



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Júlia Zonta Visoli

Produção de ácido propiônico em batelada alimentada por *Propionibacterium acidipropionici* a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Florianópolis
2023

Júlia Zonta Visoli

Produção de ácido propiônico em batelada alimentada por *Propionibacterium acidipropionici* a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) Jaciane Lutz Ienczak

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Visoli, Júlia Zonta

Produção de ácido propiônico em batelada alimentada por
Propionibacterium acidipropionici a partir de hidrolisado
de bagaço de cana-de-açúcar / Júlia Zonta Visoli ;
orientadora, Jaciane Lutz Ienczak, 2023.

63 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico,
Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Ácido Propiônico. 3.
Propionibacterium acidipropionici. 4. Bagaço de cana-de
açúcar. 5. Batelada alimentada. I. Ienczak, Jaciane Lutz .
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Júlia Zonta Visoli

Título: Produção de ácido propiônico a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 8 de dezembro de 2023.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof.(a) Dr.(a) Jaciane Lutz Ienczak

Orientador(a)

Prof.(a) Dr.(a) Patricia Poletto

UFSC

Dr.(a) Débora Trichez

UFSC

Florianópolis, 2023.

Este trabalho é dedicado aos meus pais,
Marcos e Rosmarie, meus avós, Maria,
Ilsi, Arromildo e Nilso, e ao Departamento
de Eng. Química e Eng. de Alimentos.

AGRADECIMENTOS

É impossível pensar onde cheguei sem pensar nas pessoas que me trouxeram até aqui.

Começo agradecendo meu pai, que sempre incentivou a minha curiosidade, me deu suporte e esteve presente em todas as etapas da minha graduação. Antes de saber que graduação escolheria, ele já sabia, pois além de pai é meu melhor amigo e me conhece muito mais do que eu mesma. Obrigada por sempre priorizar minha educação e me dar as melhores oportunidades possíveis, e obrigada pela preocupação e zelo que tem comigo. Tenho muito orgulho e admiração da pessoa e do profissional que é. E mais importante, obrigada por ter me dado de presente um Microscópio quando era criança, não virei entomologista mas com certeza me foi útil nessa trajetória.

A minha mãe agradeço pelo exemplo de mulher que é, e que me inspira a ser. Obrigada por me ensinar a rir nos dias tristes e que desistir do que ama nunca é opção. Sua garra e motivação são inspiradoras, assim como sua paixão pela vida. Obrigada por ser essa mulher independente que sempre batalhou por tudo que teve. Obrigada por ter sido tão forte por mim, e espero que um dia eu seja tão forte como você.

Além dos meus pais, quero agradecer imensamente aos meus avós que não estão mais aqui em vida, mas que com certeza seguraram minha mão durante todo esse percurso. Dona Ilsi, Dona Maria e Seu Zonta, obrigada pelos sacrifícios que fizeram ao colocar a família sempre em primeiro lugar, essa conquista é tanto minha como de vocês. Nunca vou esquecer da felicidade em que ficaram quando souberam que a neta passou na Federal! Obrigada por sempre cuidarem de mim ai de cima.

Ao Lucca agradeço por sempre me lembrar de que eu era capaz mesmo quando duvidava. Obrigada por acompanhar essa fase comigo e aguentar todo estresse envolvido, sem você não teria conseguido.

Agradeço a todos do Scinfer, que me ajudaram com conselhos e experimentos, além da companhia nas noites dormidas no laboratório. Em especial ao Luiz, Marian, Marcel, Isadora P e Isadora C.

Agradeço também a minha orientadora Profa. Dra. Jaciane, pela oportunidade de executar este trabalho, por compartilhar seu conhecimento e por toda a orientação.

Por fim, nada disso seria possível sem você Débora, que viveu todo esse experimento comigo, sofremos e comemoramos juntas durante todos os passos desse processo, e ele não teria acontecido sem você. Obrigada!

“Non, rien de rien
Non, je ne regrette rien
Ni le bien qu'on m'a fait
Ni le mal
Tout ça m'est bien égal”
Édith Piaf

RESUMO

O ácido propiônico é um ácido de alto interesse comercial, usado nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos. Atualmente, a produção primária de ácido propiônico é feita via rotas petroquímicas, o que pode causar danos ao meio ambiente, mas poderia ser feita por processos fermentativos por meio de diversos gêneros de bactérias. Além disso, com o crescimento da demanda por produtos ecológicos é fundamental desenvolver fontes alternativas que não dependam do petróleo. Considerando as bactérias produtoras de ácido propiônico o gênero *Propionibacterium* ssp. se destaca, pois além de conseguir utilizar diversas fontes de carbono, como glicose, xilose, glicerol e lactato, permite o reprocessamento de resíduos. O bagaço da cana-de-açúcar é o maior resíduo da agroindústria brasileira, e com 40% de celulose em sua composição se torna uma excelente opção para produção de ácido por meios fermentativos. Dentre os diferentes processos fermentativos, pode-se destacar a batelada alimentada, um processo em que um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos gerados permanecem até o final da fermentação. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de ácido propiônico em batelada alimentada por *Propionibacterium acidipropionici* utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono. Uma cinética de crescimento microbiano foi realizada a fim de avaliar a velocidade específica de crescimento da bactéria, tendo como resultado $0,086 \text{ h}^{-1}$. Além disso, pré-tratamento com glicerol seguido de hidrólise enzimática foram realizados para converter os polissacarídeos de celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis, tendo um rendimento de 47% na hidrólise enzimática. Por fim, foi realizada a produção microbiana em batelada alimentada de ácido propiônico utilizando a cepa *P. acidipropionici* em biorreator à $32 \text{ }^\circ\text{C}/76 \text{ h}$ e pH $6,8 \pm 0,2$ mantido com NaOH 4M, com dois pulsos de alimentação. Foram obtidos uma conversão de substrato em produto igual à $0,34 \text{ gP/gS}$, uma produtividade volumétrica global de $0,07 \text{ gP L}^{-1}\text{h}^{-1}$ um fator de conversão de célula em produto igual à $0,21 \text{ gX/gS}$, uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,098 \text{ h}^{-1}$, antes do pulso 1, e $0,07 \text{ h}^{-1}$ entres os pulsos 1 e 2, $0,019 \text{ h}^{-1}$ depois do pulso 2 e um rendimento de 61,8%. Logo, foi possível observar que o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com glicerol e hidrólise enzimática pode ser utilizado como substrato para a produção de ácido propiônico em modo batelada alimentada e que estudos futuros são necessários para aprimorar o processo de produção deste ácido.

Palavras-chave: Ácido propiônico; bagaço de cana-de-açúcar; *P. acidipropionici*; batelada alimentada.

ABSTRACT

Propionic acid is an acid of high commercial interest, used in the chemical, pharmaceutical and food industries. Currently, the primary production of propionic acid is done via petrochemical routes, which can cause damage to the environment, but it could be done through fermentative processes using different genera of bacteria. nutrients are added to the fermenter during cultivation and the products generated remain until the end of fermentation. Therefore, the objective of this work was to evaluate the production of propionic acid in a fed-batch by *Propionibacterium acidipropionici* using sugarcane bagasse hydrolyzate as a carbon source. A microbial growth kinetics was carried out in order to evaluate the specific growth rate of the bacteria, resulting in $0,086 \text{ h}^{-1}$. Furthermore, pretreatment with glycerol followed by enzymatic hydrolysis were carried out to convert cellulose and hemicellulose polysaccharides into fermentable sugars, with a yield of 47% in enzymatic hydrolysis. Finally, microbial production was carried out in a propionic acid fed-batch using the strain *P. acidipropionici* in bioreactor at $32 \text{ }^{\circ}\text{C}/76 \text{ h}$ and $\text{pH } 6.8 \pm 0.2$ maintained with 4M NaOH, with two feeding pulses. The results obtained are, substrate to product conversion equal to 0.34 gP/gS , a global volumetric productivity of $0.07 \text{ gP L}^{-1}\text{h}^{-1}$, a cell to product conversion factor equal to 0.21 gX/gS , a specific growth rate of 0.098 h^{-1} , before pulse 1, and 0.07 h^{-1} between pulses 1 and 2, 0.019 h^{-1} after pulse 2 and a yield of 61.8%. Hence, it was possible to observe that sugarcane bagasse hydrolyzate subjected to pre-treatment with glycerol and enzymatic hydrolysis can be used as a substrate for the production of propionic acid in fed-batch mode and that future studies are necessary to improve the process of producing this acid.

Keywords: Propionic acid; sugarcane bagasse; *P. acidipropionici*; fed-batch.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido propiônico.....	18
Figura 2 - A via do ácido dicarboxílico de <i>P. acidipropionici</i>	21
Figura 3 - Microscopia <i>P. acidipropionici</i>	22
Figura 4 - Biorreator em batelada e variação de S, X e P com o tempo em um processo fermentativo descontínuo	26
Figura 5 - Biorreator em batelada alimentada e variação de S, X e P com o tempo em um processo fermentativo descontínuo alimentado	28
Figura 6 - Biorreator em processo contínuo.....	31
Figura 7 - Pré-Inóculo e Inóculo	38
Figura 8 - Esquema de pré-inóculo e inóculo de <i>P. acidipropionici</i>	39
Figura 9 - Análises da Fermentação	44
Figura 10 – Perfis de Ln (Abs/Abs0) do cultivo de inóculo de <i>P. acidipropionici</i> em serum bottles, a 37 °C por 24h.	47
Figura 11 - Cinética da produção de AP por <i>P. acidipropionici</i> em biorreator utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, cultivada a 32 °C por 76 h, em pH 6,8 ± 0,2 mantido com NaOH 4M. AP (■), AA (■), AS (■), AL (■), glicose (■), xilose (■), arabinose (■).	50
Figura 12 - Cinética da produção de AP por <i>P. acidipropionici</i> em biorreator utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, cultivada a 32 °C por 76 h, em pH 6,8 ± 0,2 mantido com NaOH 4M em g/L. AP (■), AA (■), AS (■), AL (■), glicose (■), xilose (■), arabinose (■).	50
Figura 13 - Perfis de Ln (X/X0) de <i>P. acidipropionici</i> em biorreator, a 32 °C por 76 h, em pH 6,8 ± 0,2 mantido com NaOH 4M. Ajuste linear (--).	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido propiônico	18
Tabela 2 - Estudos desenvolvidos para produção de ácido propiônico por <i>P. acidipropionici</i> via fermentação.....	24
Tabela 3 - Tipos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas	35
Tabela 4 - Fórmulas utilizadas para análise dos resultados	46
Tabela 5 - Velocidade específica de crescimento <i>P. acidipropionici</i> em estudos	48
Tabela 6 - Resultados da Hidrólise Enzimática	48
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos da fermentação de AP por <i>P. acidipropionici</i> em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, a 32°C por 76 h de processo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Ácido Propiônico
AA	Ácido Acético
AS	Ácido Succínico
AL	Ácido Láctico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivo específico	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	ÁCIDO PROPIÔNICO	18
2.1.1	Rotas biológicas para a produção de ácido propiônico	19
2.1.1.1	<i>Via do ácido dicarboxílico na formação de Ácido Propiônico</i>	20
2.2	PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI	21
2.2.1	Modos de operação de biorreatores para processos fermentativos ...	25
2.2.1.1	<i>Batelada</i>	25
2.2.1.2	<i>Batelada alimentada</i>	27
2.2.1.3	<i>Processo Contínuo</i>	29
2.3	SUBSTRATO DE BAIXO CUSTO	32
2.3.1	Bagaço de cana-de-açúcar	32
2.3.2	Transformação do bagaço de cana-de-açúcar em substrato para processos de fermentação	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	MICROORGANISMO E REATIVAÇÃO	37
3.2	PRÉ INÓCULO E INÓCULO	37
3.3	AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE P. ACIDIPROPIONICI NO INÓCULO EM GLICOSE.....	38
3.4	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	39
3.5	MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DA FERMENTAÇÃO.....	40
3.6	ANÁLISES DA FERMENTAÇÃO	44
3.6.1	Determinação das concentrações de glicose, ácido propiônico (AP), ácido acético (AA), ácido succínico (AS), ácido lático (AL)	44
3.6.2	Determinação da massa seca	45
3.6.3	Determinação da absorvância	45
3.6.4	Determinação do açúcar pelo método enzimo-colorimétrico	45
3.7	TRATAMENTO DOS DADOS DE FERMENTAÇÃO.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

