados em regime de batelada. A fermentação ocorreu em estufa, com controle de temperatura de 35°C e sem agitação. O pH foi monitorado a cada 24 horas durante o processo fermentativo.

Figura 3: Frasco de vidro de borossilicato Duran®



4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A composição dos substratos foi determinada pelas análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH, Nitrogênio Total de Kjeldahl (NTK), Nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+), Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Fixos (STF), Sólidos Totais Voláteis (STV), Sólidos Suspensos Totais (SST), Sólidos Suspensos Fixos (SSF), Sólidos Suspensos Voláteis (SSV), todos descritos em APHA (1998). O perfil de açúcares e ácidos orgânicos foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A determinação de açúcares e ácidos orgânicos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando uma coluna de exclusão iônica Aminex HPX-87H (300x7.8 mm) precedida por pré-coluna catiônica Cation-H (Bio-Rad) em condição isocrática. Foi utilizado como eluente uma solução 3mM de ácido sulfúrico, preparada em água ultrapura e filtrada em filtro de nylon de 45µm. Foi utilizado um detector de índice de refração (IR). O volume de injeção foi de 10µL a um fluxo de 0,6mL min⁻¹. A coluna foi mantida a 60°C e o detector de índice de refração foi mantido a temperatura de 35 °C. As amostras foram previamente filtradas em filtro de seringa 0,22µm. Os dados cromatográficos foram obtidos com o software Empower® 2.

Para identificação dos ácidos orgânicos e açúcares presente nas amostras, primeiramente foi realizado análise em CLAE com os padrões dos ácidos succínico, láctico, acético e propiônico, todos a 1,2%, 0,9%, 0,75%, 0,6%, 0,45% e 0,3%, e dos padrões de lactose, galactose e glucose, todos a 0,8%, 0,6%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% e 0,05%, obtendo-se as informações presentes na Tabela 1. A partir dos resultados obtidos pelo cromatograma, foi montada a equação para cada um dos padrões estudados. A equação foi formulada a partir da concentração versus área. A equação obtida foi utilizada para determinar a concentração de padrão presente nos ensaios após a fermentação.

Tabela 1: Padrões de ácido orgânicos e açúcares.

Padrão	Equação*	r²	Tempo de retenção (min)
Ácido succínico	y=805559x-9633	0,99	11,77
Ácido láctico	y=581875x-23173	0,99	12,91
Ácido acético	y=335898x-9822,1	0,99	15,27
Ácido propiônico	y=408267x-10443	0,99	17,81
Lactose	y=861771x-15868	0,99	7,91
Glucose	y=774786x-12308	0,99	9,27
Galactose	y=957032x-37051	0,99	9,85

*y=área; x=concentração do padrão.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

A quantificação da biomassa presente no fermentado foi realizada pela análise de Sólidos Suspensos Totais (SST), conforme descrito em APHA (1998).

4.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados dois planejamentos experimentais. O primeiro experimento consistiu em um planejamento de misturas com três componentes, no qual foi avaliado a composição de substrato a qual obteve a melhor resposta para rendimento (g de produto formado. g de substrato consumido⁻¹) e produtividade de ácido propiônico (g de ácido propiônico produzido.L⁻¹.h⁻¹). Após obtida a melhor proporção de mistura de substratos, foi realizado um segundo planejamento no qual foram avaliadas a influência das variáveis Tempo de Detenção Hidráulica (TDH) , concentração inicial de inóculo e correção inicial de pH para a mistura escolhida no planejamento experimental anterior. Nos mesmos parâmetros descritos acima, esses parâmetros foram calculados pelas equações 1 e 2. Foi considerado como substrato a soma de glucose, galactose, lactose e ácido láctico. Para cálculo do rendimento foi utilizada a Equação 1 (DORAN, 1995):

$$Y_{p/s} = \frac{(P_1 - P_0)}{(S_0 - S_1)} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

Y_{p/s}: Rendimento de ácido propiônico(g de produto formado.g de substrato consumido⁻¹);

P₀ e P₁: Concentração inicial e final de produto, respectivamente (g.L⁻¹);

S₀ e S₁: Concentração inicial e final de substrato, respectivamente (g.L⁻¹).

Para cálculo da produtividade volumétrica de produto, foi utilizada a Equação 2(DORAN, 1995):

$$Q_p = \frac{P_1 - P_0}{t_1 - t_0} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

Q_p: Produtividade volumétrica de ácido propiônico (g.L⁻¹.h⁻¹);

P0 e P1: Concentração inicial e final de produto, respectivamente (g.L^{-1});
 t0 e t1: Tempo inicial e final de fermentação (h).

4.7.1 Planejamento de misturas

Este planejamento teve por objetivo avaliar a influência das misturas dos resíduos estudados na produção de ácido propiônico, com relação ao rendimento e produtividade. Foi realizado um planejamento de misturas ternárias do tipo Simplex Centróide aumentado, totalizando 10 ensaios, no qual a soma das proporções dos componentes das misturas é 1,0 (BARROS et al., 2001). A matriz do planejamento foi obtida a partir do Software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Tulsa OK, USA) para *Windows*. O volume utilizado do fermentador foi de 250 mL, e a fermentação ocorreu em TDH de 78h, temperatura de 35°C, pH inicial do substrato corrigido para 6,5 e adição de 20mL.L^{-1} de cultura propiônica em suspensão. Foram coletadas amostras a cada 24 horas para monitoramento do processo. Na Tabela 2 está apresentado o planejamento experimental de misturas, mostrando as diferentes proporções de volume dos substratos.

Tabela 2: Matriz do planejamento de misturas Simplex Centróide aumentado com três componentes

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais (mL)		
	M	SL	RÇ	M	SL	RÇ
1	1,0	0	0	250	0	0
2	0	1,0	0	0	250	0
3	0	0	1,0	0	0	250
4	0,5	0,5	0	125	125	0
5	0,5	0	0,5	125	0	125
6	0	0,5	0,5	0	125	125
7	0,667	0,167	0,167	166,75	41,75	41,75
8	0,167	0,667	0,167	41,75	166,75	41,75
9	0,167	0,167	0,667	41,75	41,75	166,75
10	0,333	0,333	0,333	83,25	83,25	83,25

4.7.2 Planejamento fatorial fracionado 3^{3-1}

Após definida a melhor proporção entre os resíduos para produção do ácido propiônico, a próxima etapa foi verificar como as variáveis TDH, concentração de inóculo e correção inicial de pH afetavam a produção de ácido propiônico (Tabela 3). Foi realizado um planejamento fatorial fracionado 3^{3-1} , totalizando 9 ensaios (BARROS et al., 2001). A matriz do planejamento foi obtida a partir do Software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, Tulsa OK, USA) para Windows. O processo fermentativo ocorreu na temperatura de 35°C, sem agitação e em batelada.

Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial fracionado 3^{3-1} .

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	TDH	Concentração de inóculo (mL.L ⁻¹)	pH inicial	TDH	Concentração de inóculo (mL.L ⁻¹)	pH inicial
1	-1	-1	-1	60	10	6,0
2	-1	0	1	60	20	7,0
3	-1	1	0	60	30	6,5
4	0	-1	1	78	10	7,0
5	0	0	0	78	20	6,5
6	0	1	-1	78	30	6,0
7	1	-1	0	96	10	6,5
8	1	0	-1	96	20	6,0
9	1	1	1	96	30	7,0

4.7.3 Análise estatística

Para as análises realizadas em triplicata, os resultados foram expressos como média +/- desvio padrão da média. Foram avaliados os dados experimentais quanto à normalidade, segundo teste de Shapiro-Wilk, e homogeneidade pelo Teste de Levene. Para os dados considerados normais e homogêneos ($p > 0,05$), foi realizada análise de variância (Anova, p -valor $< 0,05$ foi considerado significativo) seguido do teste de Tukey (ao nível de significância de 95 %) para comparação de médias

(GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014). Para avaliar os efeitos quantitativos das variáveis independentes sobre as respostas do delineamento experimental Simplex Centróide e do planejamento fatorial fracionado 3^{3-1} , foi aplicada a Metodologia de Superfície de Resposta. A qualidade estatística foi avaliada por meio do coeficiente de determinação (R^2) e do coeficiente ajustado (R^2 - adj) (BARROS et al., 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EFLUENTES

Os resultados de caracterização dos efluentes utilizados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização físico-química dos efluentes de produção de ração animal, milhocina e soro de leite

Parâmetro (mg.L ⁻¹)	RÇ	M	SL
DQO	28239 ± 1039,14 ^b	19080± 1616,30 ^c	76737± 3317,68 ^a
pH*	5,77 ± 0,06 ^a	4,00 ± 0,10 ^c	5,03 ± 0,06 ^b
N-NH ₄	5255 ± 70,91 ^a	101 ± 3,39 ^c	303± 7,05 ^b
NTK	6673 ± 76,44 ^a	742 ± 25,41 ^c	1443 ± 32,01 ^b
ST	4119 ± 55,94 ^c	15623 ± 230,48 ^b	46537± 745,32 ^a
STF	1543 ± 46,86 ^c	5942 ± 104,54 ^b	9471 ± 1179,68 ^a
STV	2575± 95,04 ^c	9680 ± 149,89 ^b	37066 ± 1639,16 ^a
SST **	344	282	576
SSV **	238	109	380
SSF **	106	173	196

*Adimensional; **Não realizado em triplicata.

*** Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os parâmetros avaliados neste estudo são de extrema importância. Com relação ao pH, ele indica o estado de neutralidade do efluente, pois se estiver fora da faixa de 5 a 9, pode afetar o crescimento microbiano durante o tratamento do efluente e também o corpo receptor do mesmo. Através da análise de sólidos totais é possível verificar a eficiência do processo de remoção de sólidos do efluente. A presença de sólidos em suspensão no efluente pode acarretar no abrigo de

microorganismos patogênicos, e além disso, sólidos dissolvidos alteram o sabor e odor da água, deixando-a inadequada para aplicações industriais. A elevada presença de matéria orgânica no efluente pode acarretar no rápido esgotamento do oxigênio dissolvido, o qual é vital para processos tanto químicos como biológicos do sistema. A presença de nitrogênio pode indicar a presença de matéria orgânica, e é importante para controle da poluição das águas, pois ele é utilizado para crescimento microbiano e de algas, e na forma de amônia (NH_3) é tóxico aos peixes. Além disso, a sua presença na forma de nitrato é associado a doenças como a metahemoglobinemia. Por isso o tratamento de efluentes deve ser projetado para converter o nitrogênio na forma N_2 , evitando estes problemas (SANTOS, 2008, FORESTI et al, 2010).

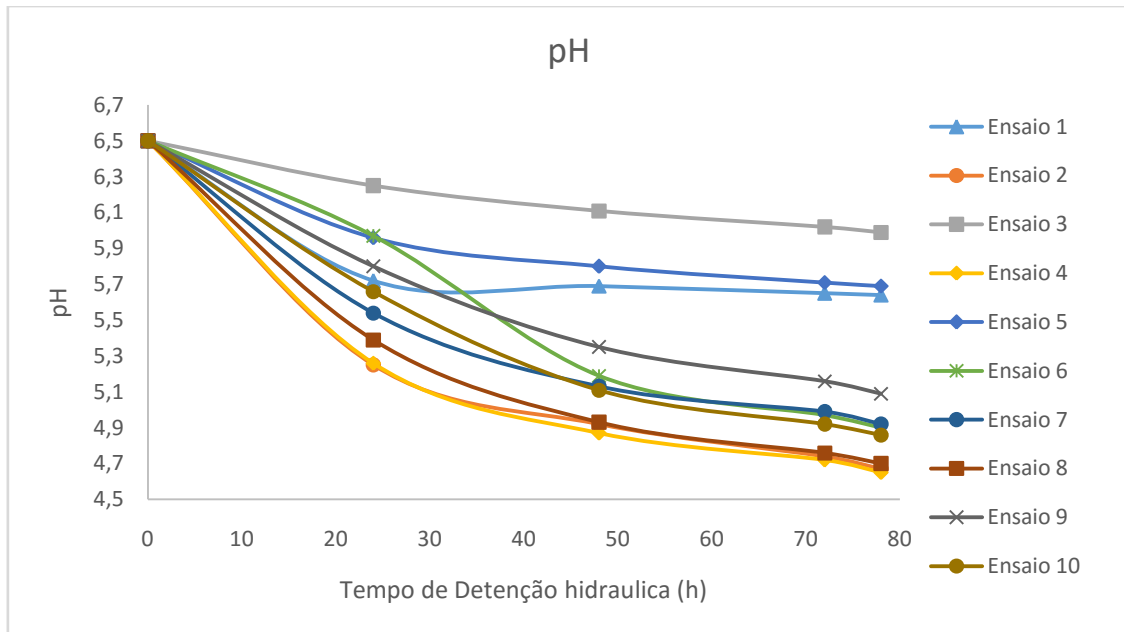
Apesar de resultados de caracterização distintos, os três efluentes apresentam em comum teores de DQO e Nitrogênio Amoniacal fora dos padrões de lançamento exigidos pela Resolução CONAMA nº 430/2011 e Resolução SEMA nº 021/2009, com limites de DQO de até 225mg.L^{-1} e Nitrogênio Amoniacal Total de 20mg.L^{-1} . Para o pH (entre 5 a 9), apenas a milhocina ficou fora do limite estabelecido pela legislação (PARANÁ, 2009; BRASIL, 2011). Assim, todos eles necessitam de tratamento antes de serem lançados a um corpo d'água. A reutilização destes efluentes como fonte de nutrientes é interessante, pois além de se valorizar um subproduto que era considerado descarte, também é possível diminuir os custos de tratamento dos efluentes, seja com a redução do volume de efluentes a ser tratado e/ou da quantidade de reagentes químicos e etapas para tratamento dos mesmos.

5.2 RESULTADO DO PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Na Figura 4 pode-se avaliar o comportamento do pH das amostras em relação ao tempo de detenção hidráulica (TDH). Pode-se perceber o declínio do pH ao longo do processo fermentativo. Nos ensaios em que o soro de leite estava presente em maior porcentagem, o pH final apresentou seu menor valor, indicando maior produção de ácidos nesses ensaios. O ensaio que apresentou o menor declínio foi o 3, com pH final de 5,99; e o ensaio 4 que obteve a maior formação de ácidos, com pH final com valor de 4,65. Pode-se notar redução dos valores de pH em todos os ensaios, podendo-se afirmar que houve consumo de substrato com

consequente produção de ácidos orgânicos em todos eles, principalmente durante as primeiras 24 horas do processo.

Figura 4: Variação do pH ao longo do processo fermentativo



Nas primeiras 24 horas de TDH os valores de pH diminuíram em todos os ensaios. A queda do pH indica que está havendo produção de ácidos orgânicos. As bactérias propiônicas apresentam pH ótimo de crescimento na faixa de 6,0 a 7,0, e abaixo desta faixa de pH, o crescimento celular e a produtividade podem ser afetados negativamente.

A *Propionibacterium acidipropionici* CCT 4843 metabolizou a lactose, galactose, glucose e o ácido láctico presentes nos substratos estudados. O consumo destes nutrientes pode ser visualizado na Tabela 5, que mostra a quantidade de nutrientes presentes no início e no final do processo fermentativo, e na Figura 5, que mostra o consumo de nutrientes ao longo da fermentação.

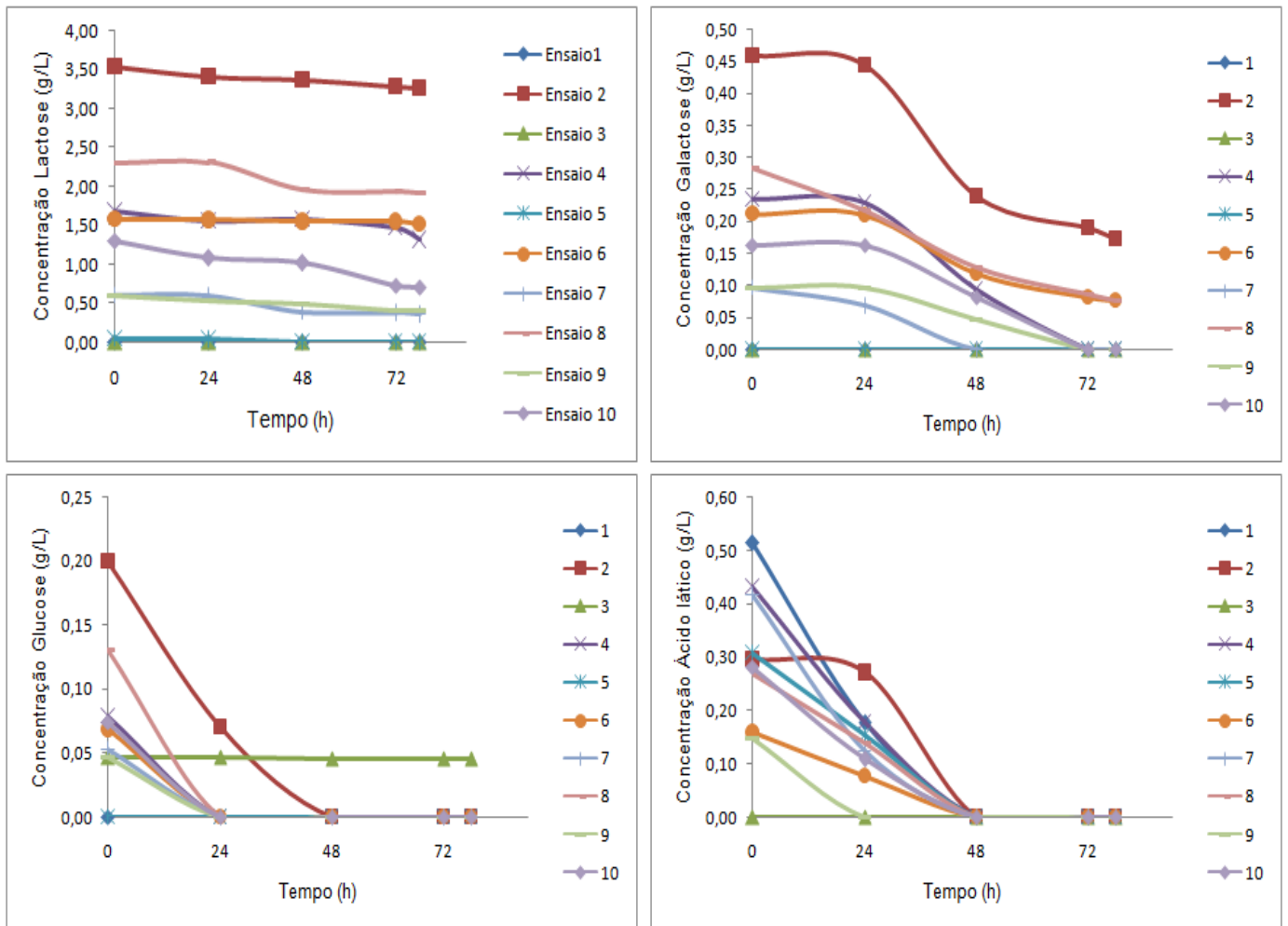
Tabela 5. Concentrações de nutrientes nos tempos de detenção hidráulica de 0 e 78h.

