



Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium
acidipropionici* imobilizada em Alginato de Cálcio - Resultados
Obtidos e Bibliometria

Raissa M.da Silva Coutinho de Oliveira

Monografia em Engenharia de Bioprocessos

Orientadores

Prof. Ivaldo Itabaiana Jr, DSc.

Prof. Nei Pereira Jr, DSc.

Junho de 2021

PRODUÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO POR
Propionibacterium acidipropionici **IMOBILIZADA EM**
ALGINATO DE CÁLCIO - Resultados Obtidos e
Bibliometria

Raissa M.da Silva Coutinho de Oliveira

Monografia em engenharia de bioprocessos submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

Prof. Jose Angel Ramon Hernandez, DSc

Marcelo Avelar do Nascimento, MSc

Orientado por:

Prof. Ivaldo Itabaiana Jr, DSc

Prof. Nei Pereira Jr., DSc

Oliveira, Raissa M.da Silva Coutinho

Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* imobilizada em Alginato de Cálcio - Resultados Obtidos e Bibliometria/Raissa M.da Silva Coutinho de Oliveira - Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2021

XI, 86 p.; il.

(Monografia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2021.

Orientadores: Prof. Ivaldo Itabaiana Jr. e Prof. Nei Pereira Jr.

1. Ácido Propiônico. 2. *Propionibacterium acidipropionici*. 3. Bioprocesso. 4. Imobilização 5. Monografia. (Graduação - UFRJ/EQ). 6. Raissa M.da Silva Coutinho de Oliveira. I. Produção de Ácido Propiônico *Propionibacterium acidipropionici* imobilizada em Alginato de Cálcio - Resultados Obtidos e Bibliometria.

“Estive cercado por pessoas mais inteligentes do que eu, mas descobri que sempre poderia acompanhar trabalhando duro”
-Seaborg, Glenn

(Ganhador do Nobel de Química de 1951)

Agradecimentos

Agradeço à Deus pelo dom da vida, pelo seu Amor incondicional e por todas súplicas e orações ouvidas com sua Graça e Misericórdia.

À esta forte e sólida instituição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, por todo ensinamento e pela formação de excelência. Me despeço desta conceituada Universidade pronta para encarar os novos desafios e aventuras desta honrosa profissão, a Engenharia.

Ao meu eterno amigo, namorado e esposo Otavio por ter compartilhado comigo das dores e alegrias de cada etapa desta jornada. Obrigada pelos conselhos, pelo incentivo, pelo amor e pelas palavras de animo nos momentos que nem eu mesma acreditava que poderia ir mais longe. Te amo!

Ao meu orientador e Professor Ivaldo Itabaiana pela oportunidade e por toda orientação, ensinamento, amizade e companheirismo. Obrigada pela disponibilidade e excelência no ensino.

Ao Professor Nei Pereira Jr. por gentilmente abrir as portas do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), dando todo suporte necessário ao longo da minha jornada experimental deste trabalho. Agradeço também aos companheiros de trabalho no laboratório, em especial as colegas Douglas Passos e Mariana Mello que sempre me auxiliaram nas dúvidas dos experimentos e pela companhia no dia a dia.

E por fim, porém não menos importante, agradeço aos meus pais Ary e Gerci por sempre acreditarem no meu potencial e capacidade. Obrigada por me ensinarem os princípios e valores que norteiam a minha vida. Foi por meio dos ombros de vocês que pude voar alto. Amo vocês!

Resumo da Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* imobilizada em Alginato de Cálcio - Resultados Obtidos e Bibliometria

Raissa M.da Silva Coutinho de Oliveira

Junho, 2021

Orientador: Prof.Ivaldo Ibabaiana Jr. e Prof. Nei Pereira Jr.

Atualmente, o ácido propiônico comercial é produzido principalmente pela rota química, sendo considerado um derivado da indústria de óleo e gás. Nos últimos anos a atenção tem sido focada na produção deste ácido pela rota biotecnológica. Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho da bactéria *Propionibacterium acidipropionici* livres e imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para produção de ácido propiônico à partir de batelada simples. Os substratos testados foram glicose e xilose sintéticos. O processo foi realizado em frascos agitados por 145 horas, e o melhor desempenho foi com a xilose, onde foram obtidos concentração final de ácido propiônico e produtividade volumétrica iguais à 15,65 g/L e 0,11 g/L.h, respectivamente. Com o resultado obtido, a bactéria *Propionibacterium acidipropionici* mostrou-se um agente no processo de produção de ácido propiônico e a estratégia de imobilização por alginato de cálcio mostrou-se bastante promissora. Neste trabalho também foi realizada uma bibliometria acerca do estado da arte de produção do referido ácido nos últimos anos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formula Estrutural do Ácido Propiônico.....	12
Figura 2 - Evolução do volume de importação de Ácido Propiônico no Brasil	14
Figura 3 - Evolução do preço de barril de petróleo bruto em reais (R\$)	17
Figura 4 - Equação de formação do ácido propiônico	21
Figura 5 - Via do ácido dicarboxílico para formação do ácido propiônico	21
Figura 6 - Métodos principais de imobilização celular.....	25
Figura 7 - Estrutura química do alginato de sódio, G = ácido gulurônico, M = ácido manurônico.....	26
Figura 8 - Formação do gel de alginato de cálcio por aprisionamento.....	27
Figura 9 - Tipos de reatores empregados (A) leito fixo, (B) leito fluidizado.....	28
Figura 10 - Ambiente de pesquisa da plataforma Scopus	29
Figura 11 - Trabalhos publicados por ano. Palavras-chave: “ <i>propionic acid production</i> ” e “ <i>fermentation</i> ”.....	31
Figura 12 - Trabalhos publicados por área. Palavras-chave: “ <i>propionic acid production</i> ” e “ <i>fermentation</i> ”.....	32
Figura 13 - Trabalhos publicados por país. Palavras-chave: “ <i>propionic acid production</i> ” e “ <i>fermentation</i> ”.....	33
Figura 14 - Trabalhos publicados por tipo de documento. Palavras-chave: “ <i>propionic acid production</i> ” e “ <i>fermentation</i> ”.....	33
Figura 15 - Trabalhos publicados por tipo de reator usado. Palavras-chave: “ <i>propionic acid production</i> ”, “ <i>fermentation</i> ” e “ <i>bioreactor</i> ”.....	34
Figura 16 - Esquema ilustrativo do sistema de Purga de CO ₂	38
Figura 17 - Sistema de gotejamento da solução celular/Alginato de Cálcio em solução de Cloreto de Cálcio 0,1M.....	39
Figura 18 - Frasco de fermentação de células imobilizadas.....	41
Figura 19 - Gráfico de calibração da massa celular seca x absorbância	41
Figura 20 - Cromatograma para ácido propiônico	42
Figura 21 - Cromatograma para açúcares	42
Figura 22 - Perfil cinético do processo de fermentação de Glicose à partir de células livres.....	45
Figura 23 - Perfil cinético do processo de fermentação de Xilose à partir de células livres.....	46
Figura 24 - Perfil cinético do processo de fermentação de Glicose à partir de células imobilizadas.....	47
Figura 25 - Perfil cinético do processo de fermentação de Xilose à partir de células imobilizadas.....	48
Figura 26 - Curva de crescimento celular em diferentes concentrações de células imobilizadas em alginato de cálcio.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido propiônico.	12
Tabela 2 - Comparação dos custos de produção de propionato de cálcio a partir da fermentação de ácido propiônico de diferentes matérias-primas (1000 MT / ano)....	13
Tabela 3 - Aplicações de Ácido Propiônico em diferentes campos	16
Tabela 4 - Cepas e detalhes correspondente à produção do ácido propiônico	20
Tabela 5 - Materiais usados para a produção de suportes de fixação de células.	24
Tabela 6 - Número de Publicações	30
Tabela 7 - Composição do meio de cultivo BHI.....	35
Tabela 8 - Composição do meio <i>Reinforced Clostridial Broth</i> (RCB)	36
Tabela 9 - Composição do meio de Fermentação	37
Tabela 10 - Composição das esferas de alginato de cálcio com células.	40
Tabela 11 - Comparativo dos parâmetros do processo convencional x células imobilizadas.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	Absorbância
CAP	Propionato de Acetato de Celulose
Ef	eficiência, expressa em porcentagem
h	Hora
PA	Ácido Propiônico
Qp	Produtividade Volumétrica
RCB	Reinforced Clostridial Broth
TSB:	Caldo de Triptona de Soja
YP/S	Rendimento em produto por substrato produzido, g/g
YX/S	Rendimento em biomassa por substrato consumido, g/g

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. OBJETIVO GERAL.....	11
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1. ÁCIDO PROPIÔNICO	12
2.1.1. A Estruturação Do Ácido	12
2.1.2. Aspectos Mercadológicos.....	13
2.1.3. Processo de Produção	16
2.3. IMOBILIZAÇÃO CELULAR.....	23
2.3.1. Métodos de Imobilização	24
2.3.2. Biorreatores com células imobilizadas.....	27
2.4. TENDÊNCIAS FUTURAS	28
3. PROSPECÇÃO DE ARTÍGOS CIENTÍFICOS	29
3.1. METODOLOGIA.....	29
3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4. ESTUDO DO CASO	35
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1.1. Microrganismo e Meio de Ativação.....	35
4.1.2. Composição dos meios	36
4.1.3. Sistema de Purga	37
4.1.4. Imobilização em Alginato de Cálcio.....	38
4.1.5. Avaliação da Relação Quantidade de Células X Volume do Gel Alginato de Cálcio	39
4.1.6. Avaliação do Bioprocesso em Frascos de Batelada Simples	40
4.1.7. Amostragem	41
4.1.8. Métodos Analíticos	42
4.1.9. Avaliação de Resultados	43
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as preocupações com a possível escassez do petróleo, com a emissão dos gases de efeito estufa e sustentabilidade, têm estimulado a busca de formas alternativas de produzir produtos petroquímicos como, por exemplo, o ácido propiônico, que tradicionalmente é obtido pela oxidação de propano ou propionaldeído em fase líquida (AMMAR *et al.*, 2020).

Além disso, os custos do petróleo estão subindo e, por este motivo, rotas biotecnológicas utilizando matérias-primas renováveis ou resíduos industriais baratos já podem ser utilizadas para produzir ácido propiônico, onde algumas apresentam perspectivas de se tornarem economicamente competitivas, oferecendo algumas vantagens sobre as vias químicas de síntese (WOSKOW, 1991).

Dentre todos os ácidos orgânicos disponíveis comercialmente, o ácido propiônico (PA) e seus derivados podem ser citados como importantes intermediários químicos, utilizados principalmente em diversas aplicações industriais, tais como: agentes antimicrobianos para um amplo espectro de microrganismos (HUANG *et al.*, 2011; RIVERO *et al.*, 2013); substância anti-inflamatória, exibindo propriedades analgésicas e antipiréticas; herbicidas, controlando plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas; conservantes em produtos de panificação e queijo; sabores e fragrâncias artificiais; produtos farmacêuticos; precursores de propionato de acetato de celulose (CAP), entre outros (VAHID *et al.*, 2020).

O ácido propiônico é um dos 30 principais candidatos com maior potencial de produção a partir de biomassa, conforme relatado pelo Departamento de Energia dos EUA (WERPY *et al.*, 2004). O mercado mundial anual para o ácido propiônico foi de 350 mil toneladas (LUNA-FLORES *et al.*, 2016), o que foi cerca a 770 milhões libras em 2006 (ZHANG *et al.*, 2009).

Os maiores mercados e de crescimento mais rápido são a Europa e a Ásia-Pacífico, respectivamente. Agricultura, alimentos, bebidas, higiene pessoal e produtos farmacêuticos têm a maior participação nas receitas (em%). A demanda do mercado mundial por ácido propiônico foi de 38 mil e 400 mil toneladas em 2007 e 2013, respectivamente, e espera-se chegar a 470 em 2020, o que representa 1,53 bilhão de dólares (KHANEGHAH *et al.*, 2017).

As cepas típicas para a produção de ácido propiônico são *Propionibacterium* spp., sendo gram-positivas, imóveis, não esporuladas, anaeróbias facultativas e em forma de bastonete (KUMAR & BABU, 2006). Porém, o principal fator limitante da produção de ácido durante a fermentação é a inibição pelo produto final (WOSKOW & GLATZ, 1991).

Uma alternativa para proteger as células da inibição pelo produto final é o uso de reatores com células imobilizadas, que pode aumentar a eficiência e a produtividade da fermentação. As células imobilizadas podem ser usadas para produzir ácidos orgânicos, aminoácidos, antibióticos, enzimas e outros compostos. Ao usar células imobilizadas, o processo pode ser mais facilmente controlado do que usar um sistema em batelada com células livres. Além disso, as células imobilizadas são mais estáveis do que as células livres e a separação dos produtos é mais simples (ATES *et al.*, 2002).

1.1. OBJETIVO GERAL

No contexto delineado acima, este trabalho tem como objetivo geral avaliar o desempenho da bactéria *Propionibacterium acidipropionici* à partir da imobilização celular em gel de alginato de cálcio em um processo biotecnológico de produção de ácido propiônico, além de fornecer ao leitor uma bibliometria acerca do estado da arte de produção do referido ácido nos últimos anos.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificação do crescimento da espécie *Propionibacterium acidipropionici* frente ao uso de glicose e xilose comercial, incluindo avaliação de parâmetros como desempenho e produtividade;
- Testar a técnica de imobilização celular em gel de alginato de cálcio para comparar com o processo sem técnica de imobilização;
- Investigar a relação mais eficaz entre a concentração celular e o volume do gel de alginato de cálcio;
- Avaliar o andamento do bioprocessamento em um sistema batch simples para um processo com e sem imobilização;
- Desenvolver uma prospecção de artigos científicos dos últimos 10 anos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. ÁCIDO PROPIÔNICO

2.1.1. A Estruturação Do Ácido

O Ácido Propiônico (PA) pertence à função dos ácidos carboxílicos, e tem ocorrência natural e de fórmula química $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ (Figura 1).

Representa as propriedades gerais dos ácidos carboxílicos e forma compostos de amida, éster, anidrido e cloreto.

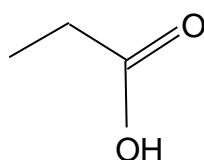


Figura 1 - Formula Estrutural do Ácido Propiônico.

No seu estado puro é um líquido incolor, corrosivo, e com odor pungente. É solúvel em água em qualquer proporção, pois suas moléculas podem formar ligações de hidrogênio. Além disso, o ácido propiônico reage com álcoois transformando em ésteres e com bases, transformando em sais orgânicos (CORAL, 2008).

A tabela 1 mostra as propriedades físico-químicas do ácido propiônico:

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido propiônico.

Propriedades	Valores
Massa Molar	74,08 g/L
Ponto de Fusão	-21 °C
Ponto de Ebulição	141 °C
Densidade	0,992 g/cm ³
Viscosidade	10 mPa.s
pKa	4,8

Fonte: CDC, 2021.

2.1.2. Aspectos Mercadológicos

Atualmente, o ácido propiônico é produzido principalmente por processos petroquímicos. O mercado global do ácido propiônico foi estimado em 390 mil toneladas ou 908 milhões de dólares em 2012. Estima-se que seu mercado cresça com a taxa de crescimento anual de mais de 6,7% para US\$ 1,53 bilhão em 2020. (WANG et. al., 2017).

Em 2018, YANG & WANG analisaram economicamente a produção de propionato de cálcio pela rota biotecnológica a partir da dextrose, milho e melão de soja como substrato, tomando por base os preços das matérias-primas e utilidades vigentes em 2018. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Comparação dos custos de produção de propionato de cálcio a partir da fermentação de ácido propiônico de diferentes matérias-primas (1000 MT / ano)

	Dextrose		Milho		Melaço de Soja	
	\$/MT	(%)	\$/MT	(%)	\$/MT	(%)
Matéria-prima	993,20	46,89	362,61	24,37	240,32	17,60
Consumíveis (membranas)	60,60	2,86	60,60	4,07	60,60	4,44
Operação/Manutenção de Equip.	91,57	4,32	91,57	6,16	91,57	6,71
Utilidades	221,45	10,45	221,45	14,89	221,45	16,22
Depreciação	571,48	26,98	571,48	38,41	571,48	41,85
Trabalho	180,00	8,50	180,00	12,10	180,00	13,18
Custo de Fabricação	2.118.300		1.487.710		1.365.430	
Custo Financeiro	222.660		222.660		222.660	
Custo F&A (1% do preço de venda)	30.000		30.000		30.000	
Imposto	450.000		450.000		450.000	
Custo Total	2.820.970		2.190.370		2.068,090	
Capital de Investimento Total	6.851.212		6.851.212		6.851.212	
Receitas	3.000.000		3.000.000		3.000.000	
Lucro Líquido (\$3.0/Kg)	179.030		809.630		931.910	
Retorno do Investimento	2.61%		11.82%		13.60%	
Tempo de retorno (anos)	38,3		8,46		7,35	

Fonte: (WANG et.al., 2018)

O processo descrito pelos autores na tabela 2, inclui pré-tratamento, fermentação do ácido propiônico, separação das células por filtração (membranas), evaporação de efeito triplo para concentrar o caldo de fermentação e secagem por pulverização para obter o produto final em pó final contendo 63,5% de propionato de cálcio (ou 50% de ácido propiônico) e 5% de água. Os valores considerados de fermentação para base de cálculo foram: título de PA = 50 g / L, rendimento de PA = 0,5 g / g e produtividade de PA = 1 g / L.h (YANG & WANG, 2018).