4.1	CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO DE P. ACIDIPROPIONICI NO INÓCULO EM GLICOSE.....	47
4.2	RESULTADOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	48
4.3	RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA EM BATELADA ALIMENTADA.....	49
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

O ácido propiônico (AP) é um ácido carboxílico que possui ampla aplicação industrial, podendo ser usado em produtos farmacêuticos, herbicidas, cosméticos, conservantes alimentícios e intermediário químico em polímeros (AMMAR et al., 2014). Por ser tão versátil a demanda do mercado global de AP foi de 470 mil toneladas em 2019 e pode chegar a 550 mil toneladas em 2026 (ATASOY et al., 2021), além de ser classificado como um dos 30 produtos químicos mais promissores a serem produzidos a partir de fontes renováveis pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (LIU et al., 2015).

Atualmente sua produção comercial é feita principalmente por rotas petroquímicas (YANG et al., 2018), podendo causar danos ao meio ambiente, mas poderia ser produzida por processos fermentativos por meio de grupos de bactérias pertencentes aos gêneros *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, etc (ALI et al., 2021; RANAEL et al., 2020; SILVA, 2019). A demanda pela produção microbiana de AP vem aumentando com o crescimento da demanda por produtos ecológicos e sem aditivos artificiais (PIWOWAREK et al., 2018).

No entanto, a produção comercial microbiana ainda é um desafio, devido a produção petroquímica de AP ser mais econômica. Em teoria, o preço comercial do AP produzido pelo processo microbiano pode ser até o dobro daquele produzido pelo processo petroquímico (PIWOWAREK et al., 2018).

Por usar a via metabólica mais eficiente em termos energéticos, o ciclo Wood-Werkman (GONZALEZ et al., 2017), o gênero *Propionibacterium* sp. é considerado promissor para a produção de AP. Além disso, consegue utilizar diversas fontes de carbono, como: glicose, xilose, glicerol e lactato, o que permite o reprocessamento de resíduos (PIWOWAREK et al., 2018).

Porém, esse gênero de bactérias possui baixa produtividade, rendimento e título final de AP (KESHAV et al., 2008), devido a fatores como baixa taxa de crescimento específico, inibição da produção de produtos e subprodutos (ácidos acético e succínico) (GONZALEZ et al., 2017), o que resulta em um aumento de preço do processamento downstream para obter AP com maior pureza (GONZALEZ et al., 2017).

Para fazer ácido propiônico via produção microbiana economicamente atraente, o desenvolvimento de estratégias de fermentação visando alto título e produtividade, além do uso de fontes alternativas de substrato são necessários.

O bagaço da cana-de-açúcar é o maior resíduo da agroindústria brasileira, já que de acordo com o IPEA (Instituto de Pesquisas Econômicas Aplicadas) o Brasil é o maior produtor e exportador da cana de açúcar no mundo . Estima-se que, a cada ano, sobrem de 5 a 12 milhões de toneladas deste material, que corresponde a aproximadamente 30% da cana moída (SILVA et al, 2007). Com isso, e com uma concentração de 40% de celulose (BURGI, 1985), que pode ser hidrolisada e convertida em glicose, o bagaço de cana-de-açúcar se torna uma excelente opção para produção de ácido por meios fermentativos.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar uma estratégia de fermentação em batelada alimentada do ácido propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* usando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a produção de AP usando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como substrato em uma estratégia de fermentação em batelada alimentada.

1.1.2 Objetivo específico

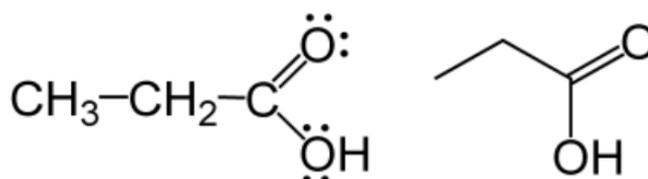
- Estudar a cinética de crescimento da *Propionibacterium acidipropionici*;
- Hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar;
- Testar a produção de AP em fermentação de batelada alimentada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDO PROPIÔNICO

O ácido propiônico, também conhecido como ácido propanóico, é um ácido graxo saturado de cadeia curta com um etano ligado ao carbono de um grupo carboxila (AYAN et al., 2020). Em seu estado puro é um líquido incolor, corrosivo, miscível em água e de odor pungente (PLAYNE, 1985).

Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido propiônico



AP é um líquido solúvel em água, em qualquer proporção, pois suas moléculas podem ser atraídas por pontes de hidrogênio. Além disso, o AP (Figura 1) reage com álcoois formando ésteres, e com álcalis formando sais orgânicos (PLAYNE, 1985). A forma não dissociada do ácido pode atravessar a membrana celular para o citoplasma e liberar prótons, gerando um gradiente de pH intracelular que afeta a transferência de nutrientes e inibe o crescimento de microrganismos (FARHADI et al., 2013). A Tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas deste ácido.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do ácido propiônico

Chemical and Physical Properties	
IUPAC name	Propanoic acid
Other names	Propionic acid and ethanecarboxylic acid
Molecular formula	C ₃ H ₆ O ₂
Molar mass	74.08 g/mol
Appearance	Colourless liquid
CAS number	79-09-4
pKa	4,8
Melting point	-21 °C
Boiling point	141 °C
Density	0,992 g/cm ³
Solubility in water	Miscible
Viscosity	10 mPa.s

Fonte: <http://www.cdc.gov>.

A produção de AP para fins industriais é realizada pela rota petroquímica por meio dos processos Reppe e Larson. O processo Reppe converte etileno, monóxido de carbono e vapor em propionato. O processo Larson converte etanol e monóxido de carbono em propionato usando trifluoreto de boro como catalisador (GONZALEZ-GARCIA et al., 2017).

Na indústria alimentícia sua principal aplicação é na forma de sal como conservante (PIWOWAREK et al., 2018), tendo como exemplo sua adição em pães pré-embalados e produtos de panificação para inibir o desenvolvimento de bolores (SILVA et al., 2016). Em outras indústrias, o ácido e seus derivados apresentam diversas aplicações, atuando como intermediário químico na produção de plásticos, plastificantes, têxteis, auxiliares de borracha e corantes, além de ser matéria-prima para a síntese do 2,2-dicloropropionato de sódio, utilizado na produção de herbicidas. O AP também é precursor na síntese de sabores e fragrâncias artificiais (éter propiônico e propionato de benzila), drogas (AP e ácido cloropropiônico) e propionato de acetato de celulose (AHMADI et al., 2017).

Com o aumento do preço do petróleo e a crescente demanda por produtos produzidos por rotas verdes, o interesse comercial em produzir AP e outros produtos químicos a partir de fontes renováveis cresceu (FENG et al., 2011; RUHAL 2011; TSOSKOUNOGIOU et al., 2008; ZHANG e YANG, 2009). Além disso, o aumento do custo para eliminação de resíduos e restrições ao aterro para determinados tipos de resíduos, resultaram no interesse em uma produção mais sustentável de produtos químicos e materiais de base biológica de matérias-primas renováveis (TSOSKOUNOGIOU et al., 2008). A conversão de resíduos de base biológica ou subprodutos em produtos químicos com alto valor agregado oferece várias vantagens como baixo custo de produção, menor impacto ambiental, menor exigência de energia e produtos menos tóxicos e biodegradáveis.

2.1.1 Rotas biológicas para a produção de ácido propiônico

Existem diversas bactérias anaeróbicas facultativas que produzem o AP como principal produto. Essas bactérias pertencem aos gêneros *Propionibacterium*, *Veillonella*, *Selenomonas*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, entre outros (BOYAVAL, 1994; SESHADRI, 1993; PLAYNE, 1985).

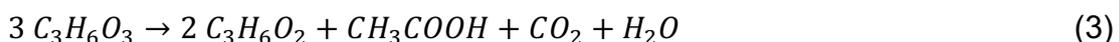
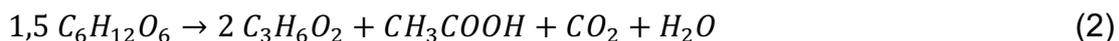
O AP é produzido principalmente por *Propionibacterium*, que foi observada pela primeira vez na fabricação de queijos, no início do século XIX por Freudenreich e Orla Jensen, Van Niel, Werkman e Kendall (PIWOWAREK et al., 2018). Esses autores nomearam cerca de 11 espécies de *Propionibacterium*.

Propionibacterias como *P. acidipropionici* (HIMMI, 2000; GOSWAMI, 2000; CHOI, 1994; PAIK, 1994), *P. shermanii* (QUESADA-CHANTO, 1998; NANBA, 1983; LEE, 1974), *P. freudenreichii* subespécie *shermanii* (ANASTASIOU, 2006; HIMMI, 2000; MARSHALL, 1995), e *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* (EMDE, 1990) são comumente utilizadas para a produção de AP. No entanto, *P. acidipropionici* (Figura 3) tem sido a espécie mais utilizada para desenvolvimentos industriais de produção de AP (MARTINEZ-CAMPOS, 2002; WOSKOW, 1991).

O propionato é produzido principalmente pela via do ácido dicarboxílico, mas algumas espécies produzem propionato a partir do lactato pela via do ácido acrílico. O propionato quase nunca é formado como único produto; sua síntese costuma ser acompanhada pela formação de acetato e dióxido de carbono, isso ocorre por razões estequiométricas (PLAYNE, 1985).