Ensaio	Lactose (g.L ⁻¹)		Galactose(g.L ⁻¹)		Glucose(g.L ⁻¹)		Ácido Láctico	
	0h	78h	0h	78h	0h	78h	0h	78h
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,51±0,02	0
2	3,54 ± 0,00	3,27±0,01	0,46±0,00	0,17±0,00	0,20±0,00	0	0,30±0,00	0
3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,047±0,00	0,046±0,00	n.d.	n.d.
4	1,68±0,00	1,32±0,00	0,23±0,00	0±0,00	0,08±0,00	0	0,43±0,00	0
5	0,04±0,00	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,31±0,01	0
6	1,58±0,00	1,52±0,01	0,21±0,00	0,08±0,00	0,07±0,00	0	0,16±0,00	0
7	0,60±0,00	0,36±0,00	0,10±0,00	0	0,05±0,00	0	0,42±0,00	0
8	2,31±0,01	1,92±0,01	0,28±0,00	0,08±0,00	0,13±0,00	0	0,27±0,00	0
9	0,60±0,00	0,41±0,00	0,10±0,00	0	0,05±0,00	0	0,15±0,00	0
10	1,30±0,01	0,71±0,00	0,16±0,00	0	0,07±0,00	0	0,28±0,00	0

*n.d. = não detectado.

Proporção entre os substratos M/SL/RÇ: 1) 1/0/0; 2) 0/1/0; 3) 0/0/1; 4)0,5/0,5/0; 5)0,5/0/0,5; 6)0/0,5/0,5; 7)0,6/0,2/0,2; 8)0,2/0,6/0,2; 9) 0,2/0,2/0,6; 10)0,33/0,33/0,33.

Figura 5: Concentrações de nutrientes ao longo da fermentação.



Os nutrientes devem passar por transformações para que estejam disponíveis para os microrganismos. A lactose é um açúcar complexo, um dissacarídeo, e não é diretamente metabolizada, assim, a bactéria propiônica, através de enzimas, hidrolisa a lactose obtendo os monossacarídeos galactose e glucose, substratos metabolizáveis por essa bactéria. A glucose presente é o açúcar de mais fácil consumo. Grassi (2012) obteve o mesmo resultado quando utilizou glucose para produção de n-propanol utilizando diferentes linhagens genéticas de *Propionibacterium*.

Observa-se na Figura 5 que o ácido láctico, quando presente, foi completamente consumido, demonstrando ser um nutriente fácil de ser metabolizado pela cultura propiônica. Na via fermentativa o ácido láctico está presente em uma etapa posterior a da glicólise, assim, as bactérias procuram vias mais curtas para obtenção de energia (MOCKAITIS et al., 2012).

Os ácidos orgânicos detectados, além do ácido propiônico, foram o acético e o succínico, que são produtos gerados na fermentação e podem interferir na produção do ácido propiônico. As quantidades de ácidos gerados estão na Tabela 6.

Tabela 6. Produção dos ácidos acético, succínico e propiônico.

Ensaio	Acético (g.L ⁻¹)	Succínico (g.L ⁻¹)	Propiônico (g.L ⁻¹)
1	0,17±0,01 ^a	n.p.	0,40±0,01 ^{bc}
2	0,11±0,00 ^{bc}	n.p.	0,33±0,01 ^d
3	0,00±0,00 ^f	n.p.	0,00±0,00 ^h
4	0,14±0,00 ^{ab}	n.p.	0,51±0,01 ^a
5	0,03±0,00 ^{ef}	n.p.	0,13±0,01 ^g
6	0,08±0,00 ^d	0,02±0,01	0,28±0,01 ^e
7	0,16±0,01 ^a	0,03±0,01	0,41±0,01 ^c
8	0,14±0,00 ^a	n.p.	0,43±0,01 ^b
9	0,09±0,00 ^{cd}	0,02±0,00	0,23±0,01 ^f
10	0,04±0,01 ^e	0,02±0,00	0,23±0,01 ^f
p-ANOVA**	p<0,001	-	p<0,001

*n.p. = não produzido. ** Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único. *** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Proporção entre os substratos M/SL/RÇ: 1) 1/0/0; 2) 0/1/0; 3) 0/0/1; 4) 0,5/0,5/0; 5) 0,5/0/0,5; 6) 0/0,5/0,5; 7) 0,6/0,2/0,2; 8) 0,2/0,6/0,2; 9) 0,2/0,2/0,6; 10) 0,33/0,33/0,33.

Observa-se na Tabela 6 que houve produção de ácido succínico nos ensaios 6,7,9 e 10. A presença do ácido succínico não é interessante, pois na via metabólica dos ácidos dicarboxílicos, o ácido succínico pode ser um produto secundário ou então a enzima Succinil CoA transferase pode agir no ácido succínico, formando o ácido propiônico. Então, se não houver atividade desta enzima, pode ocorrer a diminuição do rendimento de ácido propiônico.

Em algumas amostras foram detectadas presença de ácido acético desde o início da fermentação. O ensaio que apresentou maior produção de ácido acético foi o ensaio 1 seguido dos ensaios 7, 4 e 8. Assim como o ácido succínico, o ácido acético é um produto secundário na via metabólica da produção do ácido propiônico, ambos sendo gerado simultaneamente à produção de ácido propiônico. A geração

de ambos não é interessante no processo, pois além de utilizarem o mesmo intermediário, o piruvato, a ausência destes produtos secundários facilitaria a separação e recuperação de ácido propiônico, reduzindo os custos de produção.

Mesmo ocorrendo a produção de outros ácidos orgânicos, os maiores valores de produção encontrados foram para o ácido propiônico, indicando que as condições empregadas e os nutrientes presentes nos substratos favoreceram a produção de ácido propiônico pela bactéria.

Analisando os dados apresentados na Tabela 6, as maiores produções de ácido propiônico foram obtidas nos ensaios 4, 7 e 8. Pode-se observar que os substratos desses ensaios continham soro de leite e milhocina, com as proporções descritas na Tabela 2. Moreira (2013) e Barbosa et al. (2010) citam que a milhocina e o soro de leite possuem micronutrientes necessários para o desenvolvimento de microrganismos, o que irá influenciar na produção do ácido propiônico. Já os ensaios que apresentaram menor produção do ácido foram os que continham maior concentração de efluente de ração animal.

O rendimento e a produtividade volumétrica de ácido propiônico foram os parâmetros utilizados para analisar o desempenho da fermentação. O rendimento indica a eficiência da conversão do substrato em produto, ou seja, o quanto é produzido de produto a partir de uma certa quantidade de substrato. Já a produtividade volumétrica representa a velocidade de produção, sendo um fator importante para avaliar a viabilidade econômica do processo. Com os resultados apresentados na Tabela 7, observa-se que o rendimento obtido nos ensaios variou entre 0,79 e 0,13 g produto/g substrato; já para produtividade volumétrica, os valores ficaram entre 6,49 a 0,13 $\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Tabela 7. Respostas de produtividade e rendimento do ácido propiônico nos diferentes ensaios.

Ensaio	Produtividade (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)
1	5,20±0,001 ^c	0,79±0,031 ^a
2	4,27±0,013 ^d	0,32±0,004 ^f
3	0,00±0,000 ^h	0,13±0,000 ^h
4	6,49±0,005 ^a	0,46±0,002 ^{cd}
5	1,71±0,003 ^g	0,38±0,015 ^e
6	3,58±0,009 ^e	0,66±0,014 ^b
7	5,28±0,076 ^c	0,50±0,013 ^c
8	5,52±0,045 ^b	0,43±0,011 ^d
9	2,90±0,141 ^f	0,47±0,030 ^{cd}
10	2,98±0,014 ^f	0,21±0,003 ^g
p-ANOVA*	p<0,001	P<0,0095

* Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único. ** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Proporção entre os substratos M/SL/RÇ: 1) 1/0/0; 2) 0/1/0; 3) 0/0/1; 4) 0,5/0,5/0; 5) 0,5/0/0,5; 6) 0/0,5/0,5; 7) 0,6/0,2/0,2; 8) 0,2/0,6/0,2; 9) 0,2/0,2/0,6; 10) 0,33/0,33/0,33.

Analisando os dados apresentados na Tabela 7, verifica-se que em todos os ensaios houve produção de ácido propiônico. O rendimento da fermentação depende de vários parâmetros de cultivo, como temperatura, pH e composição do meio fermentativo, que podem ser controladas. A produtividade de ácido propiônico foi baixa em todos os ensaios. JIN e YANG (1998) consideram produtividade baixa quando o valor é menor que 1 g.L⁻¹.h⁻¹. LIU, MA, XU. (2012) obtiveram produtividade de 0,23 g.L⁻¹.h⁻¹ utilizando xilose como fonte de carbono, temperatura de 30°C, pH inicial de 6,0 e cultura *P. acidipropionici* ATCC 4875. No trabalho realizado por ZHANG et al. (2015), utilizando a cultura *P. acidipropionici*, processo conduzido a 32°C e com controle automatizado de pH em 7 com adição de 6N de NaOH, foi obtida produtividade de 0,21 g.L⁻¹.h⁻¹, utilizando glucose como fonte de carbono e 0,07g.L⁻¹.h⁻¹ utilizando glicerol, valores considerados baixos, porém superiores ao encontrado neste trabalho.

Realizando a análise de correlação de Pearson (Tabela 8), observa-se forte correlação linear significativa entre o consumo de ácido láctico e a produção de ácido propiônico (r= 0,76; p=0,010), nos indicando que a presença do ácido láctico favorece a produção do ácido propiônico. A presença de glucose, galactose e lactose pela análise de correlação não se mostrou significativa e nem obteve valores de correlação altos. Outra correlação interessante observada foi em relação a produção de ácido acético e a produção de ácido propiônico (r= 0,92; p<0,001), mostrando que

a produção de ácido propiônico está fortemente correlacionada com a produção do ácido acético, o que reforça a relação que existe na equação estequiométrica para produção de ácido propiônico, e que a produção do ácido acético gera ATP que fornecerá energia para o metabolismo celular da cultura propiônica. A relação entre produção de ácido propiônico e o produtividade foi forte e significativa ($r=0,99$; $p<0,001$), porém a relação com o rendimento foi baixa e não significativa ($r=0,57$; $p=0,087$).