Os custos estimados do produto são \$ 2,82 / kg para dextrose, \$ 2,19 / kg de milho forçado e \$ 2,07 / kg para melaço de soja. Comparando a rota biotecnológica com a rota química, nota-se que ainda é difícil competir, visto que o preço comercial deste é de \$ 1,3/kg. Este valor permanece competitivo mesmo se alcançássemos um rendimento de ácido propiônico > 0,6 g / g de glicose, título de 100 g / L e produtividade de > 2,0 g / L.h (YANG & WANG, 2018).

No Brasil, de acordo com o banco de dados *Comex Stat*, as importações de ácido propiônico estão aumentando gradativamente e dobraram nos últimos 10 anos (BRASIL, 2021). Em 2020, foi alcançado o valor de cerca de 4,6 mil toneladas de ácido propiônico (Figura 2).

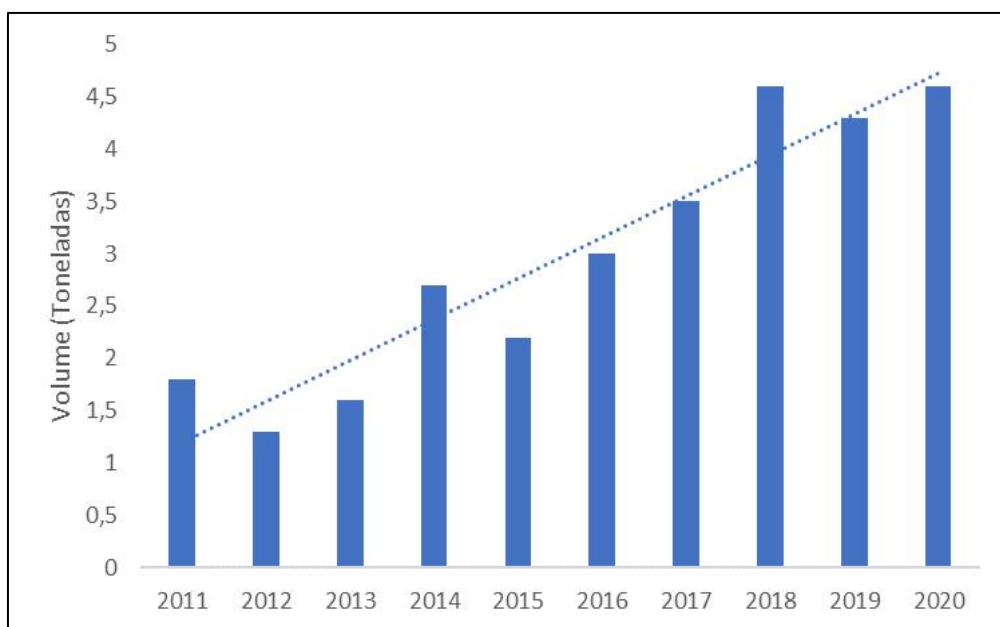


Figura 2 - Evolução do volume de importação de Ácido Propiônico no Brasil
Fonte: Autoria própria, 2021.

Esses sais foram listados pela *Food and Drug Administration* (FDA) como conservantes na Categoria de Aditivos Alimentares Seguros (CORAL, 2008), portanto, pequenas quantidades de ácido propiônico estão disponíveis em muitos produtos alimentícios como, por exemplo, laticínios. Atuam como um produto comercial de agente antimicrobianos (LOPES et. al., 2017).

Segundo o Departamento de Energia dos EUA, o ácido propiônico é considerado um dos 30 principais produtos químicos que atuam como matéria-prima para vários outros produtos (ZHUGE et al., 2014).

O ácido propiônico é amplamente utilizado na síntese orgânica, alimentos, perfumes, corantes e indústrias farmacêuticas (BALAMURUGAN et al., 1999; SUWANNAKHAM & YANG, 2005; YANG et al., 1995; ZHANG & YANG, 2009^a).

Esse ácido e seus sais podem ser utilizados como matéria-prima em receitas de diversos produtos, tais como: termoplásticos, herbicidas, aromas, medicamentos, perfumes e solventes. Os sais de cálcio, sódio e potássio do propanoato são amplamente usados como conservantes de alimentos e rações porque têm um efeito fungicida. (SUWANNAKHAM et al., 2005; ZHANG et al., 2009). O ácido propiônico também pode ser usado na indústria de queijo para adicionar sabor. Pode ainda ser usado na síntese enzimática de ésteres derivados (LOPES et. al., 2017).

Além das muitas aplicações amplamente relatadas na literatura, novas funcionalidades vêm sendo discutidas, como a suplementação alimentar em ruminantes, visto que muitos estudos demonstram um aumento da digestibilidade de forragens por microrganismos ruminais e aumento do rendimento de leite, respectivamente (MELO, 2007). Outra aplicação é a produção de solventes não poluentes do ar que substituem o xileno e algumas cetonas que são potencialmente mais poluidores do ar. (BOYAVAL e CORRE, 1995).

Com relação à participação no mercado, a maior parte é destinada para consumo alimentar de animais e preservantes de grãos que juntos somam 45% do mercado, enquanto 21% é destinado aos seus sais de sódio e potássio. O processo de produção de herbicidas representa 19% do mercado (CORAL, 2008; TELES, 2016). Os maiores produtores atualmente são BASF, Dow, Eastman Chemical Company e Perstorp (WANG et al., 2017).

As aplicações do ácido propiônico estão resumidas na tabela 3 abaixo:

Tabela 3 - Aplicações de Ácido Propiônico em diferentes campos

Aplicações	Observações
Preservação de alimentos e grãos	O ácido propiônico (PA) é um inibidor de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Bacillus aeróbio</i> , <i>Salmonella</i> e levedura, e tem sido usado como um inibidor de mofo para ração animal, milho úmido, silagem e grãos (Balamurugan <i>et al.</i> , 1999).
Conservantes de alimentos	<i>Propionibacterium</i> spp. recebeu um status GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pela Administração de Alimentos e Drogas dos Estados Unidos (FDA) (Salminen <i>et al.</i> , 1998). Ácido Propiônico pode ser usado como conservantes nas indústrias alimentares para evitar que os alimentos, como pão e bolo, fiquem bolorentos.
Síntese de herbicida	PA pode ser usado para a síntese de 2, 2 dicloropropionato de sódio, usado como herbicida.
Intermediários de perfume	PA é um precursor para a síntese química de éter propiônico e propionato de benzila, que pode ser usado como aditivo em alimentos e cosméticos (Kumar e Babu, 2006).
Intermediários farmacêuticos	PA pode ser usado para a síntese de anidrido propanóico e ácido cloropropiônico como intermediários farmacêuticos (Kumar e Babu, 2006).
Síntese de propionato de acetato de celulose	PA pode ser usado como o precursor para a síntese de propionato de acetato de celulose
Outras aplicações	PA pode ser usado como um intermediário na produção de plásticos, plastificantes, têxteis e auxiliares de borracha, bem como intermediários de tingimento.

Fonte: Adaptado de Liu *et al.*, 2012.

2.1.3. Processo de Produção

O ácido propiônico é produzido comercialmente pela oxidação de propano ou propionaldeído em fase líquida (OZADALI, 1996; PAIK, 1994; PLAYNE, 1985).

No entanto, apesar do ácido propiônico ainda ser produzido exclusivamente por processos petroquímicos, existe uma crescente preocupação com o contínuo aumento dos preços de petróleo, sendo a previsão que o valor do petróleo bruto ultrapasse US\$76/barril em 2021 (OILPRICE, 2021). A figura 3 apresenta a evolução do preço do petróleo nas últimas décadas.

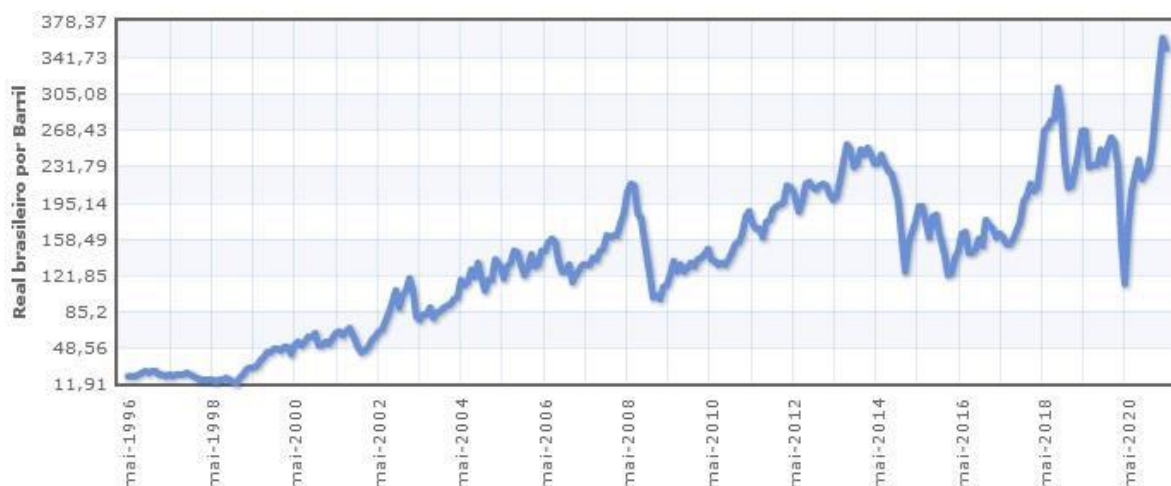


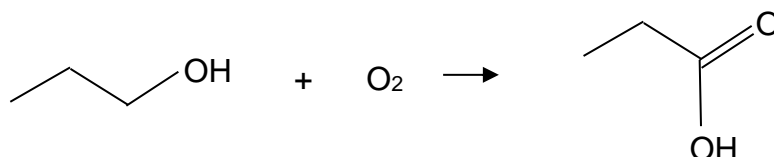
Figura 3 – Evolução do preço de barril de petróleo bruto em reais (R\$)
 Fonte: www.indexmundi.com

Somado a este fato, há também o recente desejo do consumidor por produtos químicos de base biológica, o que tem gerado grandes interesses industriais na produção de ácido propiônico e outros produtos químicos a partir de matérias-primas biorrenováveis, incluindo produtos agrícolas e resíduos industriais (LIU *et al.*, 2012).

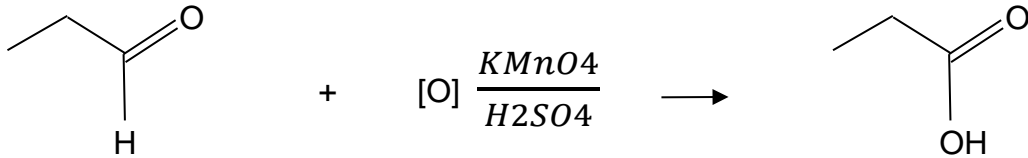
2.1.3.1. Rota Química

O ácido propiônico pode ser obtido principalmente pelas seguintes rotas (CORAL, 2008):

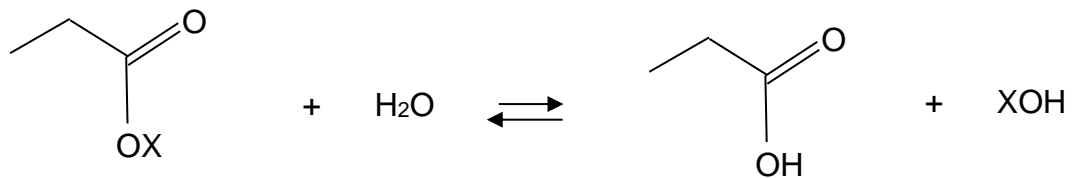
- Oxidação do propanol



- Oxidação do propanal



- Hidrólise de esteres



2.1.3.2. Rota Biotecnológica

Tanto organismos procariontes (bactérias) quanto eucariontes (principalmente os fungos) são capazes de produzir ácidos orgânicos naturalmente (ABBOTT *et al.*, 2009) por vias fermentativas clássicas. Bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Propionibacterium*, por exemplo, são capazes de produzir ácido láctico e propiônico, respectivamente (ABBOTT *et al.*, 2009; SUWANNAKHAM *et al.*, 2005).

Além do gênero *Propionibacterium*, o ácido propiônico também pode ser produzido através da fermentação de algumas outras bactérias anaeróbias como, por exemplo, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Fusobacterium spp.* *Fusobacterium*, entre outras (BOYAVAL, 1994; SESHADRI, 1993; PLAYNE, 1985).

A *Propionibacterium* é considerada como a produtora mais promissora. Várias espécies, incluindo *Propionibacterium zeae*, *Propionibacterium thoenii*, *P. freudenreichii*, *Propionibacterium shermanii*, *P. acidipropionici*, *Propionibacterium jensenii* e *Propionibacterium beijingense* têm sido estudados sob os aspectos biotecnológicos.

Entre elas, *P. acidipropionici* (CORAL, 2008; GOSWAMI *et al.*, 2001; HIMMI *et al.*, 2000.), *P. shermanii* (CORAL, 2008; QUESADA-CHANTO *et al.*, 1998; ANDERSON *et al.*, 1986; JAIN *et al.*, 1991), e *P. freudenreichii* *spp. shermanii* (HIMMI *et al.*, 2000; BORDER *et al.*, 1987) têm sido usados principalmente devido à sua excelente na capacidade de produzir o ácido propiônico, como pode ser visto na tabela 4.

A *Propionibacterium acidipropionici* é a espécie mais utilizada para desenvolvimentos da produção industrial de ácido propiônico (MARTINEZ-CAMPOS, 2002; WOSKOW, 1991). Esta espécie é geralmente reconhecida como segura e tem sido amplamente usada na indústria de laticínios para a produção de queijo (SALMINEN *et al.*, 1998).

Propionibacterium são gram-positivas, *catalase*-positivas, sem motilidade, anaeróbios facultativos em forma de bastão e não formadores de esporos, que podem crescer em várias categorias de fontes de carbono. Uma variedade de fontes de carbono, como glicose (HIMMI, 2000; RICKERT, 1998; CHOI, 1994; LEWIS, 1992), lactose (GOSWAMI, 2000; LEWIS, 1992; HSU, 1991), xilose (CARRONDO, 1988), sacarose (QUESADA-CHANTO, 1994), glicerol (BORIES, 2004; HIMMI, 2000; BARBIRATO, 1997) e lactato (GU, 1998; RICKERT, 1998; LEWIS, 1992) poderia ser usado por este microrganismo como substrato. Suas propriedades metabólicas e requisitos nutricionais foram estudados extensivamente (HETTINGA, 1972).

Diferentes variáveis de processo influenciam na produção de ácido por *Propionibacterium*, incluindo a espécie do microrganismo, pH, temperatura, fontes de carbono, quantidade de inóculo, tempo de fermentação e concentração, conforme apresentado na tabela 4 (AHMADI *et al.*, 2017).

Tabela 4 - Cepas e detalhes correspondente à produção do ácido propiônico.

CEPA	TIPO DE CULTIVO	SUBSTRATO	PRODUÇÃO DE PA (g/L)	PRODUTIVIDADE (g/L.h)	REFERÊNCIAS
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Batelada Alimentada	Glicerol	44.62	0.20	Zhu <i>et al.</i> , 2010
	Bioreator de leite fibroso	Glicerol / Glicose / Lactato	~100	-	Zhang & Yang, 2009a, 2009b
	Fermentação extrativa	Lactose	75	~1	Jin & Yang, 1998
	Batelada	Lactato/ Cana de Açúcar/ Melaço	15.06	0.26	Coral <i>et al.</i> , 2008
	Bioreator de leite fibroso	Glicose	71.8	-	Suwannakham <i>et al.</i> , 2005;
	Batelada	Soro do Queijo	3.30	-	Morales <i>et al.</i> , 2006
	Batelada Alimentada	Glicose/Lactato	~30	-	Martinez-Campos. 2002
	Fermentação com células imobilizadas	Lactose	18.61	0.31	Coronado <i>et al.</i> , 2001
	Fermentação com reciclo de células	Xilose	-	2.7	Carrondo <i>et al.</i> , 1988
	Batelada/Batelada alimentada/Fermentação extrativa	Lactose/ Glicose/ Lactato	15	-	Hsu & Yang, 1991; Lewis & Yang, 1992b, 1992c
	Batelada	Glicose/ Glicerol	~42	0.167	Barbirato <i>et al.</i> , 1997
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Bioreator de leite fibroso (batelada alimentada)	Glicose	67.05	0.14	Feng <i>et al.</i> , 2010a
	Batelada	Farinha (wheat flour)	20	-	Border <i>et al.</i> , 1987
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Batelada	Glicose	12.5	-	Quesada-Chanto <i>et al.</i> , 1998a
	Batelada	Glicose/ Glicerol	~9	-	Himmi <i>et al.</i> , 2000
<i>Propionibacterium microaerophilum</i>	Batelada	Glicose	~	-	Koussemon <i>et al.</i> , 2003
<i>Propionibacterium beijngense</i>	Batelada	Glicose	11.32	-	He Y & Jin, 1990

Fonte: Liu *et al.*, 2012.