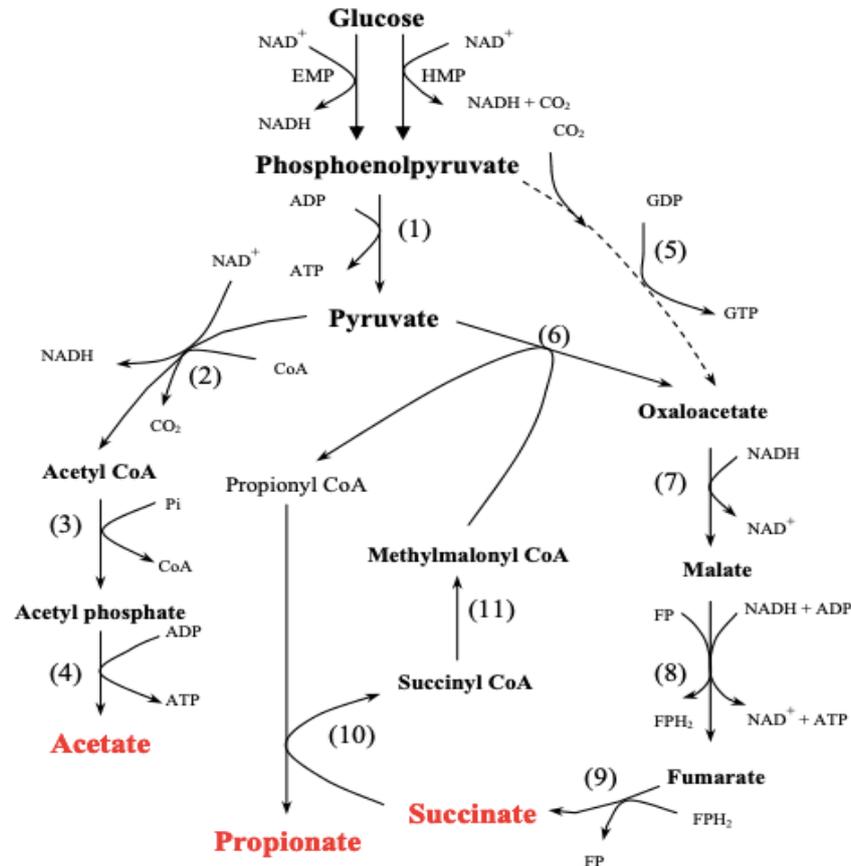
2.1.1.1 Via do ácido dicarboxílico na formação de Ácido Propiônico

Na formação de AP a via do ácido dicarboxílico é a mais comum. A maioria das bactérias produtoras de AP prefere utilizar o lactato como substrato ao invés da glicose (BARBIRATO, 1997), que forma propionato pela via do ácido dicarboxílico ou pela via acrílica, sendo a espécie bacteriana que determina a via. As equações a seguir mostram a quebra de glicerol (1), a estequiometria da bactéria utilizando glicose (2) e lactato (3):



A Figura 2 mostra a via do ácido dicarboxílico a partir da glicose e outras fontes de carbono.

Figura 2 - A via do ácido dicarboxílico de *P. acidipropionici*



Fonte: The dicarboxylic pathway to propionate (SUWANNAKHAM, 2005).

Legenda: (1) Piruvato quinase; (2) Complexo piruvato desidrogenase; (3) Fosfotransacetilase; (4) Acetato quinase; (5) PEP carboxilase; (6) Oxaloacetato transcarboxilase; (7) Desidrogenase málica; (8) Fumarase; (9) Succinato desidrogenase; (10) Propionil CoA: succinil CoA transferase; (11) Metilmalonil isomerase (SUWANNAKHAM, 2005).

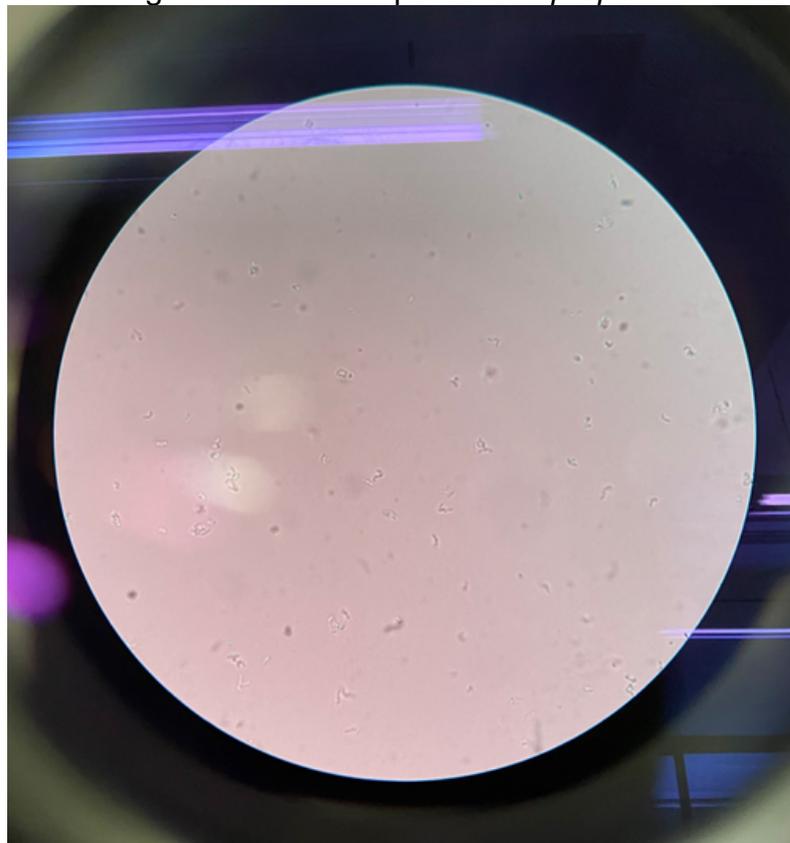
A razão de AP para AA (P/A), são controladas por razões termodinâmicas, para produção de ATP e geração de entropia (HIMII, 2000; LEWIS, 1992). Em teoria, a razão molar P/A é 2; no entanto, foi relatado que há uma grande variação na relação P/A de 2:1 a 10:1, quando a glicose é a fonte de carbono (MARTINEZ-CAMPOS, 2002; BOYAVAL, 1994; CRESPO, 1991; WOOD, 1936). A relação P/A muda muito com as condições de crescimento (MARSHALL, 1995; SESHADRI, 1993; HSU, 1991; NANBA, 1983).

2.2 PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI

Pertencente à classe das Actinobactérias, *Propionibacterium* é um gênero de bactérias gram-positivas, imóveis, anaeróbicas ou anaeróbicas facultativas,

capazes de utilizar uma ampla gama de fontes de carbono. Não formadora de esporos e com catalase positiva sua nomenclatura faz menção ao seu metabolismo, já que são capazes de sintetizar AP usando enzimas transcarboxilase incomuns. As condições ótimas de crescimento são uma faixa de pH de 6 a 7 (SESHADRI, 1993; HSU, 1991; NANBA, 1983) e uma faixa de temperatura de 30 a 37 °C (SESHADRI, 1993). Se o valor do pH estiver abaixo de 4,5, praticamente não há crescimento e baixa formação de ácidos orgânicos (HSU, 1991; PLAYNE, 1985).

Figura 3 - Microscopia *P. acidipropionici*



Fonte: Autora (2023).

Isoladas pela primeira vez por Eduard von Freudenreich, Orl-Jensen e van Neila na metade do século XX (PIWOWAREK et al., 2018) o gênero é dividido em dois grupos principais: clássico e cutâneo. O grupo cutâneo é formado por patógenos oportunistas, espécies da pele humana, mucosa oral e gastrointestinal, sendo responsável pelas acnes. Já o grupo clássico é amplamente utilizado pela indústria de alimentos e pela indústria farmacêutica por sua habilidade de produzir metabólitos de grande valor agregado, como AP (GU, 1998; CRESPO, 1991; EMDE, 1990; JOHNS, 1951; WOOD, 1936), vitamina B12 (BOYAVAL, 1995; QUESADA-

CHANTO, 1998; PLAYNE, 1985), bacteriocina, trealose e também para a produção de queijos suíços (BOYAVAL, 1995; HETTINGA, 1972).

A trealose é um dissacarídeo não redutor no qual duas moléculas de glicose são ligadas por uma ligação glicosídica (ELBEIN et al., 2003), e foi identificada e caracterizada em vários organismos, incluindo bactérias, fungos, leveduras, plantas e insetos, nos quais os dissacarídeos não redutores (incluindo sacarose) são importantes formas de energia, sendo os principais responsáveis pelo seu armazenamento. (SINGER & LINDIQUIST, 1998; ELBEIN et al., 2003; PAUL et al., 2008; ITURRIAGA et al., 2009). Por não participar da reação de Maillard (responsáveis pelo escurecimento de alimentos), esse dissacarídeo pode ser atraente para aplicações industriais e suas propriedades contribuem para seu interesse biotecnológico, por conferir um efeito protetor e estabilizador de biomoléculas, células inteiras, ou mesmo de produtos alimentícios, farmacêuticos e cosméticos (ELBEIN, 1974; THEVELEIN, 1984; COUTINHO et al., 1988; ROSER, 1991; COLAÇO et al., 1992; ELBEIN et al., 2003; PAUL et al., 2008; ITURRIAGA et al., 2009).

A vitamina B12 está presente apenas em alimentos de origem animal, como leite, ovos, carne, entre outros. Os seres humanos necessitam de uma ingestão diária de 2,4 µg dessa vitamina (HANNIBAL et al., 2018; STRAND et al., 2013). A B12 tem um papel extremamente importante em diversos processos, como eritropoiese (RETIEF et al., 1966), síntese de DNA (HERRMANN; OBEID, 2012), prevenção de problemas cardíacos (HERRMANN et al., 2002), manutenção da função neurológica (STRAND et al., 2013), além de estar associada ao risco de desenvolvimento de câncer (CHOI et al., 2004).

Propionibacterium podem utilizar como substrato a 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, 1996) e lactato (GU, 1998; RICKERT, 1998; LEWIS, 1992).

P. acidipropionici, em contraste com outras espécies de propionibactérias, apresenta catalase fraca ou negativa, as cepas crescem bem em condições aeróbicas e são isoladas de produtos lácteos. *P. acidipropionici* é capaz de fermentar uma grande variedade de substratos como sacarose, maltose, arabinose, celobiose e glicerol (VOROBYEVA, 1999).

Tabela 2 - Estudos desenvolvidos para produção de ácido propiônico por *P. acidipropionici* via fermentação.

Autor	Fonte de Carbono	Produtividade (g.L⁻¹ h⁻¹)	Fermentação
Himmi et al. (2000)	Glicerol	0,420	Batelada alimentada
	Glicose	0,240	
Goswami e Srivastava (2000)	Lactose	0,230	Batelada alimentada
Coral et al. (2008)	Lactato de sódio	0,113	Batelada alimentada
	Glicerol	0,051	
	Melaço de Cana-de-açúcar	0,062	
Zang e Yang (2009)	Glicose	0,53	Batelada alimentada
Liu et al. (2011)	Glicerol	0,108	Batelada
	Glicose	0,068	
	Glicerol/Glicose	0,152	
Zhu et al. (2012)	Glicose	0,51	Batelada
	Bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado	0,29	
Zhu et al. (2012)	Glicose	0,43	Batelada Alimentada
	Bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado	0,37	
Yang et al. (2018)	Frutose	0,159	Batelada
	Rafinose	0,141	
	Melaço de Soja	0,390	

Fonte: Autora (2023).