Tabela 8: Correlação de Pearson para o planejamento de mistura.

Variável	Lactose	Galactose	Glucose	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido succínico	Ácido propiônico	Produtividade	Rendimento
Lactose	1,00	,7009	,5523	,1954	,1399	,2251	,4026	,3998	-,3590
	p= ---	p=,024	p=,098	p=,589	p=,700	p=,532	p=,249	p=,252	p=,308
Galactose	,70	1,0000	,9352	,1449	,3322	-,0082	,5630	,5579	-,1419
	p=,024	p= ---	p=,000	p=,690	p=,348	p=,982	p=,090	p=,094	p=,696
Glucose	,55	,9352	1,0000	,0532	,2963	-,0823	,4398	,4386	-,1533
	p=,098	p=,000	p= ---	p=,884	p=,406	p=,821	p=,203	p=,205	p=,673
Ácido láctico	,19	,1449	,0532	1,0000	,7555	-,0656	,7628	,7718	,5437
	p=,589	p=,690	p=,884	p= ---	p=,012	p=,857	p=,010	p=,009	p=,104
Ácido acético	,14	,3322	,2963	,7555	1,0000	,0573	,9225	,9250	,6968
	p=,700	p=,348	p=,406	p=,012	p= ---	p=,875	p=,000	p=,000	p=,025
Ácido succínico	,2251	-,0082	-,0823	-,0656	,0573	1,0000	,0331	,0293	,1260
	p=,532	p=,982	p=,821	p=,857	p=,875	p= ---	p=,928	p=,936	p=,729
Ácido propiônico	,4026	,5630	,4398	,7628	,9225	,0331	1,0000	,9998	,5681
	p=,249	p=,090	p=,203	p=,010	p=,000	p=,928	p= ---	p=,000	p=,087
Produtividade	,3998	,5579	,4386	,7718	,9250	,0293	,9998	1,0000	,5711
	p=,252	p=,094	p=,205	p=,009	p=,000	p=,936	p=,000	p= ---	p=,085
Rendimento	-,3590	-,1419	-,1533	,5437	,6968	,1260	,5681	,5711	1,0000
	p=,308	p=,696	p=,673	p=,104	p=,025	p=,729	p=,087	p=,085	p= ---

Analisando-se as Tabelas 9 e 10, pode-se verificar que a presença de milhocina influencia positivamente no rendimento, ou seja, é um substrato adequado para a *Propionibacterium acidipropionici* CCT 4843 para produção de ácido propiônico. Dos efluentes estudados, o que resultou em melhor rendimento de ácido propiônico foi a milhocina, e a melhor produtividade de ácido propiônico foi do ensaio contendo milhocina e soro de leite. Já o efluente de ração animal apresentou efeitos não significativos no processo fermentativo, e isto pode ter ocorrido devido ao fato de este efluente poder conter resíduos de produtos químicos utilizados na limpeza dos equipamentos e do piso, inibindo a fermentação propiônica. A interação entre os substratos não se mostrou interessante estatisticamente (efeitos negativos e não significativos), sendo obtido melhores resultados quando não houve interação.

Tabela 9- Efeitos estimados de cada fator para RMS em relação ao rendimento de ácido propiônico.

	Efeitos	Erro Padrão	t-valor	p-valor
Milhocina (A)	0,7906	0,1024	7,7222	0,0045
Soro de leite (B)	0,3159	0,1024	3,0845	0,0539
Ração (C)	0,1642	0,1024	1,6004	0,2070
AB	-0,4865	0,5154	-0,9438	0,4149
AC	-0,3504	0,5154	-0,6797	0,5454
BC	1,8292	0,5154	3,5485	0,0381
ABC	-6,5326	3,3984	-1,9222	0,1503
R ²	0,9023			
R ² adj	0,7070			

Tabela 10 - Efeitos estimados de cada fator para RMS em relação a produtividade volumétrica de ácido propiônico.

	Efeitos	Erro Padrão	t-valor	p-valor
Milhocina (A)	5,2825	0,8841	5,9747	0,0094
Soro de leite (B)	4,3353	0,8841	4,9034	0,0162
Ração (C)	0,1771	0,8841	0,2003	0,8540
AB	7,3548	4,4505	1,6525	0,1970
AC	-3,0184	4,4505	-0,6782	0,5463
BC	6,2755	4,4505	1,4101	0,2533
ABC	-12,9176	29,3409	-0,4403	0,6895
R ²	0,9280			
R ² adj	0,7841			

A equação do modelo especial cúbico ajustado para rendimento é dada por:

$$Y_{ps} = 0,7905 X + 0,3159 Y + 0,1642 Z - 0,4865 XY - 0,3504 XZ + 1,8291 YZ - 6,5326 XYZ$$

Onde X é a proporção de milhocina, Y é a proporção de soro de leite e Z é a proporção do efluente do processamento de ração animal. Neste modelo é levado em consideração os efeitos dos três componentes puros, as interações binárias e a interação entre os três fatores. A representação do sistema de mistura com 3 componentes é mostrada na Figura 6, onde a mistura dos 3 componentes não é interessante no momento, apenas a milhocina pura e a mistura entre soro de leite e ração possuem efeitos significativos. Porém a milhocina pura possui o maior rendimento obtido.

A equação do modelo especial cúbico ajustado para a produtividade volumétrica é dada por:

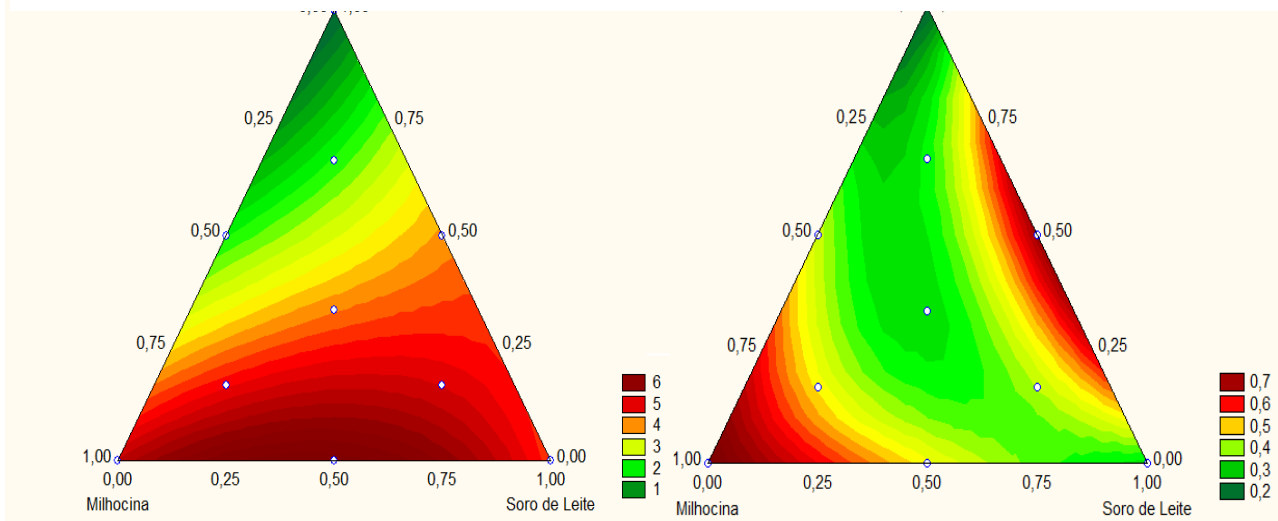
$$Q_p = 5,2825X + 4,3353Y + 0,1771 Z + 7,3548 XY - 3,0184 XZ + 6,2755 YZ - 12,9176 XYZ$$

Onde X é a proporção de milhocina, Y é a proporção de soro de leite e Z é a proporção do efluente do processamento de ração animal. Os efeitos presentes neste modelos são dos três componentes puros, as interações binárias e a interação

entre os três fatores. Para a produtividade, a interação entre os três fatores não é adequado no momento, onde os componentes milhocina e soro de leite são mais importantes, tanto individualmente, quanto a interação binária entre estes dois fatores.

Pode-se observar melhor os efeitos dos fatores no rendimento e produtividade volumétrica de ácido propiônico através das superfícies de respostas. Na Figura 6 é possível observar que o maior rendimento pode ser atingido quando apenas milhocina compõe o substrato. Como é demonstrado pelo efeito positivo no modelo, o rendimento é favorecido quando há presença de milhocina no meio fermentativo, porém quando há presença de efluente de ração animal, o rendimento diminui. Já com relação a produtividade, ocorre o mesmo quando há presença de efluente de ração animal, a produtividade diminui, porém quando há presença de milhocina e soro de leite, e também a mistura entre elas, há um aumento da produtividade, possuindo efeitos positivos significativos. Como a milhocina apresentou efeitos positivos significativos tanto para rendimento como para produtividade, este subproduto foi escolhido como substrato pra próximo planejamento.

Figura 6. Superfícies de resposta para produtividade volumétrica e rendimento.