A figura 4 abaixo apresenta a Equação de Fitz, que mostra a formação do ácido propiônico a partir de Propionibactérias (BOYAVAL; CORRE, 1995 *apud* TELES, 2016).

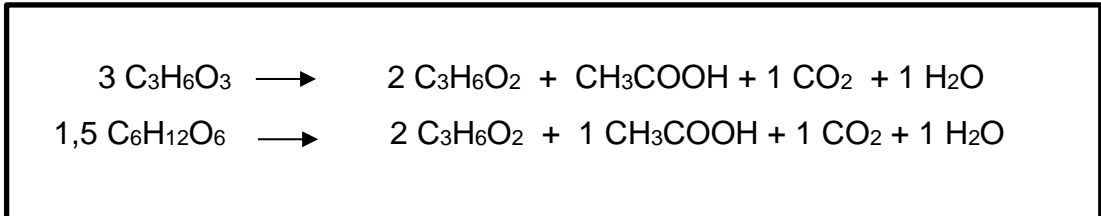


Figura 4 - Equação de formação do ácido propiônico

Fonte: Boyaval & Corre, 1995.

A via do ácido dicarboxílico é a via mais comum para a formação do ácido propiônico. A maioria das bactérias que produzem ácido propiônico usa lactato como substrato em vez de glicose. O propionato pode ser obtido a partir do lactato pelo ácido dicarboxílico (Figura 5) ou pela via acrílica, a escolha da rota depende de cada espécie bacteriana (CORAL, 2008; ELES, 2016).

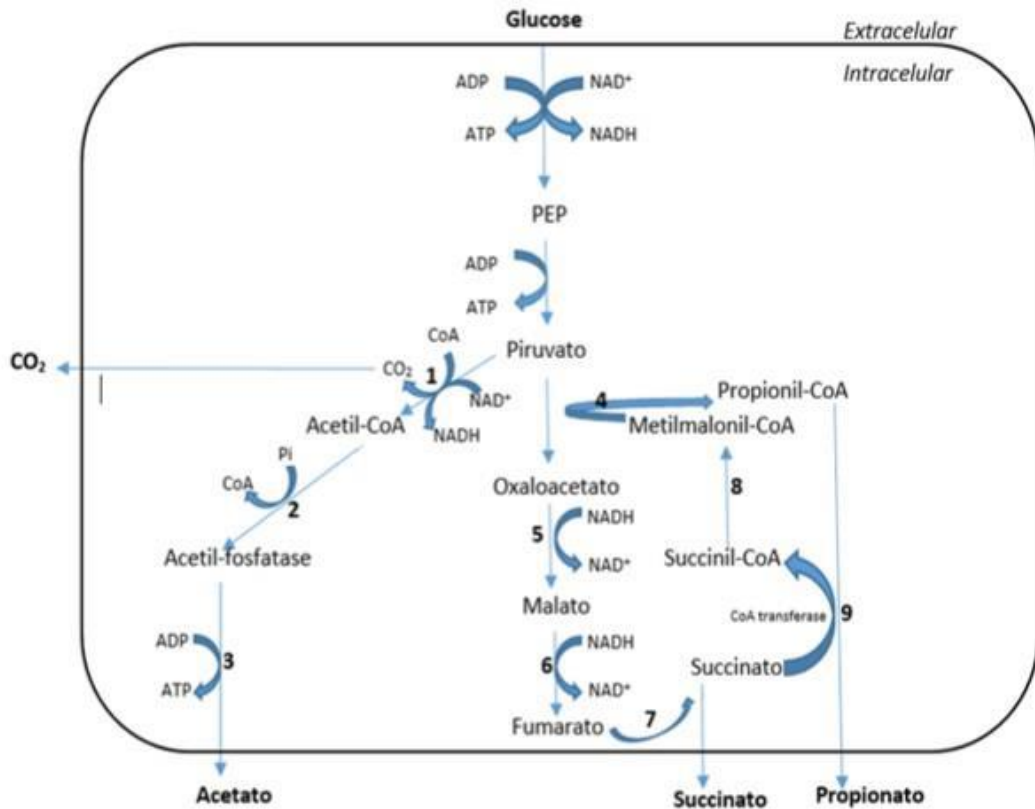


Figura 5 - Via do ácido dicarboxílico para formação do ácido propiônico

Fonte: Teles, 2016.

2.1.3.2.1 Condições Operacionais

As condições ideais de crescimento são para uma faixa de pH de 6 a 7 (SESHADRI, 1993; HSU, 1991) e uma faixa de temperatura de 30 a 37°C (SESHADRI, 1993). Se o valor de pH estiver abaixo de 4,5, praticamente não há crescimento e haverá baixa formação de ácidos orgânicos (HSU, 1991; PLAYNE, 1985).

Propionibactérias são capazes de usar diferentes fontes de carbono incluindo glicose, frutose, maltose, sacarose, xilose, lactose, glicerol, melão e lactato (AHMADI, 2017). No entanto, se torna um processo economicamente desvantajoso em termos de meticulosidade da tarefa, consumo de tempo (2 semanas em fermentação em batelada), inibição pelo produto final, e processo downstream (processamento de concentração e recuperação do produto) caro (CORAL, 2008). Portanto, muitos estudos têm sido conduzidos para investigar a aplicação de resíduos agroindustriais baratos ou fontes renováveis (como glicerol e melão de cana-de-açúcar) (CORAL et al., 2008; WANG et al., 2013; LIU et al., 2011) ou substratos de baixo custo (como soro de leite, hidrolisados de farinha, água de maceração, glúten de milho, licor residual de polpa de madeira, licores residuais de sulfito, e lignoceluloses) e desenvolver um processo de melhor aproveitamento (AHMADI, 2017).

2.1.3.2.2 Métodos Fermentativos

Vários métodos de melhoramento foram desenvolvidos para a produção biotecnológica. Técnicas como fermentação descontínua (ZHU *et al.*, 2010), fermentação descontínua alimentada (WOSKOW & GLATZ, 1991; ZHU *et al.*, 2010), fermentação extrativa (SOLICHIEEN *et al.*, 1995) e fermentação por células imobilizadas (YANG *et al.*, 1995) foram desenvolvidas para a produção de PA.

As vantagens e desvantagens de cada método foram investigadas com o objetivo de alta produção de ácido propiônico a baixo custo. A fermentação em batelada é um sistema comumente utilizado na produção de ácido propiônico, no qual o processo de produção leva em média 2 semanas (BOYAVAL *et al.*, 2015 *apud* TELES, 2016).

O principal obstáculo no processo de fermentação por batelada é o crescimento lento das bactérias e a inibição vigorosa pelo produto final (GOSWAMI *et al.*, 2001).

O bioprocesso convencional de produção de ácido propiônico sofre de baixa concentração, baixo rendimento e baixa produtividade. No entanto, a fermentação em batelada é geralmente aplicada na maioria dos trabalhos porque permite controle do processo com mais facilidade. Fermentações descontínuas alimentadas com e sem membranas extrativas também foram usadas para aumentar as taxas de produção e de rendimentos de fermentação (GOSWAMI *et al.*, 2001).

2.3. IMOBILIZAÇÃO CELULAR

A imobilização de células microbianas refere-se à sistemas ou técnicas em que ocorre o isolamento físico ou separação espacial dos microrganismos, permitindo seu reuso econômico. As células imobilizadas têm atraído grande atenção desde a década de 1970, o interesse inicial nas células imobilizadas foi direcionado ao seu uso como alternativa a certas enzimas imobilizadas, pois células inteiras evitam a necessidade de isolamento e purificação enzimática (WANG *et al.*, 2005).

Na literatura, muitas são as vantagens quanto ao uso da técnica de imobilização celular em relação ao uso de células livres, entre elas podem ser destacadas (SOUSA, 2016):

- i. alta dosagem de células por volume de reator;
- ii. fácil recuperação das células do meio;
- iii. possibilidade de utilização em sistemas contínuos;
- iv. reutilização das células;
- v. células resistentes às condições adversas, como altas temperaturas, variação de pH e turbulência do meio;
- vi. baixa ou nenhuma inibição causada pela alta concentração de substrato e produto;
- vii. aumento da produtividade e conseqüentemente maior rendimento do produto;
- viii. obtenção de um mosto fermentado mais puro, diminuindo o tempo de purificação do mesmo.

2.3.1. Métodos de Imobilização

A imobilização é geralmente conseguida através do contato de um material utilizado para a imobilização com as células vivas que se pretende imobilizar, sob condições controladas. Esse material é denominado suporte (PRADELLA, 2001).

O bom desempenho dos sistemas de células imobilizadas depende principalmente da correta seleção do suporte de imobilização. Geralmente, o suporte deve ser capaz manter sua integridade física, sendo insolúvel e estável ao produto químico e nas condições térmicas do bioprocessamento. Deve ainda ser resistente à degradação microbiana, não pode reagir com os substratos e produtos presentes no meio de fermentação, devendo estar disponível em excesso. (SOUSA, 2016).

Os suportes mais utilizados na imobilização de células podem ser vistos na tabela 5:

Tabela 5 - Materiais usados para a produção de suportes de fixação de células.

POLIMEROS NATURAIS	POLIMEROS SINTÉTICOS	MATERIAIS INORGÂNICOS
Alginato	Poliacrilamida	Alumina
k-carragenana	Cloreto de polivinila	Sílica
Agar	Poliestireno	Zircônia
Pectina	Poliuretano	Vidro
Celulose	Polietileno glicol	Diatonita
Dextrana		Vermiculita
Colágeno		

Fonte: Pradella, 2001.

Segundo KOURKOUTAS *et al.*, 2004, as técnicas de imobilização podem ser divididas em quatro principais categorias, baseadas no mecanismo físico empregado (Figura 6):

- fixação ou adsorção em superfícies com suporte sólido;
- aprisionamento dentro de uma matriz porosa;
- autoagregação por floculação (natural) ou com agentes de reticulação (induzidos artificialmente);
- contenção de células através de barreiras.

Dentre essas técnicas, o aprisionamento em matriz porosa é o método mais utilizado devido a sua facilidade, baixíssima toxidez e alta capacidade de retenção celular (PRADELLA, 2001).

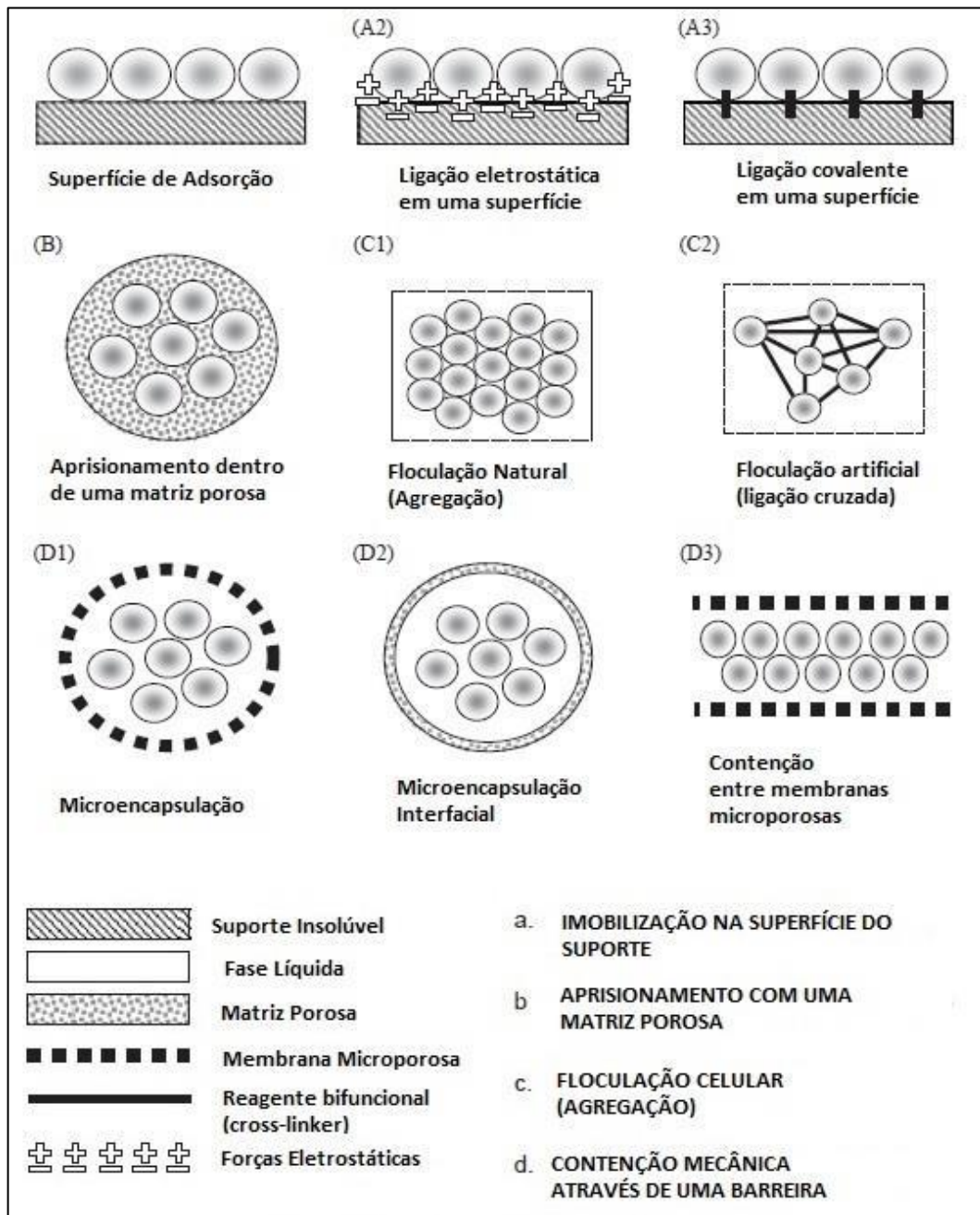


Figura 6 - Métodos principais de imobilização celular.

Fonte: Kourkoutas *et al.*, 2004.

2.3.1.1. Aprisionamento em matriz porosa

A técnica envolve o encapsulamento físico de uma população de células em uma matriz polimérica que forma um gel hidrofílico. Os poros da matriz resultante são menores que as células em seu interior (PRADELLA, 2001).

O método é baseado na integração de células em uma rede rígida para evitar a difusão das células no ambiente circundante, enquanto permite a transferência de massa de nutrientes e metabólitos. Exemplos característicos deste tipo de imobilização são o aprisionamento em géis de polissacarídeo como alginatos, *k-carragenana*, *ágar*, quitosana e ácido *poligalacturônico* ou outras matrizes poliméricas como gelatina, colágeno e álcool polivinílico. O crescimento de células na matriz porosa depende das limitações de difusão impostas pela porosidade do material e posteriormente pelo impacto da biomassa acumulada (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

2.3.1.2. Aprisionamento em Alginato de Cálcio

Entre as cápsulas derivadas dos vários tipos de materiais, a formada por alginato é provavelmente a mais frequentemente utilizada devido à facilidade de manuseio, natureza atóxico e baixo custo. O alginato é um polissacarídeo linear de origem natural composto por unidades de ácido manurônico ligado por ligações glicosídicas do tipo β - (1→4) e, também, por unidades de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo α -(1→4) (Figura 7). Unidades M e G podem variar em proporção e distribuição sequencial ao longo da cadeia do polímero (GUO *et al.*, 2006).

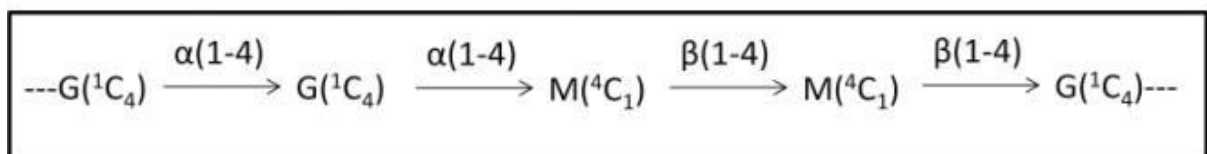


Figura 7 - Estrutura química do alginato de sódio, G = ácido gulurônico, M = ácido manurônico.
Fonte: Giese, 2015.

Estes polissacarídeos foram isolados, primeiramente, de algas marrons pertencentes aos gêneros *Laminaria* e *Macrocystis*, sendo também produzidos por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*, sendo que a proporção de β -manurato e α -guluronato depende da origem do alginato (GIESE, 2015).

A formação das esferas de alginato de cálcio ocorre através de uma reação denominada gelificação iônica (Figura 8). A ligação dos íons Ca^{2+} aos resíduos de guluronato resulta na formação de esferas de gel de alginato consistentes e insolúveis.