A tabela 2 mostra estudos desenvolvidos para a produção de ácido propiônico utilizando a *P. acidipropionici* e diferentes fontes de carbono. As fermentações em batelada alimentada alcançaram as maiores produtividades globais, juntamente com fontes de carbono simples como a glicose e o glicerol.

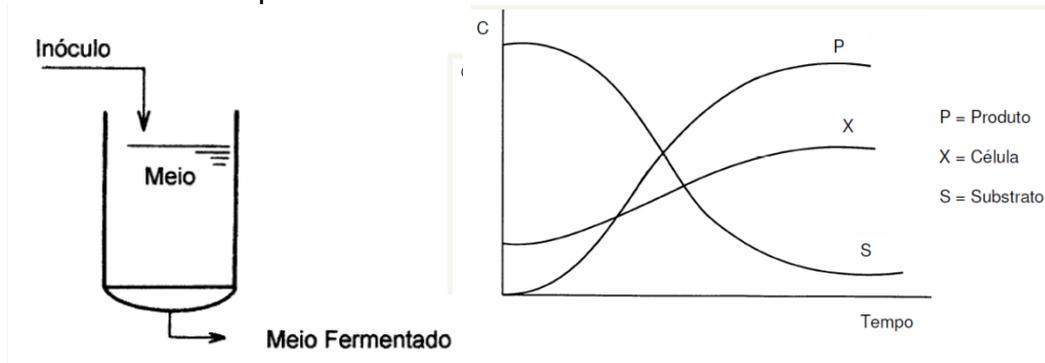
2.2.1 Modos de operação de biorreatores para processos fermentativos

2.2.1.1 Batelada

O processo em batelada, também conhecido como descontínuo, consiste em um inóculo em um tanque que contém um substrato adequado ao desenvolvimento do microrganismo. Na batelada, a fermentação só inicia depois que o fermentador for preenchido, momento em que se mistura o substrato com o inóculo. A fermentação acaba quando a atividade biológica é cessada por falta de nutrientes ou por excesso de produto inibidor. Esse processo fermentativo pode levar a baixos rendimentos e produtividades, pois quando o substrato é adicionado somente uma vez no início da fermentação pode exercer efeitos de inibição, repressão, ou desvio do metabolismo celular a produtos diferentes dos que são destinados. O uso da fermentação descontínua fica restrito para fermentações laboratoriais, farmacêuticas e na produção de cachaça (TOSETTO,2002; CARVALHO e SATO, 2001; PORTO, 2005).

Como vantagem, o processo descontínuo apresenta boas condições de assepsia, menores riscos de contaminação, grande flexibilidade de operação, condição de controle mais estreita da estabilidade genética do microrganismo, assim como a capacidade de identificação de todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo o lote de um produto (CARVALHO e SATO, 2001; SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Figura 4 - Biorreator em batelada e variação de S, X e P com o tempo em um processo fermentativo descontínuo



Fonte: Adaptado de Mendes et al., 2013; Adaptado de Copersucar, 1987.

O balanço de massa da fermentação em batelada é calculado partindo do balanço global, onde:

$$\text{Variação Global} = \text{Entrada} - \text{Saída} + (\text{geração/consumo}) \quad (4)$$

Porém, temos que em um sistema de batelada, o termo de entrada e saída é nulo.

Para o balanço de células, temos:

$$V \cdot \frac{dX}{dt} = F_e \cdot X_e - F_s \cdot X_s + V \cdot rX \quad (5)$$

Onde F_e é vazão de entrada e F_s a vazão de saída em L/h e V o volume do reator em litros, e X_e X_s a concentração de células na corrente de entrada e saída respectivamente ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Como F_e e F_s são nulos, pois não existe fluxo de entrada nem saída de células do reator, e $\mu X = rX \cdot (1/X)$, podemos reescrever a Equação 5 como:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X \quad (6)$$

Onde μ_x é a velocidade específica de crescimento celular.

Para o balanço de substratos, temos:

$$V \cdot \frac{dS}{dt} = F_e \cdot S_e - F_s \cdot S_s - V \cdot rS \quad (7)$$

Onde S_e é a concentração de substrato na corrente de alimentação e S_s na corrente de saída (g. L^{-1}). Como F_e e F_s são nulos, pois não existe fluxo de entrada nem saída do reator podemos escrever a Equação 7 como:

$$\frac{dS}{dt} = -rS \quad (8)$$

Por fim, para o balanço de produto:

$$V \cdot \frac{dP}{dt} = F_e \cdot P_e - F_s \cdot P_s + V \cdot rP \quad (9)$$

Onde P_e e P_s a concentração de produto em (g. L^{-1}) na corrente de entrada e saída respectivamente. Como F_e e F_s são nulos, pois não existe fluxo de entrada nem saída do reator e $\mu^P = rP \cdot (1/X)$, podemos reescrever a Equação 9 como:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p \cdot X \quad (10)$$

Onde μ_p é a velocidade específica de produção.

2.2.1.2 Batelada alimentada

O processo descontínuo alimentado é uma técnica em processos microbianos em que um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e os produtos gerados permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de substrato pode ser feita de forma contínua ou intermitente (CARVALHO e SATO, 2001).

Controlar a vazão de alimentação de substrato do sistema permite controlar a concentração do substrato, e assim, diminuir o efeito inibitório causado pelo excesso de açúcar. Isso permite a adição de açúcar nos momentos em que a fermentação está com concentrações baixas do mesmo (LESSMANN, 1993).

Devido ao controle da concentração de substrato, o metabolismo microbiano pode ser deslocado para uma via metabólica específica, resultando em um aumento da produção de um produto específico. Após a fase de enchimento no biorreator, o

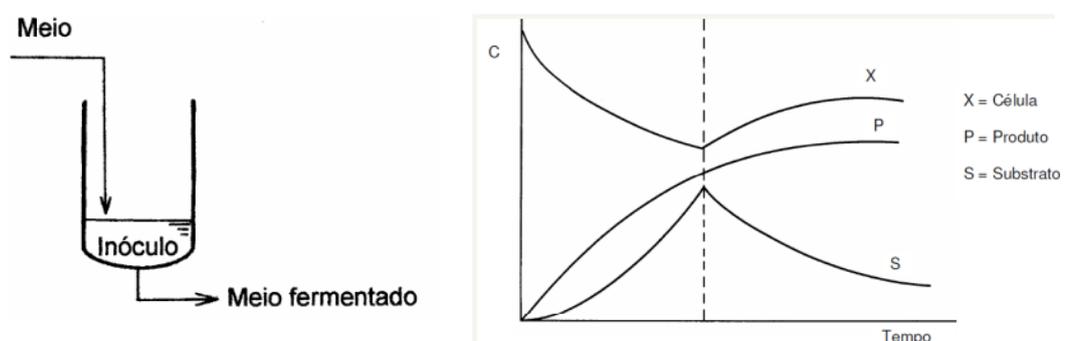
processo adquire as mesmas características do processo descontínuo, sem entrada ou saída de elementos do biorreator. O processo cessa no instante em que a massa de produto no biorreator se mantém constante, ou seja, quando entra em equilíbrio (CARVALHO; SATO, 2001).

Um ponto importante na fermentação em batelada alimentada é o desenvolvimento de uma estratégia de alimentação apropriada. Estratégias para controlar a concentração de nutrientes dentro do intervalo ótimo estão sendo desenvolvidas, e aplicada para a cultura de células de alta densidade de vários microrganismos (LEE et al., 1999).

O processo foi introduzido com o intuito de aumentar a produtividade em relação à batelada simples, que além de ser lenta possui baixa produtividade. Algumas vantagens são (ALMEIDA, 1960):

- Economia de açúcar devido a um menor crescimento celular e conseqüentemente um aumento do rendimento em etanol e outros produtos;
- Eliminação de contaminantes pela centrifugação do mosto fermentado (separação da levedura);
- Eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do inóculo, prática exigida no processo descontínuo clássico, diminuindo a complexidade das operações na condução do processo.
- Grande potencial para a automação de processos e redução de custos operacionais.

Figura 5 - Biorreator em batelada alimentada e variação de S, X e P com o tempo em um processo fermentativo descontínuo alimentado



Fonte: Adaptado de Mendes et al., 2013; Adaptado de Copersucar, 1987.

O balanço de células de um processo em batelada e de um em batelada alimentada é o mesmo, representado pela Equação 6.

Para o balanço de substratos, temos:

$$V \cdot \frac{dS}{dt} = F_e \cdot S_e - F_s \cdot S_s - V \cdot rS \quad (7)$$

Onde F_e é vazão de entrada e F_s a vazão de saída em L/h e V o volume do reator em litros. Como o termo de saída é nulo, $\mu S = rS \cdot (1/X)$ e $F/V = D$, temos:

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot S_e - \mu_s \cdot X \quad (11)$$

Onde μ_s é a velocidade específica de consumo de substrato e D é a vazão específica de alimentação.

Por fim, o balanço de produtos do processo de batelada alimentada é igual ao da batelada, representado pela Equação 10.

2.2.1.3 *Processo Contínuo*

O processo de fermentação contínua caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão, mantendo-se o volume de reação constante pela retirada contínua de caldo fermentado. Cada porção de meio alimentada no fermentador é instantaneamente misturada com o volume de reação, de forma que o líquido efluente possuirá as mesmas concentrações de células, substrato e produto, que aquelas existentes no meio de reação (GOMEZ, 2011).

Nesse tipo de processo, é essencial manter um volume de cultura constante. A manutenção de volume constante de líquido no reator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário, condição na qual as variáveis de estado (concentração de célula, de substrato e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema (SOUZA, 2009).

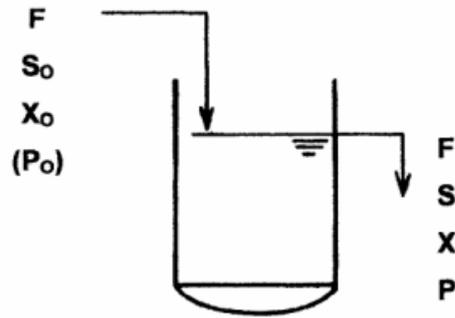
Os primeiros sistemas de processos contínuos foram os de dornas ligadas em série, com quantidade e tamanho variados, em cascata, em que as primeiras

dornas continham cerca de 70% do volume total da fermentação. Com a evolução dos processos fermentativos, ocorreu a otimização dos mesmos, aumentando a produtividade e diminuindo o tempo do processo. Uma planta operando de forma contínua tem um nível de utilização dos equipamentos de 100%, ou seja, não existem tempos mortos, diminuindo assim o volume de fermentadores necessários e área de troca térmica dos trocadores de calor utilizados para resfriar os mesmos. Este fato faz com que o investimento inicial em um processo contínuo possa chegar a 60% daquele necessário para a instalação de um processo batelada de mesma capacidade. Apesar de custar menos, os processos de fermentação contínua exigem um maior nível de automação e sua operação, apesar de mais simples, exigem maiores cuidados

Algumas vantagens dos processos contínuos são (FACCIOTTI, 2001; BORGES, 2008; PACHECO, 2010):

- Maior produtividade;
- Menores volume de equipamentos em geral;
- Amplas possibilidades de total automação;
- Redução do consumo de insumos;
- Trabalham em condições ótimas de operação no estado estacionário.
- Algumas desvantagens são:
- Possibilidade maior de contaminação;
- Possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas e seleção de mutantes menos produtivos;
- Dificuldades de operação em estado estacionário, como: formação de espuma, crescimento do microrganismo na parede do biorreator;
- Dificuldades de manutenção de homogeneidade no reator, quando se trabalha com vazões baixas;
- Maior investimento.