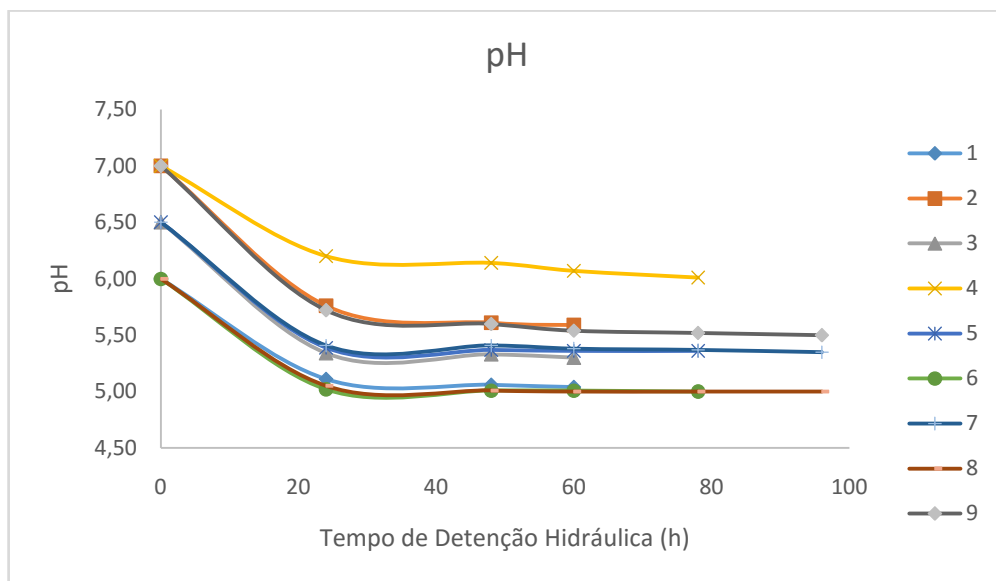


5.3 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 3^{3-1}

Após análise dos resultados de produção de ácido propiônico obtida nos diferentes ensaios, foi escolhido como substrato para este novo planejamento experimental a milhocina, pois esta apresentou ótimos resultados tanto para

rendimento como para produtividade de ácido propiônico, conforme pode-se observar na Figura 6. Neste planejamento avaliou-se como as variáveis tempo de detenção hidráulica, pH inicial e concentração inicial de inóculo influenciaram no rendimento e produtividade de ácido propiônico. Na Figura 7, pode-se observar o comportamento do pH ao longo do processo fermentativo.

Figura 7. Variação do pH ao longo do processo fermentativo.



Como no planejamento anterior, houve decréscimo do pH nas primeiras 24 horas, porém no decorrer do processo, o pH manteve-se estável, variando muito pouco até o término do processo. Isto indica que houve rápido consumo de substrato e produção de ácidos orgânicos nas primeiras 24 horas de fermentação e que após este período, com a redução do pH para valores fora do ótimo (com exceção da amostra 4), os microrganismos presentes no meio perderam a viabilidade, pois o pH próximo de 5,0 é crítico (BERESFORD et al., 2001; GARDNER; CHAMPAGNE 2005). Com relação ao consumo de substrato, a *Propionibacterium acidipropionici* CCT 4843 metabolizou o ácido láctico presente na milhocina. A concentração inicial do ácido láctico foi de $0,856 \text{ g.L}^{-1}$ e ao final de todos os ensaios observa-se que todo o ácido láctico foi consumido. Em um estudo realizado por LI et al. (2014), a 35°C e 48h de fermentação, houve consumo de 100% do ácido láctico presente no meio, produzindo a maior quantidade de ácido propiônico, com rendimento de 69,9% do total de ácido graxos voláteis produzidos.

Na Tabela 9 observa-se os valores de produção dos ácidos orgânicos avaliados e de biomassa gerada. Não foi detectado ácido succínico nestes ensaios, apenas ácido acético e propiônico. LEWIS e YANG (1992) realizaram uma fermentação com a cultura *P. acidipropionici* em fermentadores de vidro a 30°C, com pH 6,6 e TDH de 80 horas, utilizando lactato como fonte de carbono e não observaram produção de ácido succínico em quantidade significativa.

Tabela 9. Valores da produção em g.L⁻¹ de ácido acético, propiônico e de biomassa.

Ensaio	Ácido Acético	Ácido Propiônico	Biomassa
1	0,12±0,00 ^d	0,42±0,00 ^e	0,37±0,01 ^e
2	0,07±0,00 ^h	0,27±0,00 ^h	0,67±0,01 ^c
3	0,11±0,01 ^e	0,43±0,00 ^d	0,77±0,02 ^b
4	0,09±0,00 ^g	0,30±0,01 ^g	0,26±0,01 ^f
5	0,10±0,00 ^f	0,39±0,00 ^f	0,53±0,02 ^d
6	0,13±0,00 ^c	0,48±0,00 ^c	0,68±0,01 ^c
7	0,13±0,00 ^c	0,50±0,01 ^b	0,89±0,02 ^a
8	0,17±0,00 ^a	0,54±0,00 ^a	0,53±0,02 ^d
9	0,14±0,00 ^b	0,46±0,00 ^c	0,64±0,03 ^c
p-ANOVA*	p<0,001	p<0,001	p<0,001

*Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único. ** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Variáveis do planejamento fatorial fracionado (TDH/Concentração de inóculo/ pH inicial): 1) 60/10/6; 2) 60/20/7; 3) 60/30/6,5; 4) 78/10/7; 5) 78/20/6,5; 6) 78/30/6; 7) 96/10/6,5; 8) 96/20/6; 9) 96/30/7.

Com relação à produção de ácidos orgânicos, o ensaio 8 obteve o maior valor tanto para o ácido acético quanto para o ácido propiônico, com diferença estatística entre os ensaios. A relação molar de ácido propiônico/ácido acético (P/A) do ensaio 8 foi de 2,57:1, que é maior que a relação molar de 2:1 relatada na literatura, o que facilita a sua posterior separação e purificação do meio, porém muito próxima ao obtido por Barbirato, Chedaille e Bories (1997), de 2,5:1, utilizando 20 g.L⁻¹ de ácido láctico como fonte de carbono para a *P. acidipropionici*, 72h de fermentação a 30°C e pH de 6,8, com produção de 12,3 g.L⁻¹ de ácido propiônico e produtividade de 0,17 g.L⁻¹.h⁻¹; e Rickert, Glatz, Glatz, (1998), que observaram relação de 2,2:1 utilizando lactato como fonte de carbono, cultura *Propionibacterium thoenii* imobilizada em alginato de cálcio, temperatura de 32°C e pH 7 (BARBIRATO, CHEDAILLE, BORIES, 1997; FURTADO, 1991). A produção de ácido propiônico variou de 0,27 g.L⁻¹ a 0,54

g.L^{-1} , ensaio 2 e 8, respectivamente, no qual a diferença entre estes dois ensaios foi o tempo de detenção hidráulica e pH. Dishisha et al. (2013), utilizando como fonte de carbono 50 g.L^{-1} de glicerol, cultura *P. acidipropionici*, com reciclo de células, pH de 6,5 e temperatura de 32°C , obteve produção de $26,8 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido propiônico, com produtividade de $0,22 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Gonzalez e Clomburg (2013) obtiveram 42 g.L^{-1} a partir de 80 g.L^{-1} de glicerol, com uma produtividade máxima de $0,36 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Kagliwal et al. (2012), em uma fermentação em batelada, pH de 6,0 e temperatura de 37°C , utilizaram farinha de trigo integral, sendo o amido e o glúten fonte de nutrientes, e obtiveram produção de $48,61 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido propiônico, com 90 g.L^{-1} de glucose. Goswami e Srivastava (2000) obtiveram produção de $20,75 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido propiônico, com produtividade de $0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, em fermentação em batelada conduzida a 30°C e pH 6,5, com concentração inicial de lactose de $47,7 \text{ g.L}^{-1}$. Gardner e Champagne (2005), usando lactato como fonte de carbono, conseguiram produzir depois de 72h de fermentação, aproximadamente 10 g.L^{-1} de ácido propiônico. Comparando os dados, observa-se que a concentração inicial de ácido láctico na milhocina é baixo, apenas $0,856 \text{ g.L}^{-1}$, o que irá influenciar diretamente na produção do ácido propiônico, pois existe pouco substrato para a cultura propiônica consumir e produzir seus metabólitos. Outro fator que pode ter contribuído para a baixa produção de ácido propiônico é a autoclavagem dos meios fermentativos, pois isso provoca reações de escurecimento, onde grupos amino livres das proteínas reagem com os carboidratos, o que resulta em perda de nutrientes que poderiam ser utilizados pela cultura propiônica (GARDNER;CHAMPAGNE, 2005).

Nota-se em relação à biomassa que houve diferença estatística entre os ensaios, sendo o ensaio 7 com a maior produção de biomassa, porém não há uma relação entre a produção de ácido propiônico e a produção de biomassa. Em estudo realizado por El-Hagarawy, Slatter e Harper (1957), foi relatado que não há uma relação entre o número de bactérias e a produção de ácidos orgânicos.

Com a análise de correlação de Pearson (Tabela 10), observa-se uma forte correlação significativa entre a produção de ácido acético e ácido propiônico ($r=0,94$; $p<0,001$), e entre a produção de ácido propiônico e o rendimento ($r=0,99$; $p<0,001$). A biomassa não apresentou correlação significativa entre as variáveis.

Tabela 10: Correlação de Pearson para o planejamento fatorial fracionado

Variável	Ácido acético	Ácido propiônico	Biomassa	Rendimento	Produtividade
Ácido acético	1,0000	,9403	,1581	,9352	,3186
	p= ---	p=,000	p=,685	p=,000	p=,403
Ácido propiônico	,9403	1,0000	,3974	,9991	,4647
	p=,000	p= ---	p=,290	p=,000	p=,208
Biomassa	,1581	,3974	1,0000	,4191	,2427
	p=,685	p=,290	p= ---	p=,262	p=,529
Rendimento	,9352	,9991	,4191	1,0000	,4811
	p=,000	p=,000	p=,262	p= ---	p=,190
Produtividade	,3186	,4647	,2427	,4811	1,0000
	p=,403	p=,208	p=,529	p=,190	p= ---

Na Tabela 11 são mostrados os resultados para rendimento e produtividade para o ácido propiônico. O rendimento variou de 0,32 até 0,63g de ácido propiônico.g⁻¹ de substrato, e para produtividade, variou de 3,79 até 7,24mg de ácido propiônico.L⁻¹.h⁻¹.