As características das células imobilizadas formadas dependerão da velocidade de fluxo, densidade da solução de polímero e concentração da solução iônica na qual o gel será formado. O grau de substituição de íons Ca^{2+} depende do tempo de contato entre as esferas formadas e a solução iônica, assim como da acidez desta solução. De maneira geral, a substituição é máxima em pH próximo à neutralidade no tempo de contato de 1 hora na presença de íons Ca^{2+} (GIESE, 2015).

As interações iônicas entre blocos de guluronato e íons de Ca^{2+} causam a formação de um gel forte, termoestável cujas propriedades dependem amplamente das características do polímero e do método de preparação (FUNDUEANU *et al.* 1999).

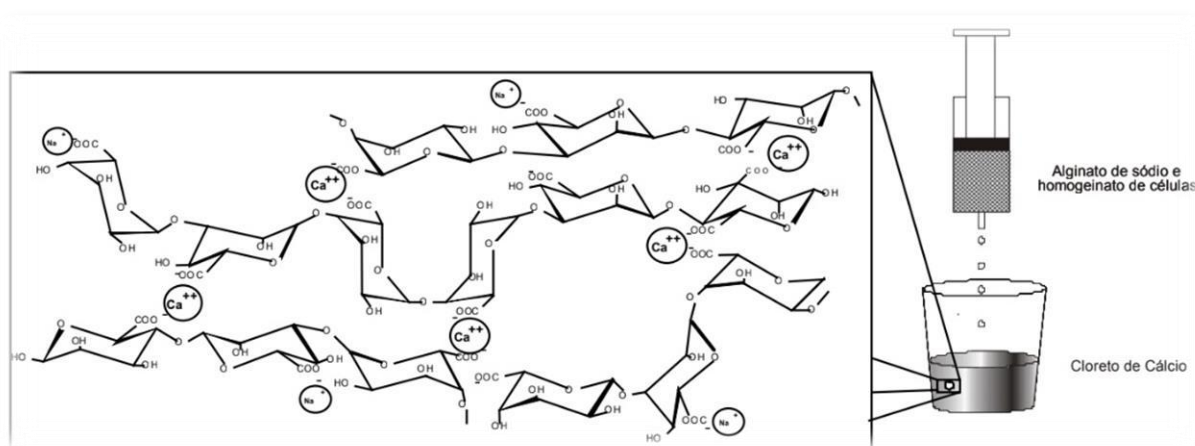


Figura 8 - Formação do gel de alginato de cálcio por aprisionamento.

Fonte: COVIZZI *et al.*, 2007.

2.3.2. Biorreatores com células imobilizadas

O confinamento celular que ocorre a partir das técnicas de imobilização permite que a utilização de reatores de configuração bastante diferenciada do tradicional fermentador (tanque) continuamente agitado (CSTR). A maior parte dos biorreatores estudados para sistemas com células imobilizadas constituem-se de colunas operadas continuamente, contendo um leito fixo ou fluidizado das partículas com as células imobilizadas (PRADELLA, 2001).

O maior desempenho dos biorreatores é proveniente da alta densidade das células fixadas no suporte escolhido. Os principais tipos de biorreatores com células imobilizadas podem ser reatores de leito fixo e leito fluidizado (Figura 9), os quais podem sofrer modificações para melhorar a transferência de massa e demais parâmetros das condições de cultivo (GIESE, 2015).

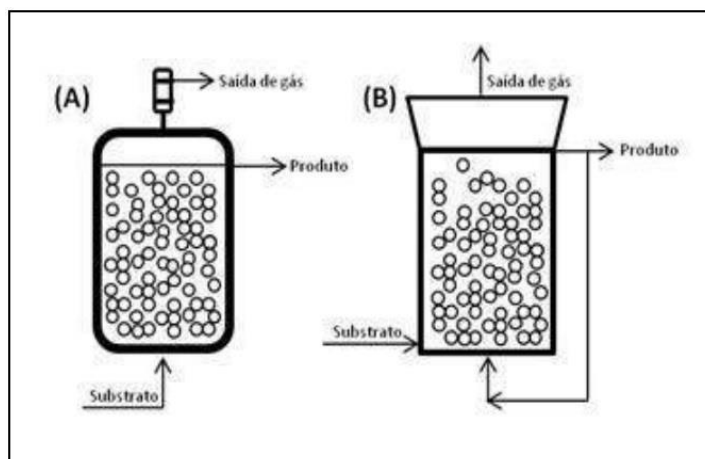


Figura 9 - Tipos de reatores empregados (A) leito fixo, (B) leito fluidizado.
Fonte: Giese, 2015.

2.4. Tendências Futuras

Apesar de ser um processo bastante promissor em relação ao processo químico, a via da biotecnologia ainda enfrenta algumas dificuldades como crescimento celular lento, forte inibição pelo próprio ácido propiônico e seus subprodutos, baixa produtividade e eficiência. Assim, ainda são necessários esforços de pesquisa para aprimorar essa técnica, em particular para aumentar o rendimento do ácido propiônico e baratear a produção por essa rota. Estudar as opções de imobilizar células também pode tornar o processo mais barato, pois as células imobilizadas podem ser separadas mais facilmente na etapa de *downstream* (CHOOJUN et. al., 2011).

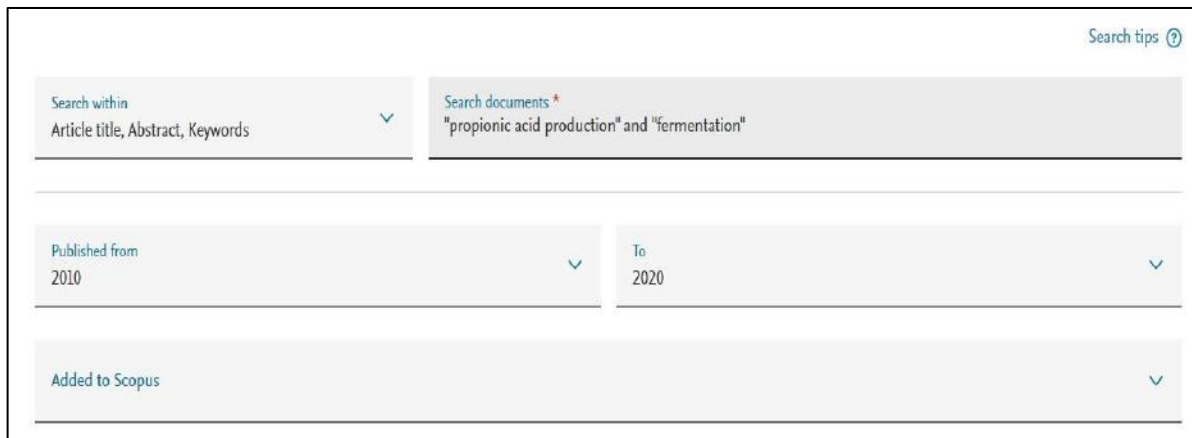
3. PROSPECÇÃO DE ARTÍGOS CIENTÍFICOS

3.1. METODOLOGIA

Para a busca de produções acadêmicas sobre o ácido propiônico realizou-se um levantamento bibliográfico, por meio da base de dados *Scopus*, de artigos publicados no período de 2010 a 2020. Este banco de dados pertence à *Elsevier*, sendo considerado um dos maiores. Abrange cerca de 19,5 mil títulos, mais de 5 000 editoras internacionais, incluindo a cobertura de 16 500 revistas *peer-reviewed* nos campos científico, técnico, e de ciências médicas e sociais.

Esta busca foi realizada em maio de 2021 e foram utilizados descritores em inglês: “*propionic acid production*” e “*fermentation*”, nos campos de pesquisa configurado para “título”, “resumo” e “palavras-chaves”. O termo de junção empregado entre as palavras foi “*and*”.

A pesquisa foi realizada em *Search*, no ambiente apresentado na figura 10.



The image shows a screenshot of the Scopus search interface. At the top right, there is a link for "Search tips" with a question mark icon. Below this, there are three main sections: 1. "Search within" with a dropdown menu currently set to "Article title, Abstract, Keywords". 2. "Search documents*" with a text input field containing the query: "\"propionic acid production\" and \"fermentation\"". 3. "Published from" and "To" filters, both set to "2010" and "2020" respectively. At the bottom, there is a filter for "Added to Scopus" with a dropdown arrow.

Figura 10 - Ambiente de pesquisa da plataforma Scopus

Fonte: Autoria própria, 2021.

Foram realizadas ao todo três buscas distintas. Na primeira utilizou-se os termos “*propionic acid*”, “*production*” e “*fermentation*”. Na segunda, juntou-se os termos “*propionic acid*” e “*production*”. Na última busca incluiu-se também o termo “*propionibacterium*”.

3.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando a metodologia definida, foi possível obter o número total de publicações encontradas com as diferentes palavras-chaves utilizadas, conforme mostra a tabela 6.

Tabela 6 - Número de Publicações.

Propionic Acid	Production	Fermentation	Propionic Acid Production	Propionibacterium	Número de Publicações
X	X	X			1463
		X	X		91
		X	X	X	52

Fonte: Autoria própria, 2021.

Segundo a tabela 6, à medida que se aumenta o número de palavras-chaves, mais restritivo e menos publicações são encontrados. Na primeira busca foi possível encontrar muitas publicações relacionadas ao tema deste trabalho, no entanto, também foram encontrados muitos outros relacionados à produção compostos e produtos que não estavam relacionados com o ácido propiônico, elevando muito o número de publicações.

Ao todo, foram 1 463 trabalhos na primeira busca. Na segunda busca, incluiu-se como único termo as palavras “*propionic acid production*” de modo a restringi-la apenas em artigos e trabalhos relacionados exclusivamente com a produção do ácido propiônico por via fermentativa. O emprego das aspas indica para a base de dados que a busca deve ser feita com as palavras em conjunto. Nesta segunda busca, encontrou-se 91 publicações que foram então analisadas.

As figuras 11, 12, 13 e 14, mostram respectivamente, a evolução com o tempo, a distribuição e composição por tema de cada trabalho, os principais países publicadores, e por fim, os principais tipos de documentos.

Com relação aos principais categorias de microrganismos usados, foi realizada uma terceira busca conforme apresentado na tabela 6. Como esperado, as bactérias do gênero *Propionibacterium* são as mais amplamente utilizadas para estudos da produção do ácido propiônico. Com relação ao uso de fungos ou leveduras, foi encontrado um único trabalho que menciona o uso de *Saccharomyces cerevisiae* usada na co-fermentação para produção de ácido propiônico.

Conforme mostra a figura 11, com exceção do ano de 2016, há uma certa estabilidade no número de publicações relacionado ao tema no período de 2010 a 2020. Uma possibilidade para esta estabilidade é a complexidade das rotas biotecnológicas, visto que existem muitas dificuldades relatadas pelos autores, tais como o lento crescimento das bactérias propiônicas, a forte inibição pelos produtos finais, a produtividade reduzida, o que torna o custo do processo caro e os desafios com relação às soluções para redução desse custo (GOSWAMI *et al.*, 2000; RICKERT *et al.*, 1998; SUWANNAKHAM *et al.*, 2005; TELES, 2016).

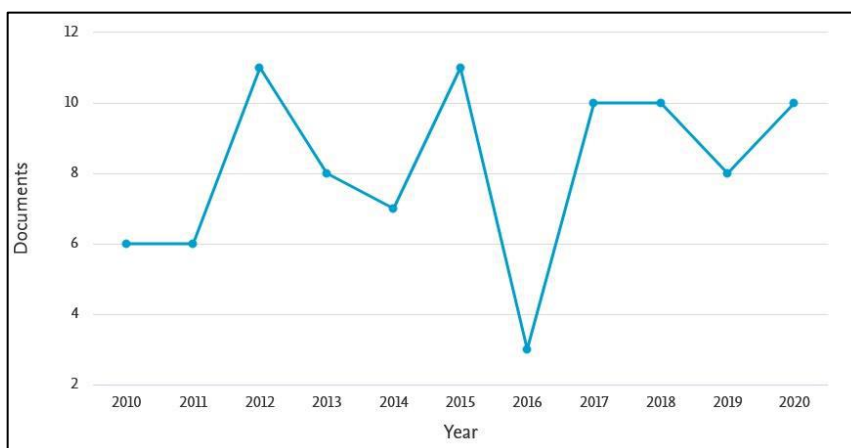


Figura 11 - Trabalhos publicados por ano. Palavras-chave: “*propionic acid production*” e “*fermentation*”.

Fonte: Autoria própria, 2021.

A produção de ácido propiônico tem sido estudada em várias áreas (Figura 12), devido à variedade de aplicações deste produto. Publicações em vários campos fora da engenharia de bioprocessos são frequentes, como 9% em agricultura e ciências biológicas devido à fermentação ruminal por bactérias produtoras de ácido propiônico. À exemplo disso, em ruminantes, o ácido propiônico atua como uma das principais fontes de energia, pois é o principal ácido orgânico absorvido como substrato para a gliconeogênese hepática do animal (TELES, 2016). Além disso, com a proibição da União Europeia do uso de antibióticos promotores de crescimento em animais de fazenda, é possível usar o ácido propiônico como uma alternativa para apoiar a fermentação ruminal (MELO, 2017).

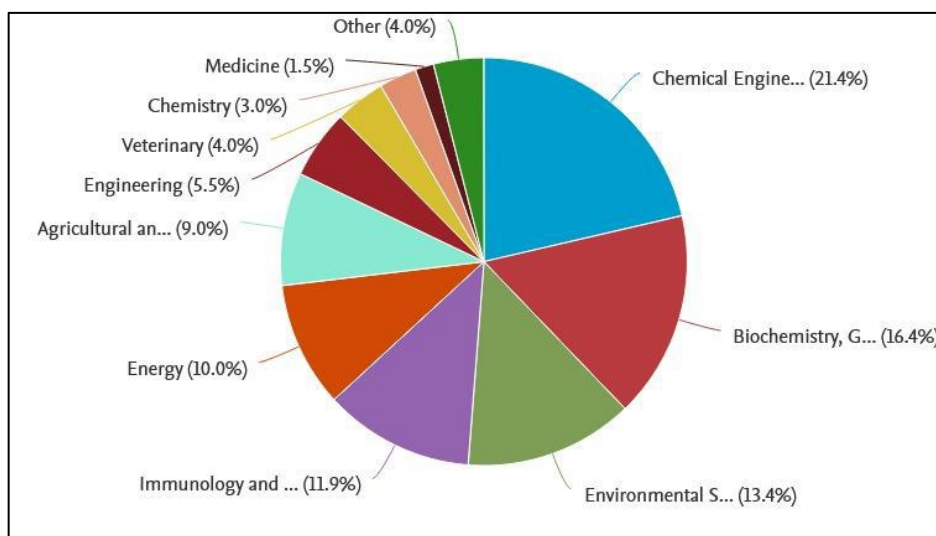


Figura 12 - Trabalhos publicados por área. Palavras-chave: “*propionic acid production*” e “*fermentation*”.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Conforme mostra a figura 13, o Brasil aparece em 3.º lugar em número de trabalhos publicados. Muitos trabalhos têm como o foco a sustentabilidade, a partir do reuso de resíduos industriais e matérias-primas renováveis e de baixo custo. À exemplo disso, Ngome *et al.* (2017), investigaram a produção de ácido propiônico a partir de subprodutos do soro desnatado da indústria de laticínios. A produção de queijo é um importante fator econômico de atividade no Brasil e chegou a 1 105 milhão de toneladas, segundo estimativa Associação das Indústrias de Queijo do Brasil (ABIQ, 2021).

Com relação aos principais tipos de microrganismos usados, foi realizada uma terceira busca conforme apresentado na tabela 6. Como esperado, as bactérias do gênero *Propionibacterium* são as mais amplamente utilizadas para estudos da produção do ácido propiônico. Com relação ao uso de fungos ou leveduras, foi encontrado um único trabalho que menciona o uso de *Saccharomyces cerevisiae* para produção de ácido propiônico. LIU *et al.*, 2012 investigaram a produção do ácido propiônico a partir de uma mistura de *Propionibacterium acidipropionici* e *Saccharomyces cerevisiae*. Em comparação com uma cultura pura, a cultura mista teve uma melhora significativa na produção do ácido propiônico (12,1 g / L vs. 10,1 g/L) e na eficiência de conversão de glicerol (60,5% vs. 50,5%).

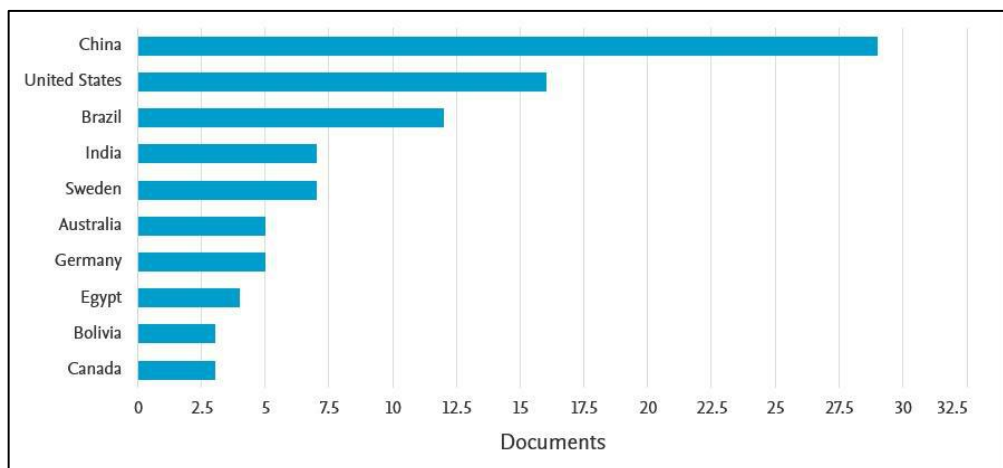


Figura 13 - Trabalhos publicados por país. Palavras-chave: “*propionic acid production*” e “*fermentation*”.