Figura 6 - Biorreator em processo contínuo



Fonte: Adaptado de Mendes et al., 2013; Adaptado de Copersucar, 1987

Legenda: (F) Vazão; (S) Substrato; (X) Célula; (P) Produto.

O balanço de massa de um processo contínuo é calculado partindo do balanço global, Equação 4, porém como se encontra no estado estacionário temos que não há variação.

Para o balanço de células, temos que X_e é nulo, pois não existe células na corrente de entrada do reator, $\mu X = rX \cdot (1/X)$ e $F/V = D$. Podemos escrever a Equação 13 como:

$$D = \mu_x \quad (13)$$

Onde D é a vazão específica de alimentação.

Para o balanço de substratos, temos:

$$0 = F_e \cdot S_e - F_s \cdot S_s - V \cdot r_S \quad (14)$$

Onde S_e é a concentração de substrato na corrente de alimentação e S_s na corrente de saída ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). Como $\mu_S = r_S \cdot (1/X)$ e $F/V = D$, temos:

$$(S_e - S_s) = -\mu_S \cdot X \quad (15)$$

Por fim, para o balanço de produto não temos P_e . Como $\mu_P = r_P \cdot (1/X)$ e $F/V = D$, temos:

$$D \cdot P_s = \mu_P \cdot X \quad (16)$$

Onde P_e e P_s a concentração de produto em (g. L^{-1}) na corrente de entrada e saída respectivamente, e μ_p é a velocidade específica de produção.

2.3 SUBSTRATO DE BAIXO CUSTO

2.3.1 Bagaço de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea, da classe das monocotiledôneas, sendo um híbrido complexo de várias espécies do gênero *Saccharum* (EMBRAPA, 2005). Dentre elas, destacam-se comercialmente as espécies *Sinense* e *Officinarum* por possuírem os maiores teores de sacarose.

Essa cultura possui grande importância no Brasil, sendo cultivada em diversos ambientes com diversidade de clima e solo (MAULE et al., 2001).

O bagaço da cana-de-açúcar corresponde a 30% (base úmida) da cana-de-açúcar moída e é o maior resíduo da agroindústria brasileira (SILVA et al., 2007). As próprias usinas utilizam deste bagaço como fonte energética (substitui o óleo combustível no processo de aquecimento das caldeiras) e para a geração de energia elétrica (BURGI, 1985).

Existem outros usos não energéticos para o bagaço da cana, como matéria-prima na indústria de papel e papelão, na indústria química, como material alternativo na construção civil, como ração animal e na produção de biomassa microbiana (PANDEY et al., 2000).

As fibras do bagaço da cana-de-açúcar contém, como principais componentes, cerca de 40% de celulose, 35% de hemicelulose e 15% de lignina (BURGI, 1985).

A celulose é o biopolímero renovável mais abundante da natureza, encontrado em plantas, bactérias e alguns animais (TINGAUT et al., 2012; CHEN, 2014). É um homopolissacarídeo semicristalino linear de cadeia longa constituída de 7.000 a 15.000 resíduos de D-glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas (GIBSON, 2012). Em vegetais, as moléculas de celulose estão organizadas em fibrilas elementares, que são integradas em unidades maiores denominadas microfibrilas, que por sua vez compõem as fibras (PAAKKO et al., 2007; HABIBI et al., 2010). As microfibrilas de celulose estão envolvidas em uma matriz envolta por

hemicelulose e lignina ou pectina, conferindo suporte estrutural às plantas (GIBSON, 2012; SILVEIRA et al., 2013).

Hemicelulose refere-se a um grupo de polissacarídeos de cadeia ramificada e baixa massa molecular, que atua como agente de ligação entre a celulose e a lignina nas paredes das plantas (BAI; HU; XU, 2012). São compostas por um ou mais tipos de açúcar, contendo 5 ou 6 átomos de carbono, e classificadas de acordo com sua composição. Também contêm grupos substituintes acetil e metil. Possui configuração irregular e ausência de cristalinidade, motivo pelo qual absorve água facilmente, contribuindo para o aumento de flexibilidade das fibras assim como para o aumento da área específica ou de ligação das fibras (MARQUES et al., 2010).

A lignina trata-se de um dos principais componentes dos tecidos, ocorrendo em vegetais e tecidos vasculares. Possui um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microrganismos. Vegetais primitivos como fungos, algas e líquens não são lignificados (FENGEL & WEGENER, 1989).

2.3.2 Transformação do bagaço de cana-de-açúcar em substrato para processos de fermentação

Antes da produção de hidrolisado é preciso que a matéria-prima esteja apta para receber o tratamento de forma a ser eficiente. No caso de uma biomassa lignocelulósica como o bagaço de cana-de-açúcar é necessário romper a barreira vegetal formada pela lignina e hemicelulose, desestruturando a parede celular do vegetal por meio dos pré-tratamentos, cujo o objetivo é tornar a celulose mais suscetível ao acesso das enzimas na hidrólise.

Sem o pré-tratamento, a ação das enzimas é lenta e com rendimentos inferiores a 20%, mas a inserção de uma etapa de pré-tratamento resulta em rendimentos superiores a 80% (MORAIS, 2010). A eficiência desta etapa fica em função do rendimento, seletividade, funcionalidade e custo de operação. Segundo (ASSUMPÇÃO, 2015) para o pré-tratamento ser bem sucedido os requisitos são:

- A ruptura do complexo lignina-carboidrato;
- Preservação da cadeia celulósica;
- Redução do grau de polimerização e cristalinidade dos constituintes;

- Aumento da área superficial;
- Baixa produção de substâncias de degradação dos açúcares tais como ácido acético, furfural, 5- hidroximetilfurfural e compostos fenólicos.

Os métodos de pré-tratamento propostos podem ser classificados como físicos (tratamento mecânico por trituração, moagem, ultrassons e micro-ondas), químicos (líquidos iônicos, agentes oxidantes, ácidos, álcalis, solventes orgânicos e AFEX- explosão com solução de amônia), físico-químicos (explosão a vapor d'água, fluidos supercríticos e a auto hidrólise com água líquida quente (LHW)) e biológicos (ação de microrganismos). Além da possível combinação entre eles.

Tabela 3 - Tipos de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas

Pré-tratamentos	Fatores	Vantagens	Desvantagens	Referências
Físicos	Moagem e trituração; Radiação e Altas temperaturas	Redução do tamanho da partícula; Redução da cristalinidade.	Alto gasto energético; Não remoção de lignina e hemicelulose e formação de inibidores.	Agbor et al (2011); Santos et al (2012); Sarkar et al (2012).
Químicos	Alcalinos e AFEX	Remoção da lignina; Despolimerização da hemicelulose.	Formação de sais irrecuperáveis; baixa eficiência em resíduos com alto teor de lignina e corrosão	Agbor et al (2011); Kumar et al (2009); Sarkar et al (2012).
	Ácidos	Remoção da hemicelulose; altera estrutura da lignina.	Necessidade de neutralização; Ataque pouco efetivo a lignina e Corrosão.	Candido et al (2012); Chatuverdi e Verma (2013).
	Agentes Oxidantes	Remoção efetiva da hemicelulose; Baixa degradação da celulose; Não geração de resíduos sólidos.	Necessidade de ajuste de pH do reagente.	Dawson Boopathy (2008); Chatuverdi e Verma (2013); Rabelo et al (2011).
Biológicos	Solventes Orgânicos	Remoção da lignina e hemicelulose; Obtenção da lignina com alto grau de pureza.	Necessidade de remoção do solvente residual; Formação de inibidores; Alto custo na recuperação do solvente.	Sun et al (2002); Agbor et al (2011); Santos et al (2012).
	Microrganismos (Fungos)	Remoção da lignina e hemicelulose; Baixo gasto energético; Ideal para materiais com alto teor de carboidratos.	Maior tempo de residência; Alto custo; Taxa de hidrólise baixa; Menor rendimento em açúcares.	Balat (2011); Zheng et al (2009); Ogeda e Petri (2010).
Físico-Químicos	Explosão a vapor; Explosão a CO ₂ e LHW	Aumento da área superficial; eficiência energética	Equipamentos resistentes a alta pressão; Alto controle das variáveis do processo; Etapa adicional para remoção da lignina.	Sun et al (2002); Alvira et al (2010); Ogeda e Petri (2010).

Fonte: Autora (2023).

A Tabela 3 mostra vantagens e desvantagens dos processos de pré-tratamento. O processo escolhido deve levar em consideração a matéria-prima e o produto final, já que diferem entre si pela ação dos reagentes e pelos mecanismos que realizam as modificações estruturais da parede celular a fim de aumentar a acessibilidade das enzimas à celulose.

O pré tratamento com glicerol visa manter a maior fração de celulose na fibra (SUN et al., 2008), e após o pré-tratamento a celulose representa mais de 60% da composição do bagaço pré-tratado. No pré-tratamento realizado foi observada uma solubilização média de 28% da celulose, 74% da hemicelulose e 78% da lignina.

Após o pré-tratamento, o bagaço-de-cana pode ainda ser submetido à uma hidrólise enzimática, que converte os polissacarídeos de celulose e hemicelulose em glicose e outros açúcares fermentáveis, que podem ser convertidos a combustíveis líquidos e muitos outros químicos de valor agregado (NEVALAINEN, 2005) por microrganismos competentes.

A hidrólise enzimática da celulose, caracterizada pela sua conversão a glicose, é catalisada por celulases. Por conta da elevada recalcitrância das fibras de celulose, grandes quantidades de enzimas são necessárias durante a hidrólise celulolítica (CALZADO, 2017).