Tabela 11. Respostas rendimento e produtividade para o ácido propiônico.

Ensaio	Rendimento (g.g ⁻¹)	Produtividade (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)
1	0,49±0,00 ^e	7,06±0,02 ^b
2	0,32±0,00 ^h	4,57±0,03 ^g
3	0,51±0,01 ^e	7,24±0,07 ^a
4	0,35±0,01 ^g	3,79±0,09 ^h
5	0,45±0,00 ^f	4,97±0,02 ^f
6	0,56±0,00 ^c	6,13±0,05 ^c
7	0,59±0,01 ^b	5,24±0,08 ^e
8	0,63±0,00 ^a	5,59±0,02 ^d
9	0,54±0,00 ^d	4,84±0,04 ^f
p-ANOVA*	p<0,001	p<0,001

*Valores de probabilidade obtidos segundo ANOVA fator único. ** Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa de acordo com o teste de Tukey (p<0,05).

Variáveis do planejamento fatorial fracionado (TDH/Concentração de inóculo/ pH inicial): 1) 60/10/6; 2) 60/20/7; 3) 60/30/6,5; 4) 78/10/7; 5) 78/20/6,5; 6) 78/30/6; 7) 96/10/6,5; 8) 96/20/6; 9) 96/30/7.

Houve diferença estatística entre os ensaios, tanto para a resposta rendimento quanto para produtividade de ácido propiônico. O maior rendimento obtido foi no ensaio 8, porém, a maior produtividade foi para o ensaio 3. O ensaio 3

também é viável, pois apresentou um bom resultado em um tempo menor, o que pode ser interessante economicamente. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de o cálculo de produtividade levar em consideração o TDH, que variou entre os ensaios. O rendimento variou entre os ensaios. Observou-se que com valores de pH menores o rendimento foi maior. Lewis e Yang (1992) utilizaram lactato como fonte de carbono e em pH 6,6 obtiveram rendimento de $0,52 \text{ g.g}^{-1}$, já com um pH de 6,0 o rendimento aumentou para $0,56 \text{ g.g}^{-1}$ de ácido propiônico. Boyavale Corre (1995) indicam baixa produtividade para valores iguais ou menores que $0,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, assim os valores obtidos neste trabalho não são satisfatórios. Rickert, Glatz, Glatz (1998) utilizaram lactato como fonte de carbono na proporção de 78 g.L^{-1} , com células imobilizadas de Propionibactérias, e obtiveram produção de 22 g.L^{-1} de ácido propiônico, com rendimento de 49,2%.

Em relação ao rendimento e produtividade de ácido propiônico, utilizando milho-cina como fonte de carbono, foi observado como os fatores TDH, pH inicial e concentração inicial de inóculo influenciam nestas respostas. As Tabelas 12 e 13 mostram os valores dos efeitos do planejamento experimental. Todos os fatores apresentaram, de acordo com as análises estatísticas, efeitos significativos ($p \leq 0,05$) em relação ao rendimento, porém com relação à produtividade apenas os fatores TDH e pH inicial tiveram efeitos significativos ($p \leq 0,05$).

Tabela 12. Efeitos das variáveis no rendimento de ácido propiônico.

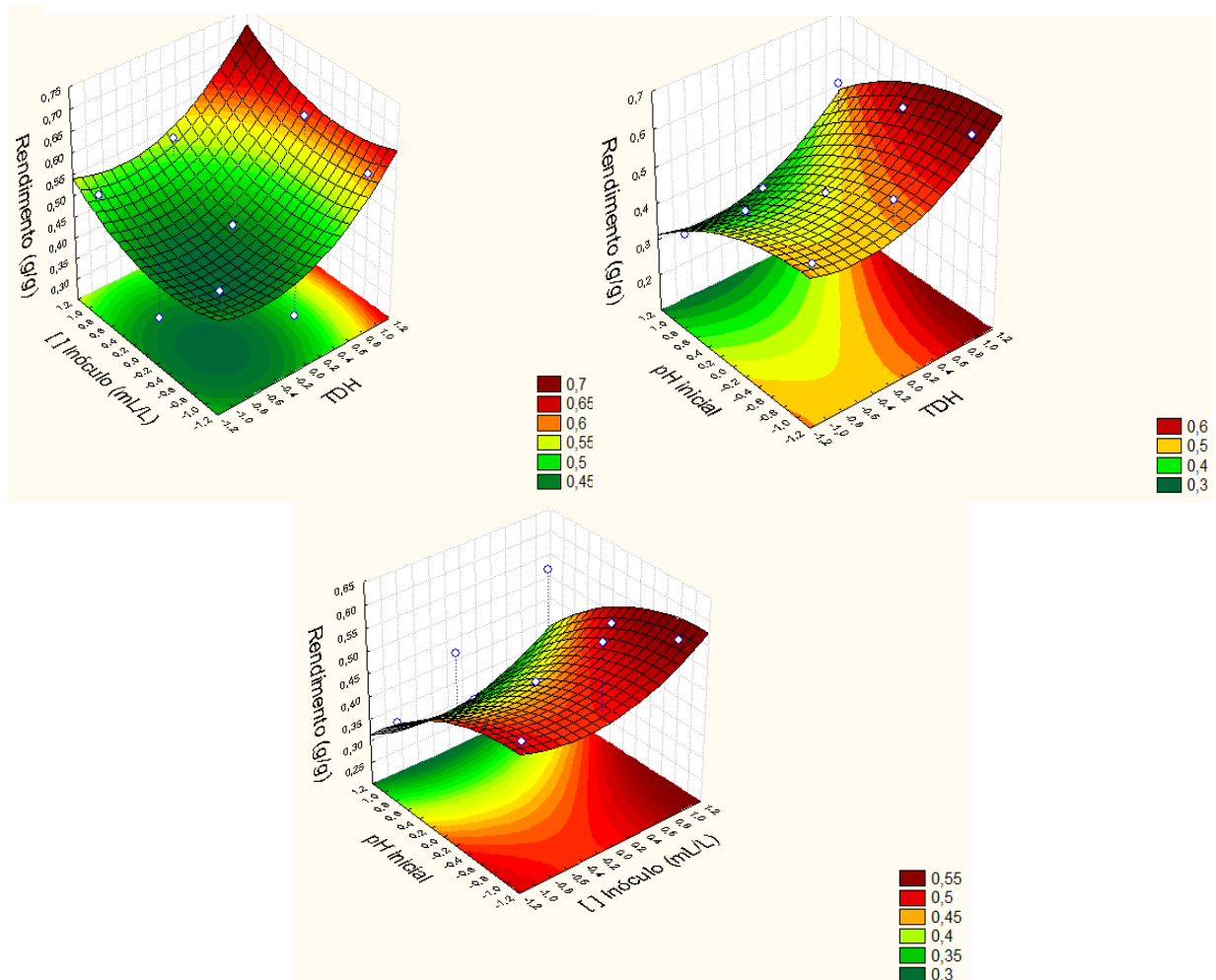
	Efeitos	Erro Padrão	t-valor	p-valor
Mean/Interc.	0,493004	0,002305	213,9005	0,000022
TDH (L)	0,145153	0,005646	25,7105	0,001509
TDH (Q)	-0,061486	0,004889	-12,5757	0,006264
Concentração de inóculo (L)	0,060119	0,005646	10,6487	0,008704
Concentração de inóculo (Q)	-0,039470	0,004889	-8,0728	0,015000
pH inicial (L)	-0,157755	0,005646	-27,9427	0,001278
pH inicial (Q)	0,034550	0,004889	7,0664	0,019444
R ²	0,998900			
R ² adj	0,995600			

Tabela 13. Efeitos das variáveis na produtividade volumétrica de ácido propiônico

	Efeitos	Erro Padrão	t-valor	p-valor
Mean/Interc.	5,49170	0,092938	59,08972	0,000286
TDH (L)	-1,06454	0,227651	-4,67620	0,042816
TDH (Q)	-0,79753	0,197152	-4,04527	0,056023
Concentração de inóculo (L)	0,70440	0,227651	3,09422	0,090494
Concentração de inóculo (Q)	-0,67471	0,197152	-3,42226	0,075803
pH inicial (L)	-1,86505	0,227651	-8,19256	0,014574
pH inicial (Q)	0,48679	0,197152	2,46911	0,132256
R ²	0,985200			
R ² adj	0,940600			

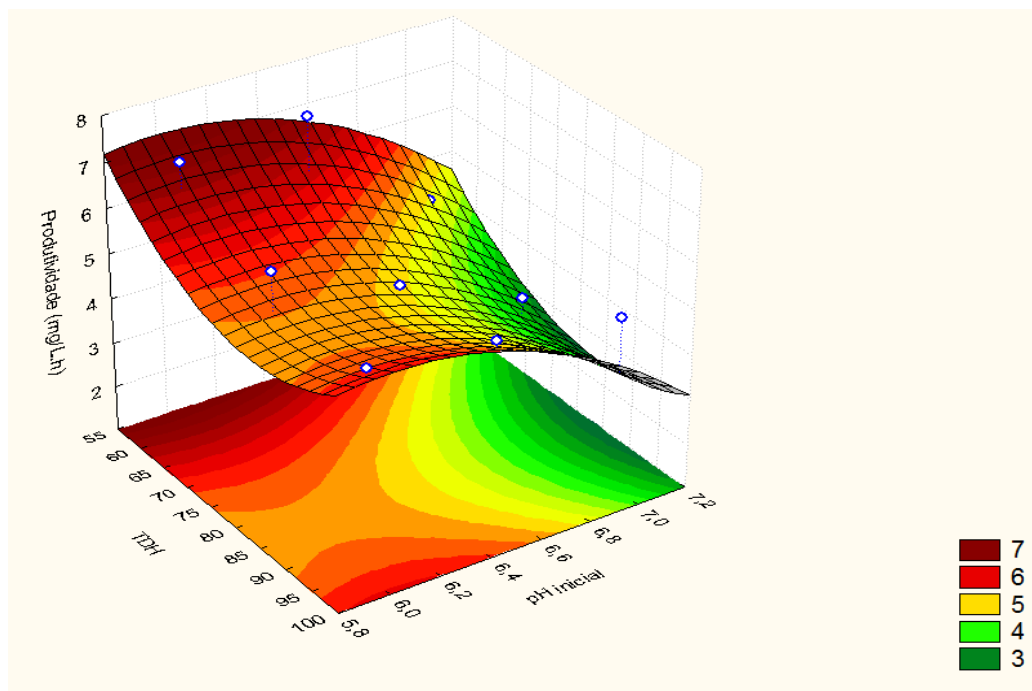
Pode-se visualizar melhor os resultados através dos gráficos de superfícies de respostas (Figuras 8 e 9).