Fonte: Autoria própria, 2021.

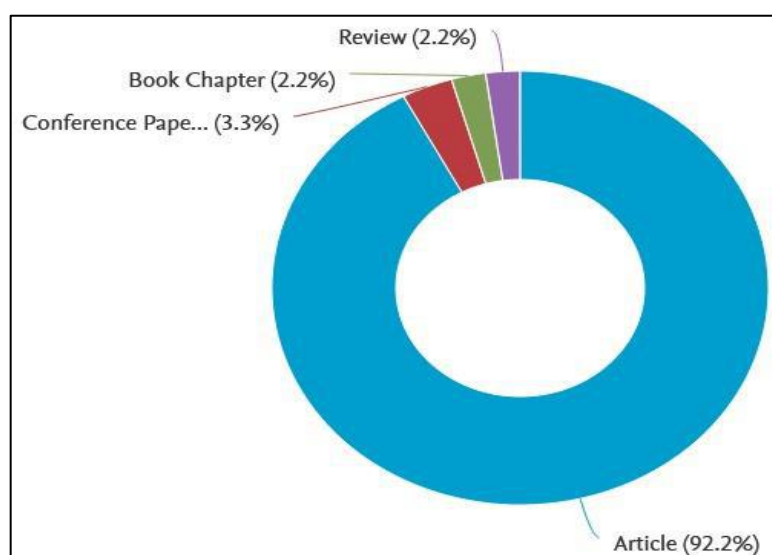


Figura 14 - Trabalhos publicados por tipo de documento. Palavras-chave: “*propionic acid production*”, “*fermentation*”, “*immobilized*”.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Para verificar a produção de ácido propiônico a partir de células imobilizadas, incluiu-se também o termo “*immobilized*” e foram encontrados 13 artigos. Dentre esses, diferentes tipos de mobilização foram usadas, tais como imobilização em bagaço da cana-de-açúcar, partículas de pneu, esferas de vidro, hidrogel, *Poraver*, entre outros. Dos 13 artigos encontrados, apenas 01 se tratava de imobilização por alginato.

Choojun et al.,2011 investigaram a melhora na produção de ácido propiônico a partir de células da *Propionibacterium acidipropionici* imobilizadas em alginato de

cálcio usando o soro do leite como substrato. Usando reatores de 2 litros com pH controlado a 6,5, alcançaram uma quantidade de ácido propiônico de 29,24 g/L e potencial consistente para reciclar 2 rodadas de fermentação, produzindo a quantidade total de $15,85 \pm 0,25$ g/L e $13,39 \pm 0,25$ g/L de ácido propiônico na fermentação da primeira e segunda batelada, respectivamente. Esta quantidade foi maior que a das células livres em fermentadores de 2 litros por 216 horas de fermentação.

Por fim, buscou-se avaliar o uso de biorreatores com células imobilizadas, e encontrou-se um total de 10 publicações, com a seguinte distribuição (Figura 15):

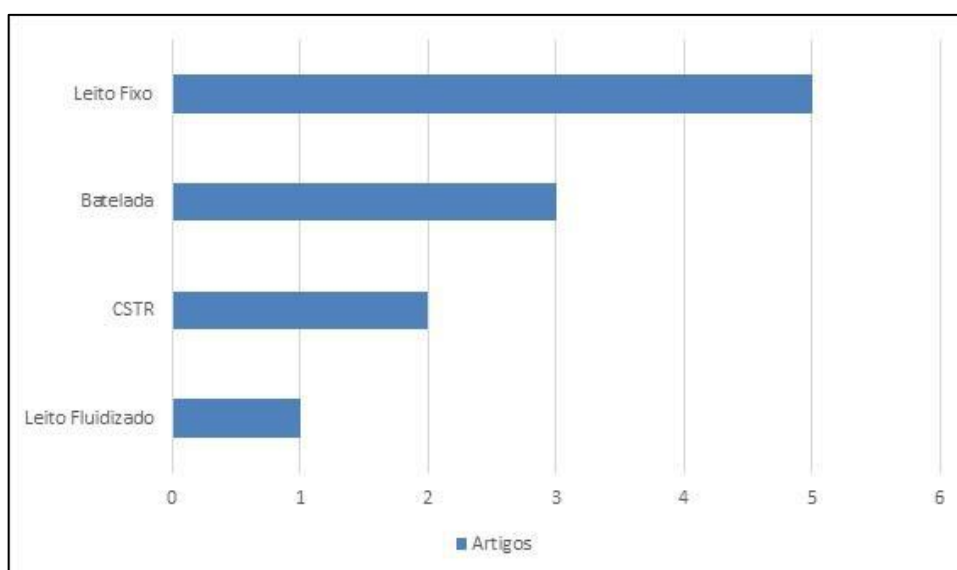


Figura 15 - Trabalhos publicados por tipo de reator usado. Palavras-chave: “propionic acid production”, “fermentation”, “immobilized” e “bioreactor”.

Fonte: Autoria própria, 2021.

É notório o baixo número de trabalhos com uso de biorreatores, em geral, para a produção de ácido propiônico a partir de células imobilizadas, o que denota uma boa área para exploração experimental.

4. ESTUDO DO CASO

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizado autoclave para esterilizar todas as vidrarias e meios de cultivo utilizados nos experimentos deste trabalho. Para vidrarias, o processo foi configurado para pressão de 1 atm e temperatura de 121°C durante 20 minutos.

Já os meios de cultivo, a autoclavagem foi realizado durante 15 minutos com pressão de 0,5 atm e temperatura de 111°C.

4.1.1. Microrganismo e Meio de Ativação

A linhagem de *Propionibacterium acidipropionici* (CIP 53 164) foi obtida do banco de cepas francês “*Institut Pasteur Collection – CIP*”, mantida em liofilização, armazenadas em ampolas , sob abrigo de luz.

A cepa foi ativada suspendendo as células em meio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*) para obter um pré-inoculo, cuja composição é mostrada na Tabela 7 abaixo.

Inicialmente foi preparado um meio contendo 37 g/L de solução de BHI, que foi então esterilizado e ajustado para pH=7. Em seguida, uma purga do CO₂ foi realizada por 10 minutos nos tubos, visando a obtenção de um ambiente anaeróbio.

Após a cultura ser retirada do estoque à -80 °C, esta foi incubada nos tubos de ensaio contendo alíquotas de 2mL de BHI, com o objetivo de estimular a ativação celular. O tubo de ensaio foi incubado à 30°C por 48h.

Tabela 7 - Composição do meio de cultivo BHI.

Componente	Concentração (g/L)
Hemina	0,1
Hidrolisado péptico de tecido animal	5
Hidrolisado pancreático de caseína	16
Cloreto de sódio	5
Glicose	2
°C	2,5
Ágar	13,5
Infusão de sólidos (cérebro-coração)	8

Fonte: Autoria própria, 2021.

4.1.2. Composição dos meios

Para todos os experimentos, as células foram inicialmente ativadas e em seguida propagadas.

4.1.2.1. Pré-Inóculo e Inóculo

Foram utilizados frascos de penicilina contendo 70 mL de meio *Reinforced Clostridial Broth* (RCB) esterilizado (Tabela 8). Após 48 horas de crescimento em meio BHI, alíquotas foram removidas e inoculadas para meio RCB. Após 24 horas, foi inoculado para um novo meio de RCB acrescido de 10g/L de substrato 10% (v/v) do volume do inóculo e incubado a 30°C por 24 horas em estufa, tempo necessário para que as células atingissem uma concentração equivalente ao final da fase exponencial de crescimento, com concentração máxima em torno de 4g/L (Castro, 2014).

Tabela 8 - Composição do meio *Reinforced Clostridial Broth* (RCB)

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g/L)
Caseína Enzimática Hidrolisada	10
Extrato de Carne Bovina	10
Extrato de Levedura	3
Dextrose	5
Cloreto de Sódio	5
Acetato de Sódio	3
Amido Solúvel	1
Hidrocloreto de L-Caseína	0,5

Fonte: Autoria própria, 2021.

Para o inóculo, o meio de preparo possuía a mesma composição que a tabela 8, acrescentado de 10g/L do substrato (glicose ou xilose). Frascos de 1L contendo 750 mL de meio de cultivo para inóculo foram inoculados a partir do volume total de 70 mL de pré-inóculo.

O meio de inóculo foi previamente esterilizado e realizado a purga de CO₂ por 10 minutos. A concentração celular foi determinada pela medida de densidade óptica a 600 nm (UV-1800 SHIMADZU), utilizando-se uma curva de calibração para absorvância (Figura 19).

O inóculo foi também incubado à 30°C por 24h, e após este período o meio foi centrifugado à 4°C (*Centrífuga Thermo Scientific MEGAFUGE 16R*), em rotação de 9.000 rpm por 10 minutos para separação do meio e as células.

O precipitado com células foi separado para ser usado na imobilização em alginato. Já para os experimentos com células livres, foi realizado apenas um repique para o meio de fermentação.

4.1.2.2. Meio de Fermentação

Para fermentação, foi usado o meio TSB (Tabela 9) com incremento de 40 g/L do substrato utilizado no experimento. Após preparo, os meios foram adicionados em frascos de 500 mL contendo volume final de 350 mL. Os frascos foram submetidos a borbulhamento com CO₂ por 10 minutos.

Tabela 9 - Composição do meio de Fermentação.

Componente	Concentração (g/L)
TSB*	5
Extrato de Levedura	10
K ₂ HPO ₄	0,25
MnSO ₄	0,005

*TSB: peptona de caseína (5g/L), pepntona de soja (2g/L), cloreto de sódio (4g/L), dextrose (2,5 g/L) e fosfato de potássio dibásico (2,5 g/L)

Fonte: Autoria própria, 2021.

O meio TSB, componente do meio de fermentação é composto por 5 substâncias: a peptona de caseína e a de soja encontradas são fontes de aminoácidos e outras substâncias nitrogenadas complexas; a dextrose fornece energia; o cloreto de sódio mantém o equilíbrio osmótico e o fosfato de potássio dibásico controla o pH do meio atuando como tampão (SUWANNAKHAM *et al.*, 2005).

4.1.3. Sistema de Purga

De modo a garantir as condições anaeróbicas do meio de fermentação, este trabalho utilizou um sistema de purga adaptado ao descrito por Borges (2011).

Segundo a metodologia do autor, o sistema projetado para disponibilizar o CO₂ no meio de fermentação foi constituído, basicamente, dos seguintes materiais:

- 1- cilindro de CO₂;
- 2- manômetro para controle de pressão;
- 3- rotâmetro para controle e monitoramento da vazão de gás;
- 4- membrana milipore para filtração do gás carbônico de entrada;
- 5- divisores plásticos, comumente empregados para distribuição de ar;
- 6- Câmara de Fluxo Lâminar com mangueiras dispostas para conexão entre os instrumentos utilizados e seringas descartáveis para permitir a passagem do gás carbônico para o interior dos frascos *Erlenmeyer* (Figura 16).

Cabe ressaltar que, diferentemente do sistema descrito pelo autor, o sistema de purga foi adaptado para o interior de uma câmara de fluxo laminar (ao invés de um *Shacker*).

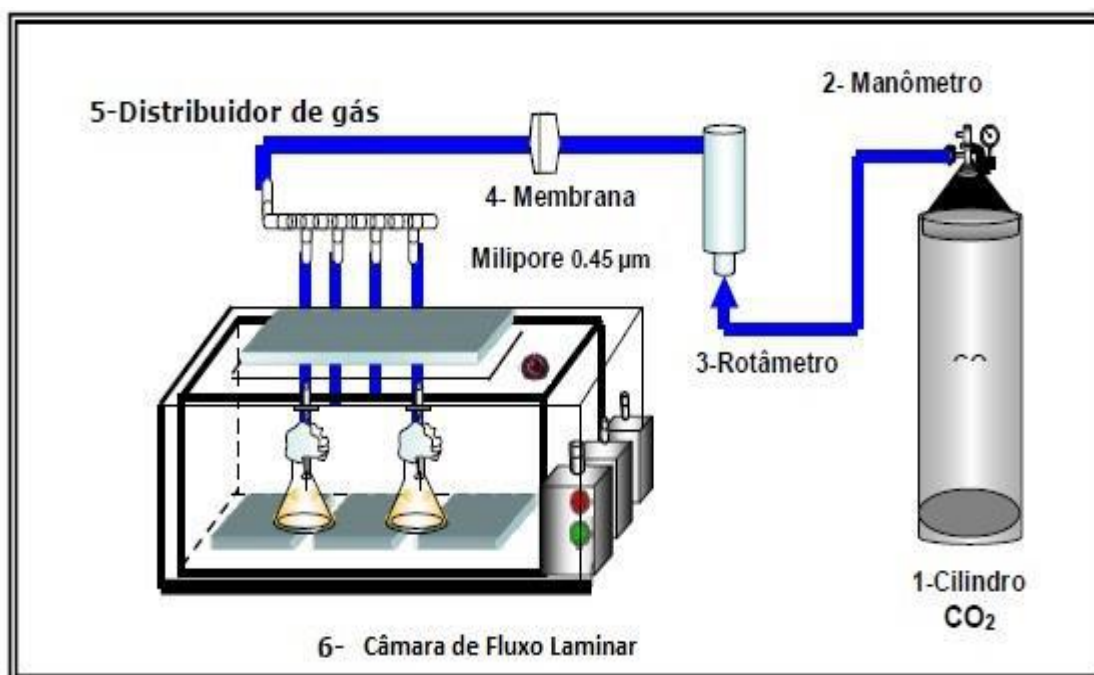


Figura 16 - Esquema ilustrativo do sistema de Purga de CO₂.

Fonte: Adaptado de Borges, 2011.

4.1.4. Imobilização em Alginato de Cálcio

Este trabalho utilizou o mesmo sistema de imobilização de células proposto por Silva, 2018. Após as células crescidas em meio inóculo terem sido previamente centrifugadas conforme condições descritas anteriormente, estas foram imobilizadas

por envolvimento em gel. Para tanto, a suspensão celular centrifugada foi misturada sob constante e cuidadosa agitação à uma solução de alginato de sódio 20 g/L, previamente preparada e esterilizada.

A mistura celular com alginato de sódio foi adicionada por gotejamento à uma solução estéril de cloreto de cálcio 0,1 M com o auxílio de uma bomba. Durante o gotejamento, são formadas esferas geleificadas de aproximadamente 4,0 mm de diâmetro através do contato da solução com os íons de cálcio. Após a imobilização, o frasco é reservado em refrigeração num período de 12 à 48 horas. A figura 17, mostra um esquema do processo (SILVA, 2018).

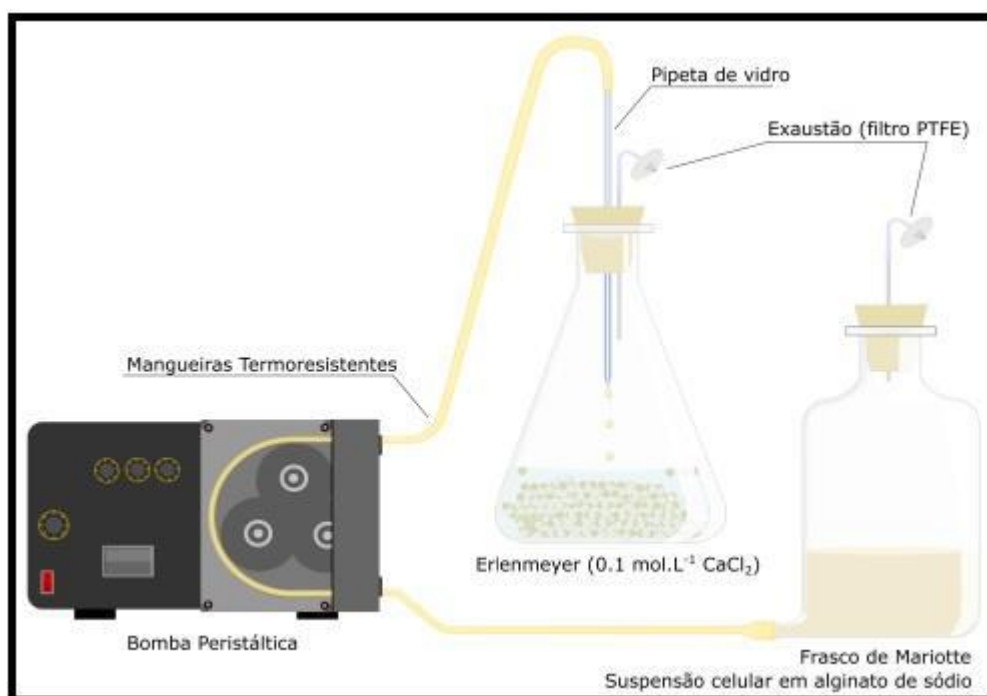


Figura 17 - Sistema de gotejamento da solução celular/Alginato de Cálcio em solução de Cloreto de Cálcio 0,1M.