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações glicosídicas, e classificam-se de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico. As endoglucanases agem de forma aleatória, clivando ligação beta, dentro da molécula da celulose; as celobiohidrolases (exoglucanases) removem as unidades de celobiose a partir das extremidades da cadeia da celulose e a β glucosidase quebra celobiose em duas unidades de glicose (LIMA et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO E REATIVAÇÃO

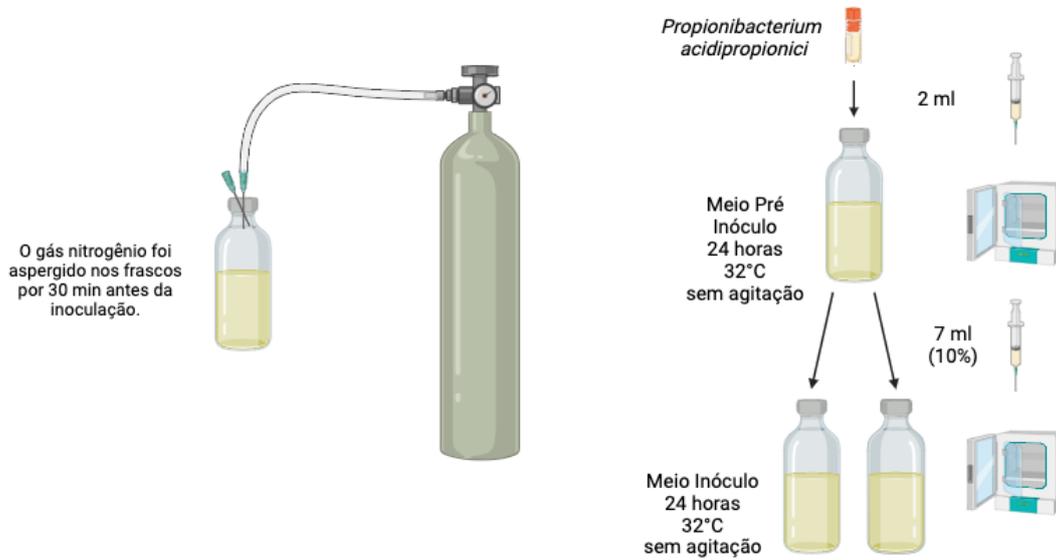
Neste estudo foi utilizada a linhagem de *Propionibacterium acidipropionici* ATCC 4875, gentilmente cedida pela Prof.a Dr.a Aline Carvalho da Costa da Universidade Estadual de Campinas, Unicamp. A cultura foi reativada em meio *reinforced clostridial medium* (RCM), composto por (g. L⁻¹): extrato de levedura (3), extrato de carne bovina (10), peptona (10), amido solúvel (1), glicose (5), cloridrato de cisteína (0,5), cloreto de sódio (5), acetato de sódio (3). O cultivo foi realizado em condições anaeróbicas em frascos selados (*serum bottles*) a 32 °C, sem agitação. As cepas foram estocadas em frascos criogênicos a - 80 °C, contendo 1,0 mL de suspensão bacteriana e 1,0 mL de glicerol a 50%. Metodologia baseada no protocolo padrão do fornecedor.

3.2 PRÉ INÓCULO E INÓCULO

Os meios de pré-inóculo e inóculo foram preparados em *serum bottles* de 100 mL contendo 70 mL de meio composto por: (g. L⁻¹) extrato de levedura (10), caldo tríptico de soja (5), K₂HPO₄ (0,25), MnSO₄.H₂O (0,05), glicose (3) e (15), para pré inóculo e inóculo respectivamente. Os componentes do meio foram esterilizados separadamente a 121 °C por 20 min e, em seguida, misturados assepticamente em cabine de fluxo laminar antes do uso. Por fim, o gás nitrogênio foi aspergido nos frascos por 30 min antes da inoculação. O pH final dos meios foi 7,0 ± 0,2. (Stowers; Cox e Rodriguez, 2014, COSTA, 2021).

Tubos criogênicos contendo a cepa *P. acidipropionici* foram descongelados e inoculados com auxílio de uma seringa em 70 mL dos meios de pré-inóculos. Os cultivos foram mantidos em crescimento a 32 °C por 24 h, sem agitação. Após o crescimento, 10 % (7 ml) do volume do pré-inóculo foi transferido para o inóculo. Os inóculos foram mantidos em crescimento a 32 °C por 24 h (Quimis Q222T2, Diadema, Brasil).

Figura 7 - Pré-Inóculo e Inóculo

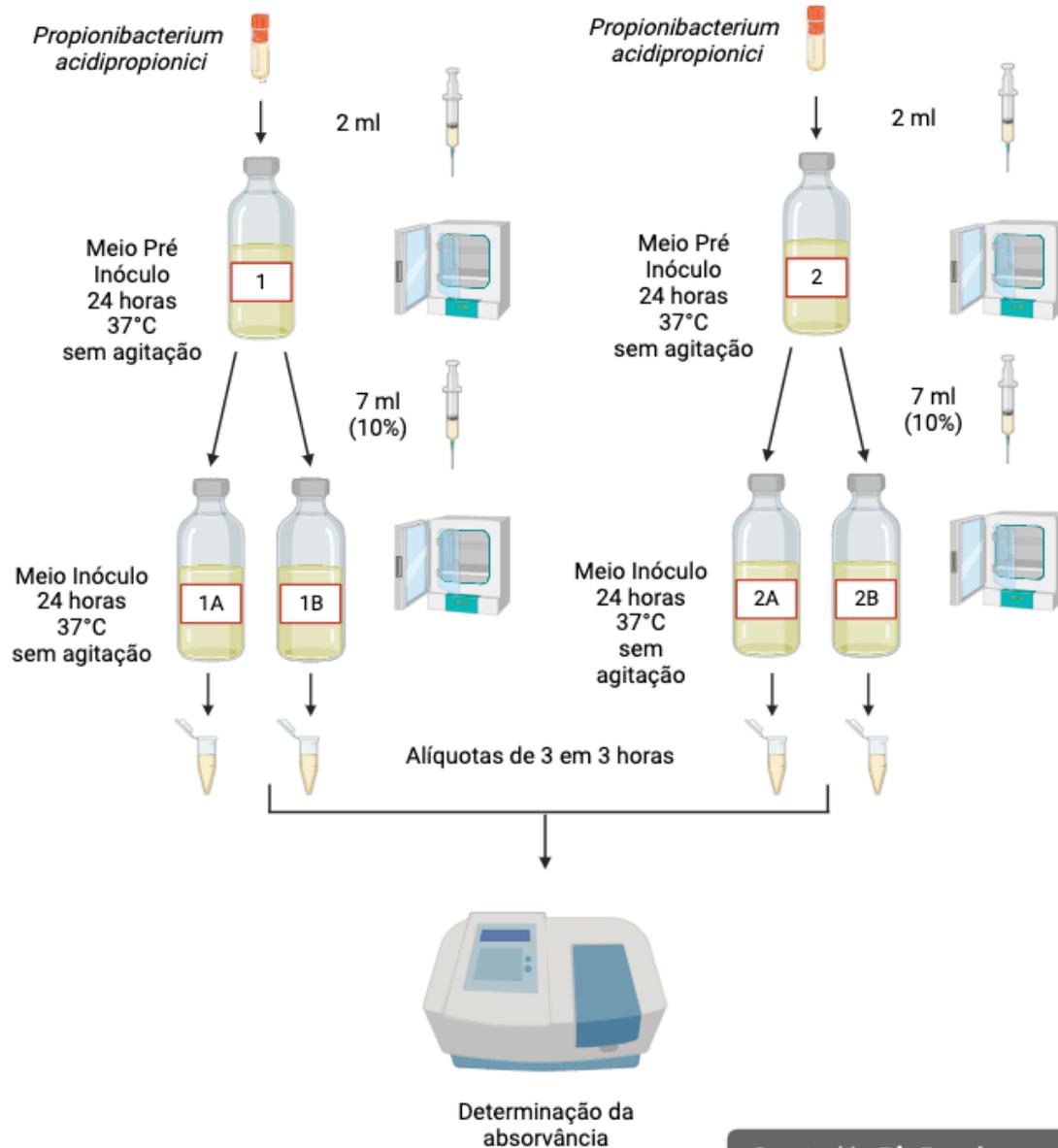
Created in BioRender.com 

Fonte: Autora (2023). (Ilustração criada na plataforma BioRender, <https://biorender.com/>).

3.3 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *P. ACIDIPROPIONICI* NO INÓCULO EM GLICOSE

Serum bottles com 70 ml de meio de pré inóculo foram inoculadas com um tubo criogênico de 2 ml contendo a cepa *P. acidipropionici*. Os cultivos foram mantidos em crescimento a 37 °C por 24 h, sem agitação. Após esse período, 10% de volume (7 ml) de meio foi transferido para quatro *serum bottles* contendo 70 ml de meio de inóculo. Os cultivos foram mantidos em crescimento a 37 °C por 24 h, sem agitação, e a cada 3 h uma alíquota foi coletada do meio para medir a absorvância e avaliar o crescimento da cepa.

Figura 8 - Esquema de pré-inóculo e inóculo de *P. acidipropionici*



Fonte: Autora (2023). (Ilustração criada na plataforma BioRender, <https://biorender.com/>).

3.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O hidrolisado foi produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar pré tratado pela equipe coordenada pela Prof.a Dr.a Aline Costa, Unicamp. O bagaço de cana foi pré-tratado com glicerol bruto vindo de uma planta de produção de biodiesel.

O bagaço *in natura* foi caracterizado e apresentou a seguinte composição: 47,7% de celulose, 30,2% de hemicelulose, 22,9% de lignina, 1,4% de cinzas e 1,8% de extrativos.

O pré tratamento foi realizado à 210°C por 30 min, e a composição utilizada foi de 30% de sólidos e 70% de glicerol. Após o pré-tratamento houve separação sólido líquido e a fração sólida foi enviada para o Laboratório de Engenharia Biológica (Lieb) da UFSC.

A hidrolise enzimática foi realizada em um Erlenmeyer (com volume útil de 40% do volume total do frasco) em que adicionou-se solução tampão citrato 0,05 mol/L para pH 4,8, e bagaço de cana-de-açúcar pré tratado em uma proporção de 10% de sólido. Em seguida, foi adicionado à polpa uma carga enzimática de 15 FPU/g de bagaço de Cellic Ctec 2. Por fim, os Erlenmeyers com a mistura foram colocados em uma incubadora (Incubadora Shaker de piso Nova Ética) com agitação orbital 150 rpm a uma temperatura de 50° C por 72 h baseado na metodologia Dionísio et al., 2021.

Após o tempo de incubação, os Erlenmeyers foram retirados da incubadora. O conteúdo foi centrifugado a 3000 xg por 5 min (Centrífuga Beckman coulter Avanti JE) e o sobrenadante filtrado com filtro de celulose até se obter um líquido translúcido. Uma alíquota de 2 ml foi coletada para posteriormente determinar as concentrações de ácido acético (AC), glicose e xilose. O restante do hidrolisado foi imediatamente autoclavado a 121°C por 20 min para parar a reação hidrolise e esterilização, seguido de armazenamento sob refrigeração para ser utilizado na fermentação.

A alíquota coletada ao fim da hidrolise foi aquecida em banho termostático a 100°C por 15 min para inativar a atividade enzimática. Em seguida, a alíquota foi diluída em duas amostras e enviada para determinar as concentrações de glicose, xilose e AC por cromatografia líquida de alta eficiência, high- performance liquid chromatography (HPLC), conforme a metodologia modificada descrita por Liu et al (2016).

3.5 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DA FERMENTAÇÃO

O meio inicial do biorreator foi composto por: (g. L⁻¹) extrato de levedura (10), K₂HPO₄ (0,25), difosfato de amônia (3) e hidrolisado de bagaço de cana-de-

açúcar (30). O meio dos pulsos foi composto de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar de forma que a concentração final do meio fosse de 30 g. L⁻¹ de hidrolisado.