Figura 8. Superfícies de respostas para o rendimento de ácido propiônico.



Pode-se observar pela Figura 8, que os maiores rendimentos ocorreram no nível mais alto de TDH, independente da concentração inicial de inóculo, com pH inicial entre 6,5 a 6,0. O maior rendimento obtido foi de $0,6275 \text{ g}$ de ácido propiônico. g^{-1} de substrato, com TDH= 96h, pH inicial de 6,0 e concentração inicial de inóculo de 20 mL.L^{-1} . Porém o ensaio 7 também apresentou um bom rendimento, de $0,5880 \text{ g}$ de ácido propiônico. g^{-1} de substrato, com TDH= 96h, pH inicial de 6,5 e concentração inicial de inóculo de 10 mL.L^{-1} , confirmando que o TDH no maior nível possui efeito significativo no rendimento; e o pH inicial no menor nível estudado possui um efeito significativo no rendimento, independente da concentração inicial de inóculo, o que é uma vantagem, pois pode-se usar uma menor concentração inóculo sem afetar o rendimento.

Figura 9. Superfície de resposta para o resultado de produtividade de ácido propiônico.



A Figura 9 apresenta a superfície de resposta contendo em seus eixos os fatores pH inicial e TDH, pois ambos fatores tiveram efeitos significativos na produtividade de ácido propiônico. A superfície indica que no nível mais baixo de TDH foi obtido o maior valor para produtividade, visto que na equação da produtividade é levado em consideração o tempo de detenção hidráulica do processo, então se o TDH for menor para uma mesma concentração de produto

final, a produtividade conseqüentemente será maior. Já para o pH inicial, foi obtido o mesmo resultado para o rendimento, pois nos níveis mais baixos de pH foram obtidos maiores valores de produtividade de ácido propiônico, visto que o pH na faixa de 5 a 6 pode favorecer a produção do ácido propiônico (ZHUGUE et al., 2014). Isto também é importante em um processo, pois gasta-se menos reagente para atingir o pH desejado.

6 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a bioprodução de ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* é possível e apresenta potencial para, no futuro, substituir processos de síntese química à base de petróleo.

A milhocina e o soro de leite foram os substratos que possibilitaram maior geração de ácido propiônico e o efluente da produção de ração animal não foi favorável para este fim. O ensaio que apresentou melhor rendimento foi o que continha apenas milhocina como substrato, com rendimento de 0,79 g ácido propiônico/g substrato, produtividade de 5,20 mg.L⁻¹.h⁻¹ e produção de 0,40g.L⁻¹.

As variáveis TDH e pH inicial influenciaram no rendimento e na produtividade de ácido propiônico dentro das condições estudadas, porém a faixa de concentração inicial de inóculo estudada não influenciou nas respostas.

Embora a produção do ácido propiônico não tenha alcançado grandes valores, sua produção por processos fermentativos se mostrou bastante próspera.

7 SUGESTÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho e com o conhecimento adquirido, são sugeridas as seguintes propostas:

- Verificar como a bactéria *Propionibacterium acidipropionici* se comporta em meio sintético utilizando como fonte de carbono apenas ácido láctico;
- Verificar se agitação e imobilização celular podem melhorar o rendimento e produtividade;
- Avaliar diferentes processos de condução para fermentação propiônica (descontínuo, descontínuo alimentado e semi-contínuo);
- Suplementar a milhocina com ácido láctico e verificar como se comporta a cultura propiônica, e se é viável economicamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMILHO. **Associação Brasileira das Indústrias de Milho**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

ADAMS, C. A. **Nutricines: Food components in Health and Nutrition**. Nottingham. Nottingham Univ. Press. 1999.

AliceWeb. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 19 maio 2016.

ALVES, M. C. **Utilização de resíduos do processamento de café (*Coffea arábica* L.) e de maracujá (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) como substratos na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger***. 125 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-Xylose by *Pichia stipitis* CDB 6054. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 2, p. 211-214, 1994.

ANDRADE, L. N. Autodepuração dos corpos d'água. **Revista da Biologia**, v.5, p. 16-19, 2010.

APHA. American Public Health Association, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20 ed. Washington: APHA, 1998. 937 p.

ARGAÑARAZ-MARTÍNEZ, E.; BABOT J.D.; APELLA M.C.; PEREZ CHAIA A.. Physiological and functional characteristics of Propionibacterium strains of the poultry microbiota and relevance for the development of probiotic products. **Anaerobe**, v.23, p.27-37, 2013.

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.

BARBOSA, A. S.; FLORENTINO, E. R.; FLORENCIO, I. M.; ARAÚJO, A. S. Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. ISSN 1981-8203, Mossoró, v.5, n.1, p.07-25, jan. 2010.

BARROS, B. N.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, E. B. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas, SP, 2001.

BELLAVER, C. **Ingredientes de origem animal destinados à fabricação de rações. Simpósio sobre Ingredientes na Alimentação animal**. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, Campinas, 2001.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v.11, n. 4/7, p.259-274, Julho 2001.

BERGER, L.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M.; FRANCO, L. O.; NASCIMENTO, A. E.; CAVALCANTE, H. M. M.; MACEDO, R. O.; CAMPOSTAKAKI, G. M. Effect of Corn Steep Liquor (CSL) and Cassava Wastewater (CW) on Chitin and Chitosan Production by *Cunninghamella elegans* and Their Physicochemical Characteristics and Cytotoxicity. **Molecules**, v. 9, n.3, p.2771-2792, 2014.

BISPO, M. D., KRAUSE, L. C., FRANCESCHI, E., & DARIVA, C. Aproveitamento de resíduos da fibra de coco verde, palha de cana-de-açúcar e borra de café para produção de bio-óleo via pirólise. **Sempesq**, n.16, 2014.

BIZZARI, S. N., GUBLER, R. Propionic acid. **Chemical Economics handbook**, p. 1-29, 2004.

BOYAVAL, P., CORRE, C. Production of propionic acid. **Lait**, v.7, p.453-461, 1995.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº357/2005**, publicação DOU nº53, p. 58-63, 17 de março de 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução nº 430/2011**, publicação DOU nº 92, p. 89, 16 de maio de 2011.

CALDERÓN, L. A. L. **Estudo de otimização das condições da fermentação para produção de ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* utilizando xarope de cana-de-açúcar**. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CALLEGARI, S., GOLDEMBERG, J., VILLANUEVA, L. D. **Energia, meio ambiente e desenvolvimento**. Disponível em <http://d.yimg.com/kq/groups/14480544/387615933/name/energia_meio_ambiente_e_desenvolvimento.pdf>. Acesso 21 jul 2014.

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

DISHISHA, T., STAHL, A., LUNDMARK, S., HATTI-KAUL, R. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. **Bioresource Technology**, v.135, p.504-512, 2013.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. London: Academic Press Limited, 1995, 439p.

DOSSIÊ CONSERVANTES. **Food Ingredients Brasil**, v. 18, p. 29-51, 2011. Disponível em: <www.revista-fi.com>. Acesso em: 03 ago 2014.

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

FIGUEIREDO, P. **Gestão de Resíduos Agroalimentares**, 2006. Disponível em <www.pfigueiredo.org/GRAA/GRAA.pdf> Acesso em: 27 maio 2014.

FILIPOVIC, S. S., RISTIC, M. D., SAKAC, M. B. Technology of corn steep application in animal mashes and their quality. **Roumanian Biotechnology Letters**, v.7, p.705-710, 2002.

FILIPPONE, A.; SINIGAGLIA, M.; ALTIERI, C. Study on bioactivity of cell-free filtrates from dairy propionibacteria. **Anaerobe**, v.30, p.137-145, 2014.

FREITAS, R. de et al. Biodiversity of dairy Propionibacterium isolated from dairy farms in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.203, p.70-77, jun. 2015.

FORESTI, E.; ZAIAT, M.; MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; PAIM, A. P.; RODRIGUES, J. A. D.; RATUSZNEI, S. M.; CANTO, C. S.; DAMASCENO, L. H. S.; BORZANI, W.. **Métodos de análises físico-químicas de rotina de águas residuárias tratadas biologicamente**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010. 89 p.

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

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

GARDNER, N., CHAMPAGNE, C. P. Production of Propionibacterium shermanii biomass and vitamin B12 on spent media. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.1236-1245, 2005.