Fonte: Silva, 2018.

4.1.5. Avaliação da Relação Quantidade de Células X Volume do Gel Alginato de Cálcio

Nesta etapa, o objetivo foi avaliar a melhor proporção da concentração de células em relação ao volume de alginato de cálcio no processo de gelificação. Foram avaliados xilose como fonte de carbono, mantendo-se fixa sua concentração.

Para condução deste experimento, foi realizado a fermentação em células imobilizadas em frascos cônicos de 500 mL contendo um volume final de 350 mL de meio de fermentação. Os experimentos foram incubados por 5 dias à 30°C em *Shaker* com 200 rpm/minuto. Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas para avaliação dos resultados.

A tabela 10 apresenta as diferentes proporções:

Tabela 10 - Composição das esferas de alginato de cálcio com células.

ENSAIO	XILOSE (g/L)	CÉLULAS (G) / ALGINATO (mL)
1	10	0,02
2	10	0,04
3	10	0,06

Fonte: Autoria própria, 2021.

4.1.6. Avaliação do Bioprocesso em Frascos de Batelada Simples

Com o objetivo de avaliar os efeitos da *Propionibacterium acidipropionici* em sua capacidade de converter o substrato em ácido propiônico, foram realizados testes com células livres e células imobilizadas, e em seguida, foram avaliados as variáveis respostas conforme descrito na metodologia, o perfil de crescimento celular, a produção do produto, e o consumo da xilose e/ou glicose.

Os experimentos foram realizados em frascos cônicos de 500 mL contendo um volume útil final de 350 mL de meio de fermentação (Figura 18).

Cada meio continha 40 g/L de xilose ou glicose, separadamente para cada teste, com diferentes concentrações e condições de operação já descritas nos tópicos anteriormente abordados. Os frascos foram incubados em shaker com rotação de 200 rpm/minuto em 30°C por 6 dias para acompanhar o consumo de glicose, bem como a produção do ácido propiônico. Alíquotas foram retiradas a cada 24h durante o período de 6 dias com o objetivo de avaliar o bioprocesso e traçar o perfil cinético de consumo do substrato e produção do ácido propiônico.

As amostras retiradas eram centrifugadas, tratadas e enviadas para análise de açúcares e ácidos orgânicos por Cromatografia, conforme está descrito no item 4.1.8.

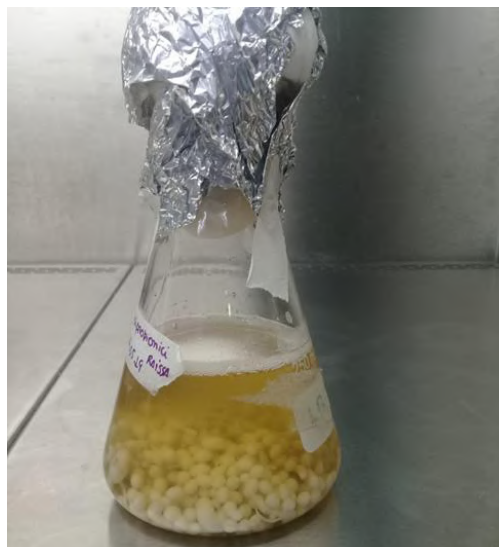


Figura 18 - Frasco de fermentação de células imobilizadas.
Fonte: Autoria própria, 2021.

4.1.7. Amostragem

A amostragem foi realizada retirando 2 mL com pipetas estéreis. As amostras foram centrifugadas a 8.000 rpm por 09 minutos. O sobrenadante foi enviado para análise de açúcar e ácido propiônico após filtração em membrana de celulose com porosidade de 0,22 μm .

A fracção depositada era então lavada e completada com 2 mL de água destilada. As células foram então ressuspensas com um agitador VORTEX e seguidas para leitura em um espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800).

A curva de calibração utilizada para quantificação da massa celular é apresentado na figura 19.

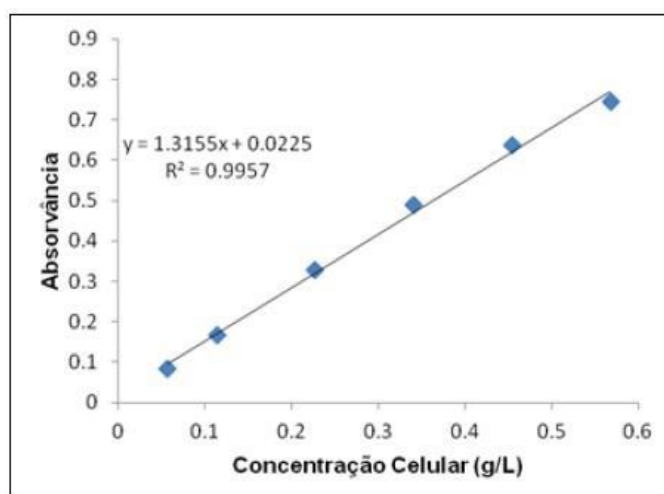


Figura 19 - Gráfico de calibração da massa celular seca x absorvância
Fonte: Castro, 2014.

4.1.8. Métodos Analíticos

4.1.8.1. Determinações Quantitativas

A quantificação das amostras contendo os açúcares e ácido propiônico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo “Shimadzu” e “Waters”, acoplado a uma coluna PL Hi-Plex. As condições operacionais utilizadas foram seguidas pelo método definido por Castro (2014):

- fase móvel de 0,005 mol/L de H₂SO₄;
- fluxo de 0,6 mL/min: volume de injeção de 20 µL ;
- temperatura do forno de 60°C e os detectores foram o Índice de Refração (RID a 50°C) para os açúcares e o Ultra-Violeta (UV/VIS) para o ácido propiônico.

As concentrações das substâncias analisadas nas amostras foram calculadas a partir de curvas de calibração com padrões externos de concentrações conhecidas. Foram utilizados cromatogramas típicos, conforme mostrado na Figura 20 e 21.

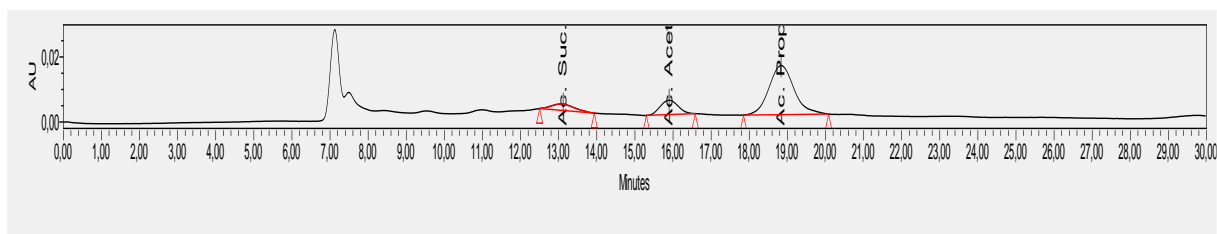


Figura 20 – Cromatograma para ácido propiônico

Fonte: Autoria própria, 2021.

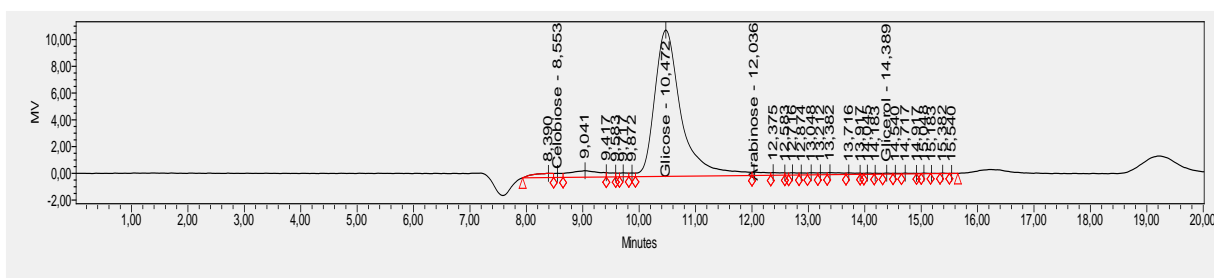


Figura 21 – Cromatograma para açúcares

Fonte: Autoria própria, 2021.

4.1.9. Avaliação de Resultados

4.1.9.1. Cálculo da Eficiência do Processo

A eficiência de conversão do substrato em ácido propiônico pode ser medido de acordo com a quantidade de ácido produzido a cada 1g de substrato consumido, calculado a partir do valor de $Y_{P/S}$ teórico para *P. Acidipropionici* (MARTINEZ-CAMPOS, 2002).

Para cada 2 *mols* de glicose são produzidos 3 *mols* de ácido propiônico (LIU *et al.*, 2012), logo, a partir da razão $1,5 \times MM_{AC.PROPIÔNICO}/MM_{GLICOSE}$ tem-se o rendimento máximo teórico para glicose.

Com relação à xilose, sabe-se que a cada 2 *mols* do substrato são formados 2 *mols* de ácido propiônico, tendo o rendimento máximo teórico igual a $MM_{AC.PROPIÔNICO} / MM_{XILOSE}$ (CASTRO, 2014).

$$Ef = \frac{Y_{p/s} \text{ (processo)}}{Y_{p/s} \text{ (teórico)}} \times 100$$

Onde:

$Y_{p/s}$ (Teórico) para glicose = 0,62 g/g

$Y_{p/s}$ (Teórico) para xilose = 0,49 g/g

(MM_{GL}) Massa molecular da glicose = 180 g

(MM_{XL}) Massa molecular da xilose = 150 g

(MM_{AP}) Massa molecular do ácido propiônico = 74 g

4.1.9.2. Variáveis Resposta

Os parâmetros próprios de processo e que são utilizados para analisar e interpretar os resultados experimentais estão listados abaixo:

a) Fator de rendimento de produção de ácido propiônico (g/g)

$$Y_{p/s} = - \left(\frac{\Delta P}{\Delta S} \right) = \left(\frac{P - P_0}{S - S_0} \right)$$

Onde:

P: Concentração final de ácido propiônico (g/L)

P₀: Concentração inicial de ácido propiônico (g/L)

S: Concentração final de substrato (g/L)

S₀: Concentração inicial de substrato (g/L)

b) Fator de rendimento para crescimento celular (g/g)

$$Y_{x/s} = -\left(\frac{\Delta X}{\Delta S}\right) = \left(\frac{X - X_0}{S - S_0}\right)$$

Sendo:

X: Concentração final de células (g/L)

X₀: Concentração inicial de células (g/L)

S: Concentração final de substrato (g/L)

S₀: Concentração inicial de substrato (g/L)

c) Produtividade volumétrica (g/L.h)

$$Q_p = \frac{P - P_0}{t_f}$$

Onde:

P: concentração final de ácido (g/L)

P₀: concentração inicial de ácido (g/L)

t_f tempo de fermentação (h)

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do Consumo de Xilose e Glicose em células livres

Neste experimento, buscou-se avaliar o consumo de glicose e xilose comerciais por *Propionibacterium acidipropioni* (CIP 53 164) por meio de parâmetros como consumo de substrato, produção de ácido propiônico e crescimento celular, bem como as principais variáveis de resposta conforme descrito nas metodologias.

A fermentação foi realizada em frasco de 500 mL com volume final de 350 mL. As concentração e as condições de operação estão especificadas no capítulo de Materiais e Métodos.

Os perfis cinéticos que demonstram o desempenho da *P. Acidipropioni* em relação aos substratos em regime de batelada simples estão apresentados abaixo (Figuras 22 e 23).

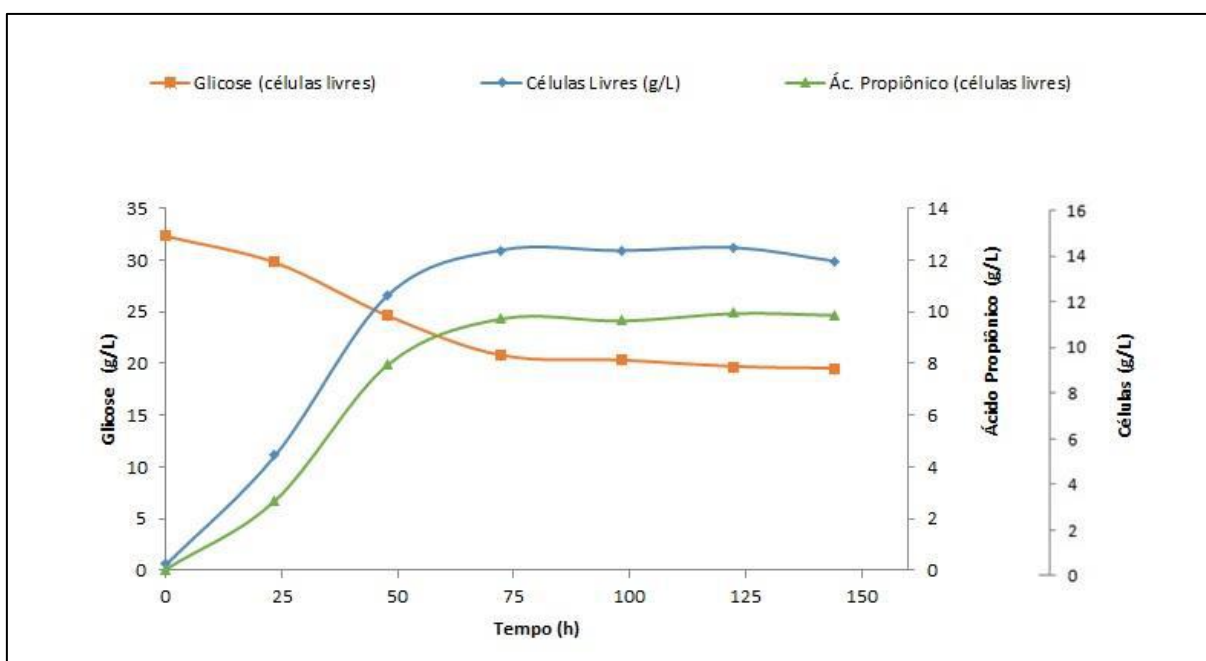


Figura 22 - Perfil cinético do processo de fermentação de Glicose à partir de células livres

Fonte: Autoria própria, 2021.

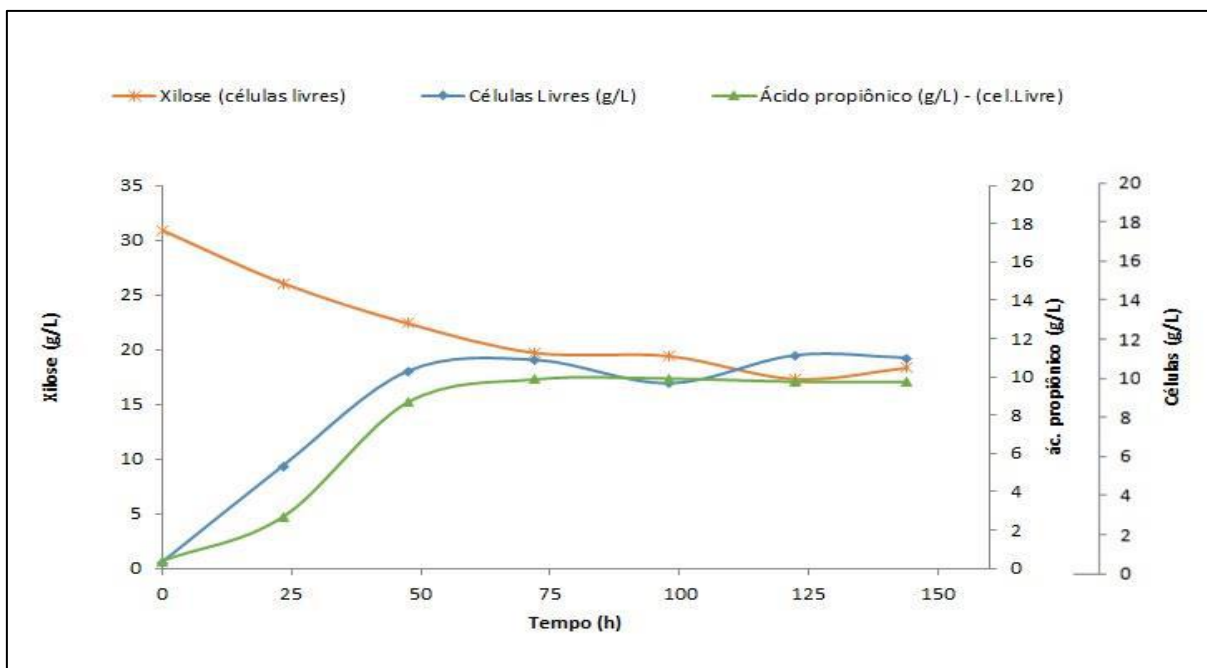


Figura 23 - Perfil cinético do processo de fermentação de Xilose à partir de células livres

Fonte: Autoria própria, 2021.