Para iniciar a fermentação com alta densidade celular, 11 frascos de 70 mL de inóculo foram centrifugados a 3000 xg por 15 min (Centrífuga Beckman coulter Avanti JE) e lavados com água peptonada 0,1% estéril, em seguida, foram ressuspendidos em um volume que corresponde a 10% do volume de trabalho.

A fermentação foi realizada em regime de batelada alimentada, utilizando dois biorreatores de 1,5 L (New Brunswick BioFlo® / CelliGen® 115), com um volume total de trabalho de 0,75 L cada. O volume inicial foi de 0,3 L de meio. A condição anaeróbica foi obtida a partir da aspersão de gás N₂ no meio por 30 min antes da inoculação. A temperatura foi controlada a 32 °C e a agitação mantida a 150 rpm. O processo foi realizado com controle automatizado de pH mantido em 6,8 ± 0,2, adicionando NaOH 4 M estéril (modificada de Liu, Z. et al.2012). As amostras foram coletadas em horários pré-estabelecidos durante 76 h de fermentação.

Para a realização do pulso foram necessários cálculos para prever a quantidade de hidrolisado que deveria ser adicionada a fim de aumentar a concentração de açúcar para a concentração inicial (~30 g. L⁻¹). Os pulsos foram programados para o momento em que a concentração de açúcar estivesse próxima de 10 g. L⁻¹.

Os seguintes cálculos foram feitos:

Massa de açúcar no biorreator momento do pulso:

$$M1 = [S1] \cdot V1$$

$$M1 = 10 \text{ g. L}^{-1} \cdot 0,3\text{L}$$

$$M1 = 3\text{g}$$

Concentração que se deseja obter ao final do Pulso 1 = 30 g. L⁻¹

Volume do biorreator após pulso 1 = 0,5L

Volume do pulso 1 = 0,2 L

Concentração do hidrolisado = 68,95 g. L⁻¹

Massa de S após o pulso 1 = 30 g. L⁻¹ . 0,5 L = 15 g

$$MS_{\text{total}} = [S1] \cdot V1 + [S2] \cdot V2$$

$$15 \text{ g} = 10 \text{ g. L}^{-1} \cdot 0,3\text{L} + S2 \cdot 0,2\text{L}$$

$$S2 = 60 \text{ g. L}^{-1}$$

Sabendo que era preciso adicionar o equivalente a 60 g. L⁻¹ de açúcar, e que a solução estoque de hidrolisado era de 68,95 g. L⁻¹, pela fórmula da diluição $C1V1=C2V2$, temos que o volume de 0,174 ml de hidrolisado deveria ser adicionado ao biorreator. Além deste volume, 0,026 L de uma solução de extrato de levedura (10 g. L⁻¹) foram adicionados para completar 0,2 L do pulso.

O segundo pulso aconteceu quando a concentração de açúcar residual no biorreator estivesse próxima de 10 g. L⁻¹ novamente. Considerando agora um volume de 0,5 L, e que no final do pulso 2 com 0,7 L teria 21 g de açúcar, realizando as mesmas contas, temos que era necessário adicionar 0,232 L de hidrolisado da mesma solução estoque.

Dados Pulso 1:

$$C1.V1=C2.V2$$

$$68,95 \text{ g/L} . V1 = 60 \text{ g/L} . 0,2\text{L}$$

$$\mathbf{V1 = 0,174 \text{ L (volume de hidrolisado)}}$$

Dados Final Pulso 1:

$$M3 = [S3] . V3$$

$$M3 = 10 \text{ g. L}^{-1} . 0,5\text{L}$$

$$M3 = 5 \text{ g}$$

$$\text{Concentração que se deseja obter ao final do Pulso 2} = 30 \text{ g. L}^{-1}$$

$$\text{Volume do biorreator após pulso 2} = 0,7 \text{ L}$$

$$\text{Volume do pulso 2} = 0,2 \text{ L}$$

$$\text{Concentração do hidrolisado} = 68,95 \text{ g. L}^{-1}$$

$$\text{Massa de S após o pulso 2} = 30 \text{ g. L}^{-1} . 0,7 \text{ L} = 21 \text{ g}$$

$$MS_total = [S2] . V2 + [S3] . V2$$

$$21 \text{ g} = 10 . 0,5\text{L} + S3 . 0,2$$

$$S3 = 80 \text{ g. L}^{-1}$$

Dados Pulso 2:

$$C1.V1=C2.V2$$

$$68,95 \text{ g. L}^{-1} . V1 = 80 \text{ g. L}^{-1} . 0,2\text{L}$$

V1 = 0,232 L (volume de hidrolisado)

Para estimar o momento em que o açúcar estivesse próximo a 10 g. L^{-1} , a seguinte base de cálculo foi realizada:

Dados da Estimativa Pulso 1:

$y = 0,421 x + 0,5089$, onde x é a absorvância e y a massa seca (Coral et al., 2008)

Fórmula (20) e (17)

$Y_{x/s} = 0,2$ (estimado com base em Coral et al., 2008)

$S_f =$ Concentração de substrato para dar o Pulso 1 = 10 g. L^{-1}

$Abs_0 = 1,303$ (medido)

$S_0 = 30 \text{ g. L}^{-1}$

$\mu_x = 0,0903$ (gráfico)

$y = 1,057463 = x_0$

$x_f = 5,057463$

$Abs = 10,8041876$

$\ln(Abs/Abs_0) = 2,1152645$

$t = 23,42 = 23 \text{ h } 25 \text{ min}$

Pulso 1 dado no ponto 18,33Dados da Estimativa Pulso 2:

$y = 0,421 x + 0,5089$, onde x é a absorvância e y a massa seca

Fórmula (20) e (17)

$Y_{x/s} = 0,2$ (estimado)

$S_f =$ Concentração de substrato para dar o Pulso 1 = 10 g. L^{-1}

$Abs_0 = 4,9$ (medido)

$S_0 = 30 \text{ g. L}^{-1}$

$\mu_x = 0,0697$ (gráfico)

$$y = 2,5718 = x_0$$

$$x_f = 6,5718$$

$$\text{Abs} = 14,40$$

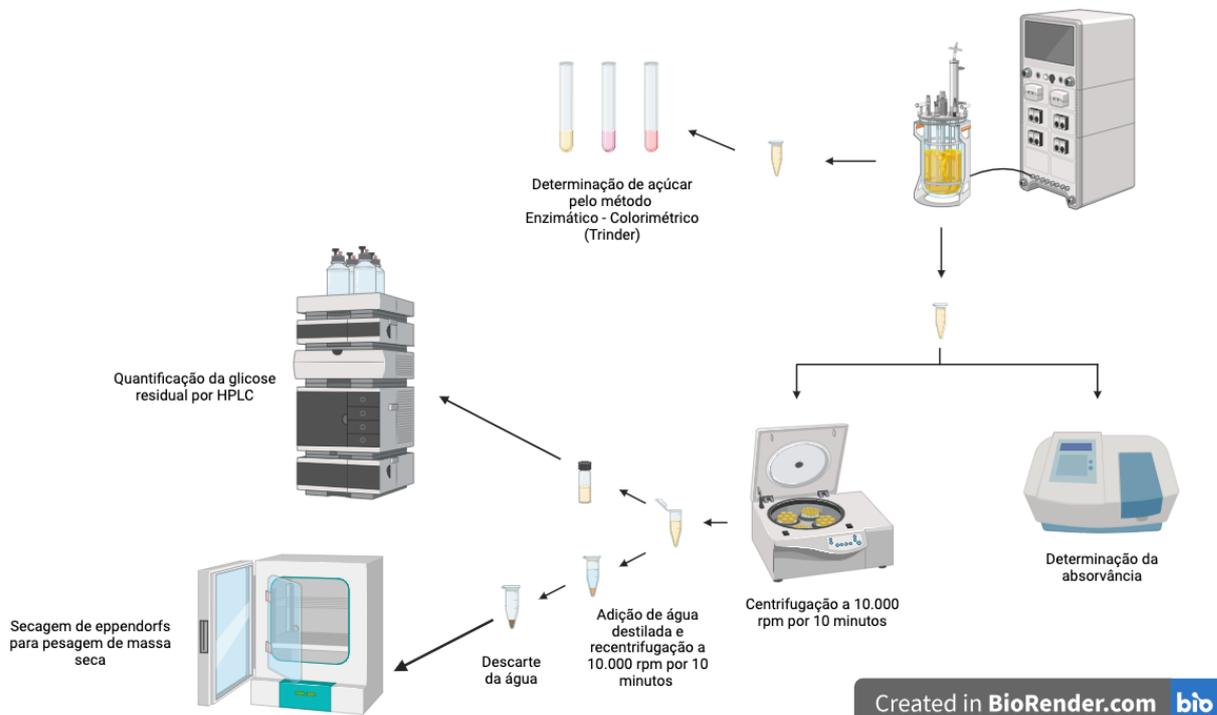
$$\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0) = 1,077993$$

$$t = 15,46 = 15 \text{ h } 28 \text{ min} = \text{ponto } 34,30$$

Pulso 2 dado no ponto 34,25

3.6 ANÁLISES DA FERMENTAÇÃO

Figura 9 - Análises da Fermentação



Fonte: Autora (2023). (Ilustração criada na plataforma BioRender, <https://biorender.com/>).

3.6.1 Determinação das concentrações de glicose, ácido propiônico (AP), ácido acético (AA), ácido succínico (AS), ácido láctico (AL)

As alíquotas da fermentação foram centrifugadas durante 10 min a 8.960 xg (Centrífuga HT MCD - 2000) e os sobrenadantes foram filtrados usando filtro com membrana PVDF, marca Analítica, tamanho de poro de 0,22 μm . As concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido propiônico (AP), ácido acético (AA), ácido

succínico (AS) e ácido láctico (AL) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, high- performance liquid chromatography (HPLC), conforme metodologia modificada descrita por Liu et al. (2016). Os produtos foram analisados com base na comparação dos tempos de retenção das amostras padrão. O cálculo da concentração dos compostos foi efetuado a partir da equação linear da curva realizada com amostras padrão.

3.6.2 Determinação da massa seca

Após retirar os sobrenadantes para determinação de compostos, os eppendorfs com massa úmida ficaram na estufa a 100 °C por 24 h (Estufa Quimis Q-371B222). Em seguida, foram pesados e a massa seca foi calculada pela diferença de peso dos eppendorfs vazios e com a massa seca. Metodologia modificada descrita por Piwowarek et al. (2019).

3.6.3 Determinação da absorvância

O crescimento celular foi monitorado por densidade óptica a 600 nm utilizando um espectrofotômetro (Bioespectro SP-220).

3.6.4 Determinação do açúcar pelo método enzimo-colorimétrico

O teste Enzimo-Colorimétrico (Trinder) tem como finalidade determinar quantitativamente a glicose. Durante tempos pré-determinados foram tiradas alíquotas do biorreator. Essas alíquotas foram diluídas e colocadas em tubos de ensaio. Além das amostras, gotas do reagente de cor (tampão fosfato 30 mmol/L; fenol 10 mmol/L; glicose oxidase \geq 12500 U/L; peroxidase \geq 800 U/L; 4-aminoantipirina 290 μ mol/L; azida sódica 7,7 mmol/L; estabilizantes e surfactantes) foram adicionadas. Os tubos de ensaio contendo a amostra e o reagente juntamente com uma amostra de branco foram submetidos à um banho maria a 37°C por 10 min (Q334M, Quimis). Posteriormente foi medida a densidade óptica a 505 nm utilizando um espectrofotômetro (Bioespectro SP-220). Os cálculos foram feitos seguindo a metodologia do fornecedor.