GONZALEZ, Ramon; CLOMBURG, James M. Anaerobic fermentation of glycerol: a platform for renewable fuels and chemicals. **Elsevier: Trends in Biotechnology**, Houston, v.31, n.1, p.20-28, 2013.

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

GOTTI, A., TAVARES, L. B. B., NETO, J. G., MOMO, M. R., DRAEGER, A., SCABURRI, F., & DE LIMA, E. A.. Estudo do aproveitamento de quatro resíduos agroindustriais para produção de carvão vegetal. **Embrapa Florestas-Resumo em anais de congresso**. In: Mostra Integrada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 7, 2013, Blumenau. Anais. Blumenau: FURB, 2013.

GOULARTE, S.R., ÍTAVO, L.C.V., SANTOS, G. T, ÍTAVO, C.C.B.F., OLIVEIRA, L.C.S., FAVARO, S.P., DIAS, A. M., TORRES JUNIOR, R. A. A., BITTAR, C. M.M. Volatile fatty acids in rumen of cows fed different concentrate level diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, 2011.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. A.; JARVIS, B.. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v.55, p.137-149, 2014.

GRASSI, M. C. B.. **Estudo genético e metabólico da bactéria *Propionibacterium acidipropionici***. 2012. 112 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, v. 1, 1a Edição Digital: São Paulo: IMESP, 2008.

JIN, Z.; YANG, S-T. Extractive fermentation for enhanced propionic acid production from lactose by *Propionibacterium acidipropionici*. **Biotechnology Progress**, v.14, n. 3, p.457-465, 1998.

KAGLIWAL, L. D.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S.; GRANSTROM, T. Wheat flour based propionic acid fermentation: An economic approach. **Bioresource Technology**, v.129, p.694-699, 2013.

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, 1992.

LI, X.; CHEN, Y.; ZHAO, S.; WANG, D.; ZHENG, X.; LUO, J.. Lactic acid accumulation from sludge and food waste to improve the yield of propionic acid-enriched VFA. **Biochemical Engineering Journal**, v.84, p.28-35, 2014.

LIGGETT W. R. KOFFLER H. **Corn steep liquor in microbiology**. Universidade Lafayette, v. 12. U.S.A. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180696/pdf/bactrev00003-0030.pdf>> Acesso em: 23 jul 2014

LIND, H., JONSSON, H., SCHNURER. Antifungal effect of dairy propionibacteria - contribution of organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p. 157-165, 2005.

LIU, Z.; MA, C.; XU, P. Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, v.114, p.711-714, 2012.

LIZIEIRE, R. S.; CAMPOS, O. F. **Soro de queijo "in natura" na alimentação do gado de leite**. Instrução técnica para o produtor de leite. Embrapa. 2006. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/totem/conteudo/Alimentacao_e_manejo_animal/Pasta_do_Produtor/44_Soro_de_queijo_in_natura_na_alimentacao_de_gado_de_leite.pdf>. Acesso em: 04 jul 2014.

LOSS, E.; ROYER, A. R.; BARRETO-RODRIGUES, M.; BARANA, A. Use of maize wastewater for the cultivation of the *Pleurotus* spp. mushroom and optimization of its biological efficiency. **Journal of Hazardous Materials**, v.166, n.2, p.1522-1525, 2009.

MAGALHÃES, B.L.; GRASSI, M.C.B.; PEREIRA, G.A.G. **Desenvolvimento de um sistema de transformação integrativo para Propionibacterium acidipropionici**. Disponível em: <<http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xixcongresso/paineis/094670.pdf>>. Acesso em: 18 jul 2014.

MAGANHA, M. F. B. **Guia técnico ambiental da indústria de produtos lácteos**. São Paulo. CETESB, 2006. 95p (Série P + L). Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em 20 jul 2014.

MARENGO, J. A. et al. **Mudanças climáticas e eventos extremos no Brasil**. Disponível: <http://www.fbds.org.br/cop15/FBDS_MudancasClimaticas.pdf>. Acesso em out de 2015.

MÉLO, B. C. A. de; SILVA, R. de A.; KUBO, G. T. M.; CONRADO, L. S.; SCHIMDELL, W. Avaliação do resíduo agroindustrial de acerola para produção de celulases por fermentação em estado sólido. p. 2041-2048 . Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v.1, n.2. São Paulo: Blucher, 2015. ISSN 2359-1757.

MELO, M. R. **Produção de ácido propiônico em soro de queijo por bactéria do rúmen bovino**. 54f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de leite: composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.15, n.1, p.80-84, 1994.

MOCKAITIS, G.; LEITE, J. A. C.; PASOTTO, M. B.; ZAIAT M. Advances in Chemistry Research: Biosynthesis of Propionic Acid by Anaerobic Processes. **New York: Nova Science Publishers**, v.16, 2012.

MOREIRA, D. C. **Produção de ácido propiônico a partir de efluentes agroindustriais**. 66f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

PARANÁ. Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (SEMA). **Resolução nº 021/2009**. Disponível em <<http://www.iap.pr.gov.br/>>. Acesso em 8 de março de 2016.

PIERANGELLI, J. H. Agressões à natureza e proteção dos interesses difusos. Doutrina, **Justitia**, São Paulo, 1988.

RHEM, H. J.; REED, G. **Biotechnology: a comprehensive treatise in 8 vol. - Volume 1: Microbial Fundamentals**. Weinheim; Deerfield Beach, Florida; Basel: Verlag Chemie, 1981.

RICKERT, D. A., GLATZ, C. E., GLATZ, B. A. Improved organic acid production by calcium alginate immobilized propionibacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v.22, P.409–414, 1998.

ROCHA, I. T. M., SILVA, A. V., SOUZA, R. F., FERREIRA, J. T. P. Use of waste as a source of nutrients in agriculture. **Revista Verde de Agroecologia e**

Desenvolvimento Sustentável, Mossoró, v.8, n.5, p.47-52, dez. 2013. ISSN 1981-8203.

ROCHA, S. A., LOUGON, M. S., GARCIA, G.O. Influência de diferentes fontes de poluição no processo de eutrofização. **Revista Verde**, v.4, n.4, p.1-6, out/dez 2009.

ROHFES, A. L. B., BACCAR, N. M., OLIVEIRA, M. S. R., MARQUARDT, L., RICHARDS, N. S.P. S. Industrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental. **Tecno-Lógica**, v.15, n.2, p.79-83, 2011.

ROSA, M. F., SOUZA FILHO, M S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S; SANTAELLA, S.T., LEITÃO, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. II **Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais – II SIGERA**, Foz do Iguaçu, PR Volume I – Palestras, 2011.

SANTIAGO, D. **A redescoberta do soro do leite**: Por que esse subproduto da fabricação de queijo está caindo no gosto da indústria alimentícia e conquistando consumidores. 2013. Disponível em: <<http://dinheiorural.com.br>>. Acesso em: 03 set 2015.

SANTOS, C. **Prevenção à poluição industrial: identificação de oportunidades, análise dos benefícios e barreiras**. 287f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Carlos. 2005.

SANTOS, E. S.. **Análises físico-químicas de águas e de solos**. Pinhais. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2008.

SANTOS, L., KOTOVICZ, V., BARANA, A. C., ALMEIDA, M. M. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillusawamori*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.6, n.1, p.655-664, 2012.

SILVA, R. T.; PORTO, M. F. A. Gestão urbana e gestão das águas: caminhos da integração. **Estudos Avançados**, v.17, n.47, p.129-145, 2003.

SCHUCK, P., DOLIVET, A., MÉJEAN, S., HERVÉ, C., JEANTET, R.. Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. **International Dairy Journal**, v.31, n.1, p.12-17, 2013.

SUWANNAKHAM, S., YANG, S-T. Enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici* mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor. **Biotechnology Bioengineering**, v.91, p.325-337, 2005.

TINZL-MALANG, S. K.; RAST, P.; GRATTEPANACHE, F.; SYCH, J.; LACROIX, C. Exopolysaccharides from co-cultures of *Weissella confusa* 11GU-1 and *Propionibacterium freudenreichii* JS15 act synergistically on wheat dough and bread texture. **International Journal Of Food Microbiology**, v.214, p.91-101, 2015.

U.S.FoodAnd Drug Administration. Protecting and Promoting Your Health. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

VALSECHI, O. A. **Microbiologia de Alimentos**. 49 f. Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2006.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Editora UFMG, 1996.

WOSIACK, P. A., KOKI, C. R., BARANA, A. C., DOLL, M. M. R., LOPES, D. D., & DAMIANO, M. H. R. Z. Avaliação da partida de reator biológico visando a remoção de matéria orgânica carbonácea e nitrogenada de efluente de fábrica de ração animal. **Revista de Engenharia e Tecnologia**, v.5, n 3, p.33-44, 2013.

YANG, S.-T.; EL-ENSASHY, H.; THONGCHUL, N. **Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers**. John Wiley & Sons, 2013.

YANG, T.-W.; RAO, Z.-M; ZHANG, X.; XU, Z.-H; YANG, S.-T. Effects of corn steep liquor on production of 2,3-butanediol and acetoin by *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v.48, n.11, p.1610-1617, 2013.

ZHANG, A. **Metabolic engineering and process development for enhanced propionic acid production by Propionibacterium acidipropionici**. 278f. Tese (Doutorado) - Ohio State University, 2009.

ZHANG, A. et al. Effects of carbon dioxide on cell growth and propionic acid production from glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici*. **Bioresource Technology**, v. 175, p.374-381, jan. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.10.046.

ZHANG, A.; YANG, S. Engineering *Propionibacterium acidipropionici* for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.104, n.4, p.766-773, 2009.

ZHUGE, X., LIU, L., SHIN, H., LI, J., DU, G., CHEN, J. Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered *Propionibacterium jensenii* by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy. **Bioresource Technology**, v.152, p.519–525, 2014.