Vale ressaltar que em ambos os casos houve uma redução e estabilização no consumo de substrato a partir das 75 horas de fermentação, embora não tivesse ocorrido ainda o consumo total do substrato. No mesmo intervalo de tempo, houve também a estabilidade no crescimento celular.

A presença do próprio ácido propiônico tem efeito inibidor devido à alteração no pH. Segundo MELO (2007), a ação inibitória que o próprio ácido propiônico causa se dá principalmente pela perturbação da força motora do próton. Quando na forma não dissociada, o ácido propiônico pode atravessar a membrana plasmática e se dissociar no pH alcalino intracelular, criando um excesso de prótons na célula. Para conservar o gradiente através da membrana, ATPases passam a bombear os prótons para o exterior da célula, e como consequência, a célula passa a dispor de menos ATP para o metabolismo celular, inibindo o crescimento e a produção do ácido propiônico. Vale ressaltar que neste experimento não houve um controle de pH, visto que não seria viável fazê-lo em frascos e ao mesmo tempo garantir o sistema anaeróbico. Na figura 22, referente à glicose como substrato, observa-se que o valor máximo de ácido propiônico equivale a 9,88 g/L; já para a xilose na Figura 23 foi de 9,74 g/L. A produtividade foi de 0,07 g/L.h e 0,07g/L.h, respectivamente.

Considerando a glicose como substrato, o fator de rendimento para crescimento celular e o fator de rendimento de produção de ácido propiônico foram de

0,91 g/g e 0,77 g/g, respectivamente. Os valores de xilose foram de 0,85 g/g e 0,75 g/g, respectivamente.

Os resultados encontrados para a concentração de ácido propiônico são interessantes em comparação com a literatura. Nas mesmas condições, Coral *et al.* (2008) obtiveram concentrações de ácido propiônico de 6,77 g/L, 15,06 g/L e 8,23 g/L usando glicerol, lactato e melação, respectivamente, como fonte de carbono.

Com base nesses resultados, nota-se que a *Propionibacterium acidipropionici* pode assimilar xilose e glicose, utilizando-as para produzir ácido propiônico.

Avaliação do consumo de Xilose e Glicose em células imobilizadas

Neste experimento, buscou-se avaliar o consumo de glicose e xilose comerciais por *Propionibacterium acidipropionici* (CIP 53 164) a partir de células imobilizadas em alginato de cálcio, mantendo as condições nutricionais e operacionais.

Foram analisados o consumo de substrato, a produção de ácido propiônico e os parâmetros de crescimento celular, conforme Figura 24 e 25.

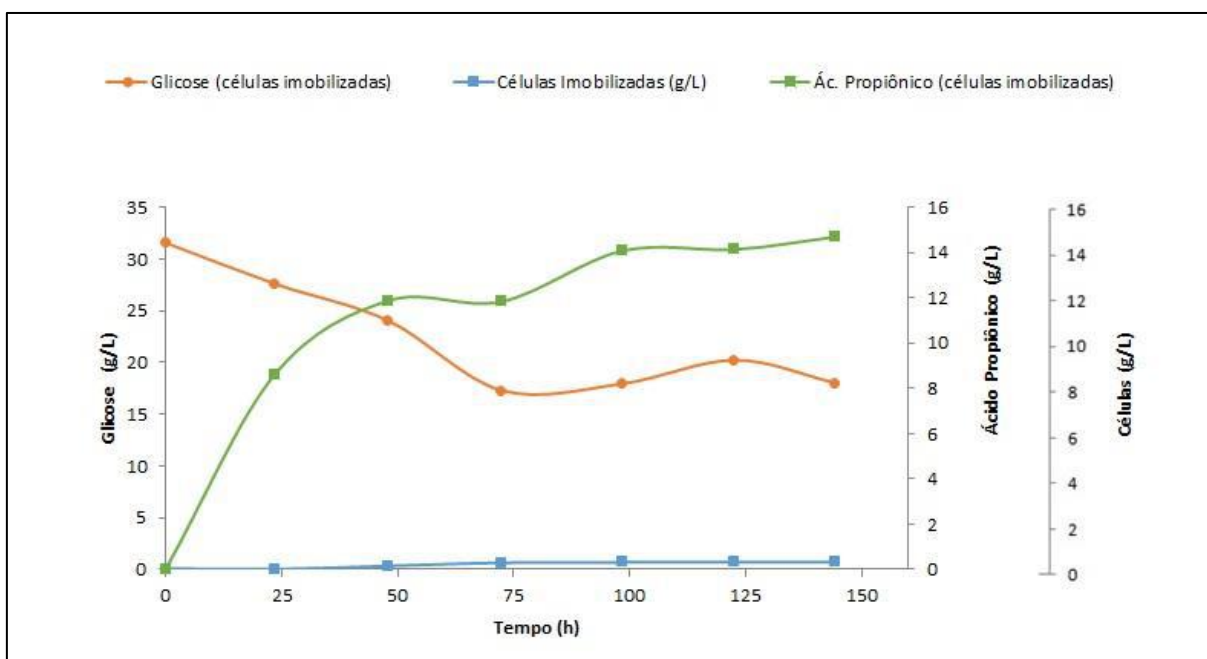


Figura 24 - Perfil cinético do processo de fermentação de Glicose à partir de células imobilizadas.

Fonte: Autoria própria, 2021.

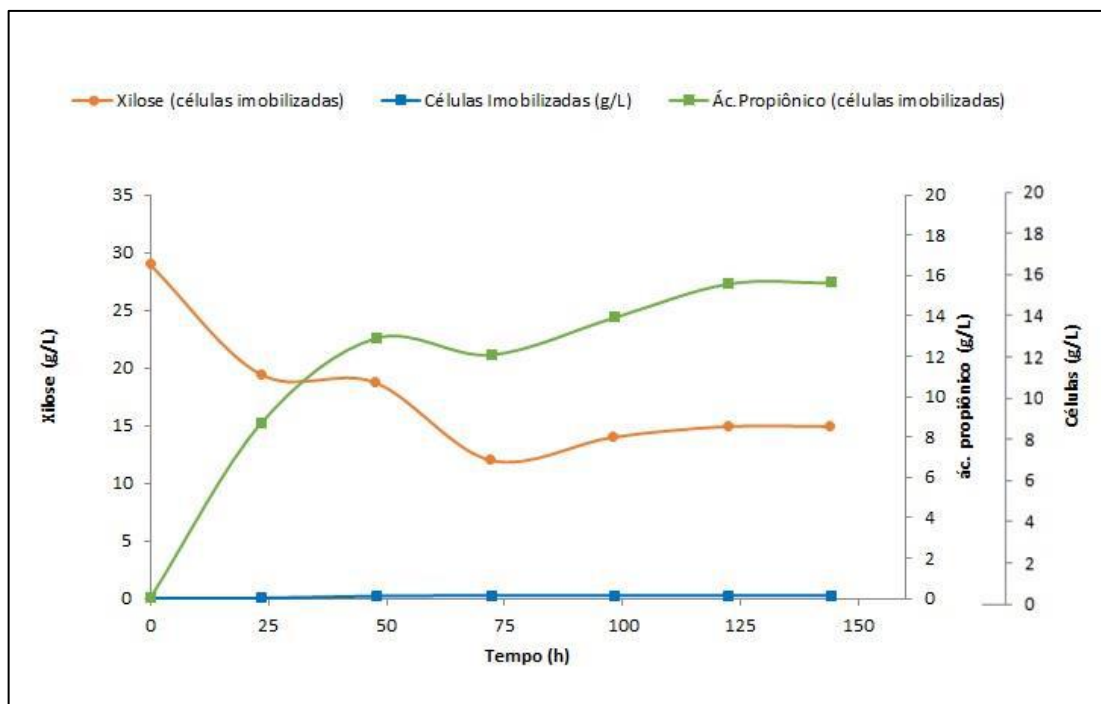


Figura 25 - Perfil cinético do processo de fermentação de Xilose à partir de células imobilizadas.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Os valores de concentração de células no meio permaneceram nulos, indicando que, como esperado, o crescimento celular ocorreu de fato o interior das esferas de alginato de cálcio sem, no entanto, impedir o consumo de substrato e a produção de ácido propiônico.

O valor máximo alcançado de ácido propiônico após as 145 horas de fermentação foi de 14,71 g/L e 15,65 g/L de glicose e xilose, respectivamente. Estes resultados são bastantes promissores, visto que representam um aumento de 48,9% e 60,7% na produção de ácido propiônico tendo como substrato a glicose e xilose, respectivamente.

Comparando com a literatura, Choojun et al.,2011 avaliaram a melhora na produção de ácido propiônico a partir de células da *Propionibacterium acidipropionici* imobilizadas em alginato de cálcio usando o soro do leite como substrato. Usando reatores de 2 litros com pH controlado a 6,5, alcançaram uma quantidade de ácido propiônico de 29,24 g/L e potencial consistente para reciclar 2 rodadas de fermentação, produzindo a quantidade total de $15,85 \pm 0,25$ g /L e $13,39 \pm 0,25$ g / L de ácido propiônico na fermentação da primeira e segunda batelada, respectivamente. O valor da primeira batelada foi de 15,85 g/L, bem análoga ao valor encontrado neste trabalho usando xilose como fonte de carbono: 15,65 g/L. Uma sugestão para

aumento do volume produzido de ácido propiônico seria o reuso das esferas com células imobilizadas para uma segunda batelada.

Com relação às variáveis resposta, as mesmas estão disponibilizadas na tabela 11 abaixo:

Tabela 11 - Comparativo dos parâmetros do processo convencional x células imobilizadas

	Células Livres		Células Imobilizadas	
	Glicose	Xilose	Glicose	Xilose
Conc. Final de	9,88	9,74	14,71	15,65
Ácido Propiônico (g/L)			(↑48,90%)	(↑60,70%)
Percentual de	39,72	40,59	42,95	48,52
Consumo de				
Substrato (%)				
Q_p (g/L.h)	0,07	0,07	0,10	0,11
$Y_{(x/s)}$ (g/g)	0,91	0,85	-	-
$Y_{(p/s)}$ (g/g)	0,77	0,75	1,08	1,11

Fonte: Autoria própria, 2021.

Os parâmetros dos cultivos com células imobilizadas foram bem mais promissores do que aqueles com célula livre, devido ao efeito inibitório e estresse causado pela mudança de pH a partir da produção de ácido propiônico e seus subprodutos.

Norton & D'Amore (1994) discutiu o aumento tolerância ao etanol de células de levedura imobilizadas e sugeriu que este fenômeno pode ser atribuído ao encapsulamento celular por uma camada protetora de material de gel ou à concentração de ácidos graxos modificados nas membranas celulares devido a limitações de pressão de oxigênio. Eles também relataram a remoção parcial da inibição do substrato pela célula imobilizada.

Avaliação da Relação Quantidade de Células x Volume do Gel Alginato de Cálcio

Um dos problemas do aprisionamento celular em uma matriz porosa, como gel de alginato, é a capacidade das células localizadas na superfície externa dos *beads* se multiplicarem e se desprenderem. Este fato leva a um sistema misto de células imobilizadas e livres (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Para evitar este tipo de sistema, realizou-se um ensaio para verificar a faixa de concentração de células mais adequada e que não permitisse a composição de um sistema misto (células livres e imobilizadas). A figura 26 a seguir mostra os resultados adquiridos:

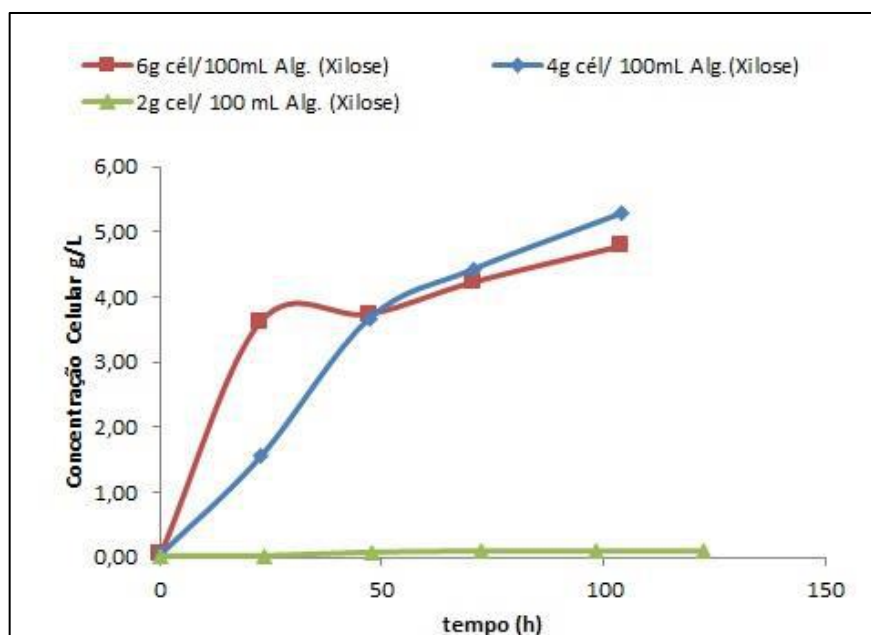


Figura 26 - Curva de crescimento celular em diferentes concentrações de células imobilizadas em alginato de cálcio.

Fonte: Autoria própria, 2021.

O resultado demonstra que em concentração igual ou superior à 4g/100 mL de alginato as células já apresentam um crescimento no meio de cultivo, tornando o sistema misto em células imobilizadas e células livres.

Avaliando sob um aspecto tecnológico, o ideal é que as células permaneçam no interior das esferas de alginato, facilitando posteriormente o procedimento de separação na etapa *downstream* ou ainda a reutilização dos *beads* em operações com biorreatores.

Sabe-se que em processos com células livres, é necessária a etapa de centrifugação para separação das células e meio de fermentação, o que gera um maior consumo de energia devido à centrifugação. No caso das células imobilizadas, a etapa de centrifugação pode ser substituída por uma simples filtração, reduzindo custo operacional (COVIZZI, 2007; NAJAFPOUR *et al.*, 2004).

5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bactéria *Propionibacterium acidipropionici* (CIP 53164) mostrou-se um agente no processo de produção de ácido propiônico, com resultados promissores. Foi possível evidenciar também a boa assimilação da xilose e glicose como fontes de carbono, tendo ambas, resultados e desempenhos semelhantes.

A melhor concentração celular experimentada para os *beads* de alginato de cálcio foi de 2g de células para cada 100 ml de volume de alginato de sódio.

O processo de imobilização celular apresentou muitas vantagens em relação ao uso de células livres, obtendo o melhor resultado com células imobilizadas utilizando xilose como fonte de carbono, alcançando uma produção de 15,65 g/L de ácido propiônico após 145 horas de fermentação. A produtividade alcançada foi de 0,11 g/L.h e o fator de rendimento de produção de ácido propiônico foi de 1,11 g/g.

Na bibliometria, notou-se a existência de poucos trabalhos relacionados à produção de ácido propiônico a partir de células imobilizadas em alginato de cálcio, o que aponta para a oportunidade de desenvolver de mais estudos para obter melhores condições.

Através da prospecção também foi possível verificar que nos últimos 10 anos poucos trabalhos foram publicados sobre o uso de células imobilizadas em biorreatores para produção de ácido propiônico, em especial células imobilizadas em alginato de cálcio. Portanto, é interessante investigar sobre melhores desempenhos de produção usando alginato de cálcio como matriz polimérica.

Sugestões Futuras

A concentração ótima de xilose nas esferas de alginato pode ser selecionada para alimentar um sistema em biorreatores de bateladas sucessivas, reutilizando as mesmas esferas em 3 bateladas. Esta forma de condução permitiria um novo *input* de substrato a cada nova batelada, permitindo uma produção final de ácido propiônico maior e em menor tempo (aumento da produtividade volumétrica).

De acordo com o perfil de curva em células imobilizadas deste trabalho, um bom intervalo de tempo para trocas de bateladas seria entre 75 e 100 horas.

Outra opção para explorar possibilidades de melhores rendimentos seria pelo uso de reator de leito fixo usando xilose como substrato, com as condições ótimas encontradas neste trabalho.

Verificar a produção de ácido propiônico a partir de alginato de alumínio. Por ser um íon trivalente, permite uma maior reticulação com o alginato. Estudos sobre a formação de biofilmes de alginato de alumínio apontam que este tem um maior grau de reticulação e compactação da rede polimérica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, D. A, **Anaerobic homolactate fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* results in depletion of ATP and impaired metabolic activity.** SGD. 2009. Disponível em: <https://www.yeastgenome.org/reference/S000130263>. Acesso em: 2 jun. 2021.

ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **LACTALIS pretende transformar o Brasil em exportador de produtos lácteos.** 2020. Abiq.com.br. Disponível em: <https://www.abiq.com.br/index.asp>. Acesso em: 2 jun. 2021.

AHMADI, N.; KHOSRAVI-DARANI, K; MORTAZAVIAN, A. M. *An overview of biotechnological production of propionic acid: from upstream to downstream processes.* **Electronic Journal of Biotechnology**, [S.L.], v. 28, p. 67-75, jul. 2017. Elsevier BV. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345817300222>. Acesso em 04 abr. 2021.

AMMAR, Ehab M.; MARTIN, Jessica; BRABO-CATALA, Luiza; PHILIPPIDIS, George P.. Propionic acid production by *Propionibacterium freudenreichii* using sweet sorghum bagasse hydrolysate. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 104, n. 22, p. 9619-9629, 13 out. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-020-10953-w>.

ANASTASIOU, R.; LEVERRIER, P.; KRESTAS, I.; ROUAULT, A.; KALANTZOPOULOS, G.; BOYAVAL P. *Changes in protein synthesis during thermal adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*.* **Int J Food Microbiol.** n. 108, p. 301–14, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.015>. Acesso em: 01 jun. 2021.

ANDERSON, T. M.; BODIE, A. E.; GOODMAN, N.; SCHWARTZ, R. D. *Inhibitory Effect of Autoclaving Whey-Based Medium on Propionic Acid Production by *Propionibacterium shermanii*.* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 427-428, 1986.

ATES, S.; DINGIL, N.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOGLU, U. *Enhancement of citric acid production by immobilized and freely suspended *Aspergillus niger* using silicone oil.* **Journal of Process Biochemistry.** n. 38, p. 433–43. 2002.

BALAMURUGAN, K.; VENKATA, D. V.; PANDA, T. *Propionic acid production by whole cells of *Propionibacterium freudenreichii*.* **Bioprocess Eng.** v. 20, p. 109-116, 1999.

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

BELGRANO, F. S.. **Modelo de Imobilização celular para produção de ácido propiônico: Tecnologia de impressão em 3D e o papel dos exopolissacarídeos na interação célula-matriz.** Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio de

Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

BLANC, P.; GOMA, G. *Propionic acid and biomass production using continuous ultrafiltration fermentation of whey*. **Biotechnol. Lett.** n. 11, p. 189–194, 1989.

BORDER, P.; KIERSTAN, M.; PLASTOW, G. *Production of propionic acid by mixed bacterial fermentation*. **Biotechnol Lett**, n. 9, p. 843–848, 1987.

BORGES, E. R.; PEREIRA JÚNIOR, N. *Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes**. **J Ind Microbiol Biotechnol.** n. 38, v. 8, p. 1001-11, 2011.

BOYAVAL, P.; CORRE, C.; *Production of propionic acid. Le Lait*, [s. l.], EDP Sciences. v. 75, n. 4-5, p. 453-461, 1995.

BRASIL. COMEX STAT - **Estatísticas de comércio exterior do Brasil**. Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços. Brasília, D.F. [site de internet], 2021. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>. Acesso em: 4 jun. 2021.

CARRONDO, M. J. T.; CRESPO, J. P. S. G.; MOURA, M. J. *Production of propionic acid using a xylose utilizing *Propionibacterium**. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 1-3, p. 295-312, abr. 1988. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02779164#citeas>. Acesso em: 230 mai. 2021.

CASTRO, P. G. M. **Desenvolvimento de Processo Fermentativo para a Produção de Ácido Propiônico a Partir da Fração Hemicelulósica de Bagaço de Sorgo Sacarino [*Sorghum bicolor (L.) Moench*]**. 2014. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Centers for Disease Control and Prevention**. 2021. Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0529.html> .Acesso em: 1 jun. 2021.

CHOI, C. H.; MATHEWS, A. P. *Fermentation metabolism and kinetics in the production of organic acids by *Propionibacterium acidipropionici**. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 271-285, 1994. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02779662#citeas>. Acesso em: 20 mai. 2021.

CHOOJUN, S.; YOONPRAYONG, P. *Production of Propionic Acid for Antifungal Activity by Calcium alginate Immobilization of *Propionibacterium acidipropionici* TISTR 442 Using Whey as Substrate*. CMU. **J. Nat. Sci.** v. 10, n. 2, 2011. Disponível em: https://cmuj.cmu.ac.th/uploads/journal_list_index/263696141.pdf. Acesso em: 05 de jun. 2021.

CORAL, J. ***Propionic acid production by *Propionibacterium sp.* Using low-cost carbon sources in submerged fermentation***. 2008. Dissertação (Mestrado) - Curso

de Biotechnologist and Bioprocesses Engineer, Biotechnology and Bioprocesses Engineering Division, Universidade Federal do Parana, Curitiba, 2008. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.825.4131&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 15 abr. 2021.

CORONADO C, BOTELLO JE, HERRERA F. *Study and mathematical modeling of the production of propionic acid by Propionibacterium acidipropionici immobilized in a stirred tank fermentor*. **Biotechnol Prog**. n. 17, p. 669–75. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/bp010059p>. Acesso em: 01 jun. 2021.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, R. **Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas**. Semana: Ciências Exatas e Tecnológicas, n. 2, p. 143 – 160. Londrina, jul./dez., 2007.

EATON, D.C.; GABELMAN, A. *Fed-batch and continuous fermentation of Selenomonas ruminantium for natural propionic, acetic and succinic acids*. **J Ind Microbiol**. n. 15, p. 32–8. 1995. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/bf01570010>. Acesso em: 01 jun. 2021.

FUNDUEANU, G.; NASTRUZZI, C.; CARPOV, A.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. **Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods**. *Biomaterials*, v.20, n.15, p.1427- 1435, 1999.

GIESE, E. C. **Potencial Biotecnológico do Uso de Micro-organismos Imobilizados em Gel de Alginato de Cálcio**. 81. ed. Rio de Janeiro: Cetem/McTi, 2015. Disponível em: <http://mineralis.cetem.gov.br/bitstream/cetem/1833/1/STA-81.pdf>. Acesso em: 30 mai. 2021.

GOSWAMI, V.; SRIVASTAVA, A. K. *Fed-batch propionic acid production by Propionibacterium acidipropionici*. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 121-128, jan. 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X9900042X>. Acesso em 12 mai. 2021.

GOSWAMI, V.; SRIVASTAVA, A.K. *Propionic acid production in an in-situ cell retention bioreactor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 56, p. 676-680, 2001.

GOULARTE, S.; ÍTAVO, L. C. S.; OLIVEIRA, LINCOLN F.; **Volatile fatty acids in rumen of cows fed different concentrate level diets**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 63. 1479-1486. 2011.

GU, Z.; GLATZ, B. A.; GLATZ, C. E. *Effects of propionic acid on Propionibacterium fermentation*. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 13-18. 1998. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014102299700094X>. Acesso em 15 mai. 2021.

GUO, X-L.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M-X. *Immobilization of Rhodococcus sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantio selective biotransformation of trans-*

2- methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2006.

HETTINGA, D. H.; REINBOLD, G. W. *THE Propionic-Acid Bacteria-A Review*. **Journal of Milk and Food Technology**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 295-301, 1972. Disponível em: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/35/5/295/425312/THE-PROPIONIC-ACID-BACTERIA-A-REVIEWI-Growth1-2>. Acesso em: 16 abr. 2021.

HIMMI, EH., BORIES, A., BOUSSAID, A., HASSANI, L. *Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by Propionibacterium acidipropionici and Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** n. 53, p. 435-440. 2000.

HSU, S. T.; YANG, S. T. *Propionic Acid Fermentation of Lactose by Propionibacterium acidipropionici Effects of pH*, **Biotechnol. Bioeng.** n. 38, p. 571-578, 1991.

HUANG, C. B.; ALIMOVA, Y.; MYERS, T.M.; EBERSOLE, J. L. *Short and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms*. **Arch Oral Biol.** n. 56, v. 7, p. 650-4, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.011>. Acesso em: 01 jun. 2021.

JAIN, D.K.; TYAGI, R.D.; KLUEPFEL, D.; AGBEBAVI, T. J. *Production of propionic acid from whey ultrafiltrate by immobilized cells of Propionibacterium shermanii in batch process*. **Process Biochem.** n. 26, p. 217-23, 1991. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592\(91\)85003-7](http://dx.doi.org/10.1016/0032-9592(91)85003-7). Acesso em: 01 jun. 2021.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M. **Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review**. ResearchGate. 2004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222007899_Immobilization_technologies_and_support_materials_suitable_in_alcohol_beverages_production_A_review. Acesso em: 2 jun. 2021. Acesso em: 01 de jun. 2021.

KUMAR S.; BABU, B. V. *A brief review on propionic acid: A renewal energy source*. **Proceedings of National Conference on Environmental Conservation**. 459-464, 2006.

LEWIS, V. P.; YANG, S. T. *Continuous propionic acid fermentation by immobilized Propionibacterium acidipropionici in a novel packed-bed bioreactor*. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 465-474, 1992. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bit.260400404>. Acesso em: 10 abr. 2021.

LIU, Y., ZHANG, Y. G.; ZHANG, R. B.; ZHANG, F.; ZHU, J. *Glycerol/glucose cofermentation: one more proficient process to produce propionic acid by Propionibacterium acidipropionici*. **Curr Microbiol.** n. 62. v. 1, p. 152-8. 2011.

LIU, L., ZHU, Y., LI, J., WANG, M., LEE, P., DU, G., CHEN, J. *Microbial production of propionic acid from Propionibacterium: Current state, challenges and perspectives*. **Crit Rev Biotechnol.** 2012.

LOPES, Helberth Júnior Santos; RAMOS, Lucas Rodrigues; SILVA, Edson Luiz. Co-Fermentation of Cheese Whey and Crude Glycerol in EGSB Reactor as a Strategy to Enhance Continuous Hydrogen and Propionic Acid Production. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [S.L.], v. 183, n. 3, p. 712-728, 20 mar. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-017-2459-7>.

LUNA-FLORES, C. H.; NIELSEN, L. K.; MARCELLIN, E. *Genome sequence of Propionibacterium acidipropionici ATCC 55737*. **Genome Announc.** n. 4, v. 3, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00248-16>. Acesso em: 31 mai. 2021.

MARTINEZ CAMPOS, M. **Production of propionate by fed-batch fermentation of Propionibacterium acidipropionici using mixed feed**. 2002. ResearchGate. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/225671024_Production_of_propionate_by_fedbatch_fermentation_of_Propionibacterium_acidipropionici_using_mixed_feed_of_lactate_and_glucose. Acesso em: 2 jun. 2021.

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

MORALES, J.; CHOI, J.S.; KIM, D.S. *Production rate of propionic acid in fermentation of cheese whey with enzyme inhibitors*. **Environ Prog.** n. 25, p. 228–234, 2006.

NAJAFPOUR, G., YOUNESI, H., SYAHIDAH KU ISMAIL, K. *Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using Saccharomyces cerevisiae*, **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 251–260, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852403002414?via%3Dihub>. Acesso em: 2 jun. 2021.

NGOME, M. T.; ALVES, J. G. L. F.; PICCOLI, R. H.; DOMINGO, E. C.; PINTO, S. A.; BERNAL, O. L. M. *Inoculum concentration and inoculation time for propionic acid production from whey using mixed culture of Lactobacillus helveticus and Propionibacterium freudenreichii PS-1*. **Acta Scientiarum. Technology**. Maringá, v. 39, suppl., p. 543-550, 2017. Disponível em: http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/31824/1/ARTIGO_Inoculum%20concentrati%20on%20and%20inoculation%20time%20for%20propionic....pdf. Acesso em: 2 jun. 2021.

NORTON, S., D'AMORE, T. *Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing*, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 5, p. 365–375, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0141022994901503>. Acesso em: 2 jun. 2021.

OIL-PRICE. **Crude Oil Price, Oil, Energy, Petroleum, Oil Price, WTI & Brent Oil, Oil Price Charts and Oil Price Forecast**. Oil-price.net. [site de internet], 2021. Disponível em: <http://www.oil-price.net/?gclid=COyTh4rE1asCFcd56wodZysiNA>. Acesso em: 2 jun. 2021.

OZADALI, F.; GLATZ, B.A.; GLATZ, C.E. *Fed-batch fermentation with and without on-line extraction for propionic and acetic acid production by Propionibacterium acidipropionic*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 44, p. 710-716, 1996.

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

PLAYNE, M. J. *Propionic and butyric acids*. In: Moo-Young M, editor. **Comprehensive biotechnology**, v. 3. New York: Pergamon Press. p 731-759. 1985.

PRADELLA, J. G. C.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Reatores com células imobilizadas*. In: **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 4 v. v. 2, cap. 16, p. 355-372. 2001.

QUESADA-CHANTO, A.; SCHMID-MEYER, A. C.; SCHROEDER, A. G. *Effect of oxygen supply on biomass, organic acids and vitamin B12 production by Propionibacterium shermanii*. 1998. ResearchGate. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/251215144_Effect_of_oxygen_supply_on_biomass_organic_acids_and_vitamin_B12_production_by_Propionibacterium_shermanii. Acesso em: 2 jun. 2021.

RICKERT, D. A.; GLATZ, C. E.; GLATZ, B. A. *Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized Propionibacterium*. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 22, v. 5, p. 409-414, 1998.

RIVERO, S., GIANNUZZI, L.; GARCÍA, M.A.; PINOTTI, A. *Controlled delivery of propionic acid from chitosan films for pastry dough conservation*. **J Food Eng.** n. 116, v. 2, p. 524-31, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.025>. Acesso em: 01 jun. 2021.

SALMINEN, S. *Demonstration of safety of probiotics — a review*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 1-2, p. 93–106, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9849787/>. Acesso em: 2 jun. 2021.

SESHADRI, K. **Book Reviews. International Studies**, v. 30, n. 3, p. 359–363, 1993. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0020881793030003012>. Acesso em: 2 jun. 2021.

SILVA, A. L. P. **Estudos em biocatálise com células íntegras de Geotrichum candidum e lipase de Burkholderia cepacia imobilizadas em sílicas funcionalizadas**. João Pessoa, PA. 2019.

SOLICHIEEN, M. S.; O'BRIEN, D.; HAMMOND, E. G.; CLATZ, C.E. *Membrane Based Extractive Fermentation to Produce Propionic and Acetic Acids: Toxicity and Mass Transfer Considerations*, **Enz. Microbiol. Technol.** n. 17, p. 23-31, 1995.

SOUSA, G. S. **Estudo da fermentação alcoólica em um biorreator de leito fixo em sistema contínuo com células de Saccharomyces cerevisiae imobilizadas em**

alginato cálcio revestido com quitosana. Universidade Estadual De Campinas, Campinas, S.P. 2016.

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.

TELES, J. C. **Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium Acidipropionici* a partir da Fermentação de Efluentes Agroindustriais.** (Dissertação) Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2016.

TINZL - MALANG, S.; RAST, P.; GRATTEPANCHE, F. *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***. . n. 214, p. 91-101. 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.025. Disponível em: Acesso em: 2 jun. 2021.

VALSECHI, O. A. ***Microbiologia dos alimentos.*** São Paulo: UFSCAR. 2006.

WANG, Z.; SUN, J.; ZHANG, A.; YANG, S. T. *Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*.* ***Bioresource Technology***. v. 137, p. 116–123, 2013. Disponível em: <https://sci-hub.se/http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.012>. Acesso em: 01 jun. 2021.

WERPY, T.; PETERSEN, G.; ADEN, A.; BOZELL, J.; HOLLADAY, J.; WHITE, J. *Top value-added chemicals from biomass. Volume 1: Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas.* ***Pacific Northwest National Laboratory***, Richland, WA, USA; 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2172/926125>. Acesso em: 01 jun. 2021.

WOSKOW, S. A.; GLATZ B. A. *Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation.* ***Appl. Environ. Microbiol.*** n. 57, p. 2821–2828. 1991.

YANG, S. T.; HUANG, Y.; HONG, G. ***A novel recycles batch immobilized cell bioreactor for propionate production from whey lactose.*** *Biotechnol Bioeng*, v. 45, p. 379–86. 1995.

YANG, Hopen; WANG, Zhongqiang; LIN, Meng; YANG, Shang-Tian. *Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: fermentation kinetics and economic analysis.* ***Bioresource Technology***, [S.L.], v. 250, p. 1-9, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.016>.

ZHANG, A.; YANG, S. T. ***Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*.*** ***Process Biochemistry***, [S.L.], v. 44, n. 12, p. 1346-1351, dez. 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511309002360>. Acesso em: 20 mai. 2021.

ZHANG, A.; YANG, S. T. *Engineering Propionibacterium acidipropionici for enhanced propionic acid tolerance and fermentation. Biotechnol Bioeng.* n. 104, v. 4, p. 766-73, 2009. **In:** CASTRO, P. G. M. **Desenvolvimento de Processo Fermentativo para a Produção de Ácido Propiônico a Partir da Fração Hemicelulósica de Bagaço de Sorgo Sacarino [*Sorghum bicolor (L.) Moench*].** 2014. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

ZHUGE, X.; LIU, L.; SHIN, H.; JIANGHUA, L.; GUOCHENG, D.; JIAN, C. *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. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852413017896>. Acesso em: 06 jun. 2021.

ZHU, Y.; TAN, L. I., J.; LIU, L.; JIANG, L.; SUN, J.; LEE, P.; DU, G.; CHEN, J. *Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant Propionibacterium acidipropionici with glycerol as the carbon source. Bioresource Technology,* n. 101, 2010.