3.7 TRATAMENTO DOS DADOS DE FERMENTAÇÃO

Os resultados obtidos durante a fermentação foram tratados usando as equações apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Fórmulas utilizadas para análise dos resultados

Número da equação	Parâmetro	Fórmula	Unidade
(17)	Velocidade específica máxima de crescimento	$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_{x_{max}} \cdot t$ $\ln\left(\frac{abs}{abs_0}\right) = \mu_{x_{max}} \cdot t$	h^{-1}
(18)	Velocidade específica de crescimento	$\mu_x = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$	h^{-1}
(19)	Fator de conversão de substrato em produto	$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$	$gP \ gS^{-1}$
(20)	Fator de conversão de substrato em célula	$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$	$gX \ gS^{-1}$
(21)	Produtividade volumétrica global	$Q_p = \frac{P_f - P_i}{t}$	$gP \ L^{-1}h^{-1}$
(22)	Rendimento de glicose por grama de biomassa	$Y_{\frac{G}{B}} = \frac{[glicose]}{[sólidos]}$	$gG \ gB^{-1}$
(23)	Rendimento de glicose por grama de celulose	$Y_{\frac{G}{C}} = \frac{[glicose]}{[sólidos]} \cdot \frac{\%celulose}{100}$	$gG \ gC^{-1}$
(24)	Rendimento de xilose por grama de biomassa	$Y_{\frac{Xil}{B}} = \frac{[xilose]}{[sólidos]}$	$gXil \ gB^{-1}$
(25)	Conversão Estequiométrica de glicose/frutose em AP e AA	$1,5 \ C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 \ C_3H_6O_2 + CH_3COOH + CO_2 + H_2O$	
(26)	Rendimento	$n = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \cdot \frac{100}{0,55}$	%

Fonte: Autora (2023).

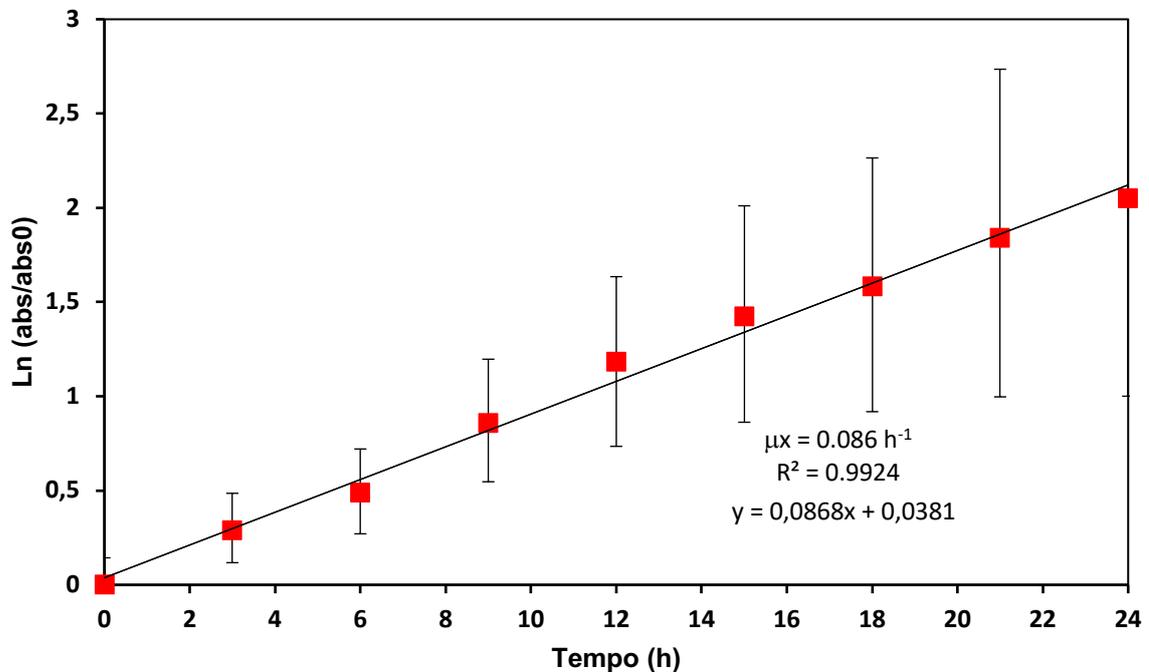
Legenda: (P_f) Concentração final de AP; (P_i) Concentração inicial de AP; (S_f) Concentração final de substrato; (S_i) Concentração inicial de substrato; (X_f) Concentração final de célula; (X_i) Concentração inicial de célula; (t) Tempo; ([glicose]) concentração de glicose; ([sólidos]) concentração de sólidos; ([xilose]) concentração de xilose; (0,55) conversão estequiométrica de glicose em AP para *P. acidipropionici*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO MICROBIANO DE *P. ACIDIPROPIONICI* NO INÓCULO EM GLICOSE

O perfil cinético permite compreender o comportamento e a capacidade de replicação do microrganismo em condições específicas. A Figura 10 apresenta o perfil cinético construído para a *P. acidipropionici* em glicose.

Figura 10 – Perfis de Ln (Abs/Abs0) do cultivo de inóculo de *P. acidipropionici* em serum bottles, a 37 °C por 24h.



Fonte: Autora (2023).

A partir dos dados da cinética foi calculada a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) por meio do coeficiente linear da reta observada nos dados de $\ln(X/X_0)$ versus o tempo. Foi possível estabelecer a velocidade específica máxima de crescimento celular de $\mu_x = 0,086 \text{ h}^{-1}$ para *P. acidipropionici* utilizando glicose como fonte de carbono.

A Tabela 5 apresenta resultados encontrados na literatura.

Tabela 5 - Velocidade específica de crescimento *P. acidipropionici* em estudos

$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	Referências
0,08	(MART, 2002)
0,05	(ZHANG, 2009)
0,076	(SILVA, 2019)

Fonte: Autora (2023).

A velocidade específica máxima de crescimento obtida é condizente com o relatado em Mart, 2002 e Silva, 2019, porém é consideravelmente maior do que a encontrada em Zhang, 2009.

4.2 RESULTADOS DA HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A hidrólise enzimática converteu os polissacarídeos de celulose e hemicelulose do bagaço de cana-de-açúcar em glicose e outros açúcares fermentáveis, como a xilose.

Tabela 6 - Resultados da Hidrólise Enzimática

Concentração em $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
Glicose	59,413
Xilose	9,553
AA	1,1275

Fonte: Autora (2023).

Os rendimentos de glicose por grama de biomassa e por grama de celulose foram calculados utilizando as Equações 22 e 23 respectivamente, e o rendimento de xilose foi calculado pela Equação 24. A concentração de sólidos foi de 125 g/L, e a porcentagem de celulose e hemicelulose no bagaço era de 47,7% e 30,2% respectivamente. Os resultados obtidos foram $Y_{\frac{G}{B}} = 0,47 \text{ gG gB}^{-1}$; $Y_{\frac{G}{C}} = 0,99 \text{ gG gC}^{-1}$ e $Y_{\frac{Xil}{B}} = 0,076 \text{ gXil gB}^{-1}$. O rendimento de glicose por grama de biomassa foi consideravelmente maior que o rendimento de xilose, pois a concentração de celulose no bagaço de cana-de-açúcar era maior do que a de hemicelulose. Além disso, a celulose é composta por grandes cadeias de glicose e a hemicelulose além de ser composta por xilose, também possui arabinose e outros açúcares na sua composição.

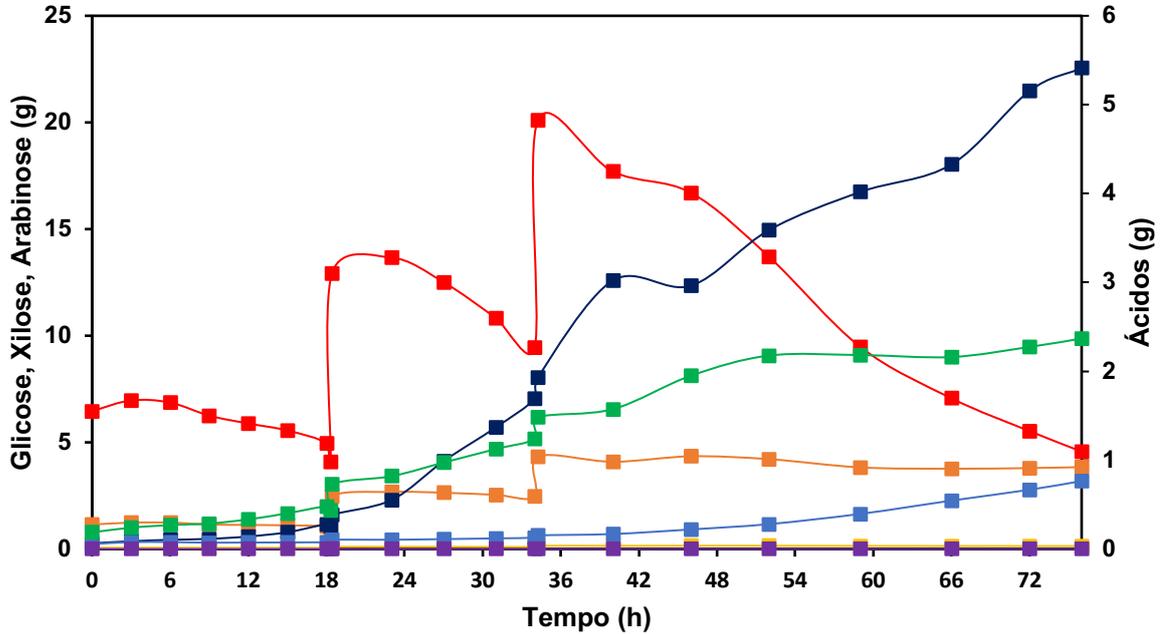
Em Wanderley, 2012 o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcançou uma concentração de 59,69 g/L de glicose, muito próxima da obtida nesse trabalho. Já o rendimento de glicose por grama de biomassa de 0,47 gG gB⁻¹ é consideravelmente maior do que o de 0,18 gG gB⁻¹ encontrado em Gualberto, 2013, que também utilizou bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como biomassa lignocelulósica.

4.3 RESULTADOS DA FERMENTAÇÃO PROPIÔNICA EM BATELADA ALIMENTADA

Atualmente, o AP é produzido, principalmente, por rotas petroquímicas, no entanto, devido à demanda por aditivos naturais para aplicação no campo alimentar, a produção de AP de origem microbiana vem crescendo, pois o AP produzido por via biológica é considerado um aditivo natural e seguro (LIU, Z. et al., 2016).

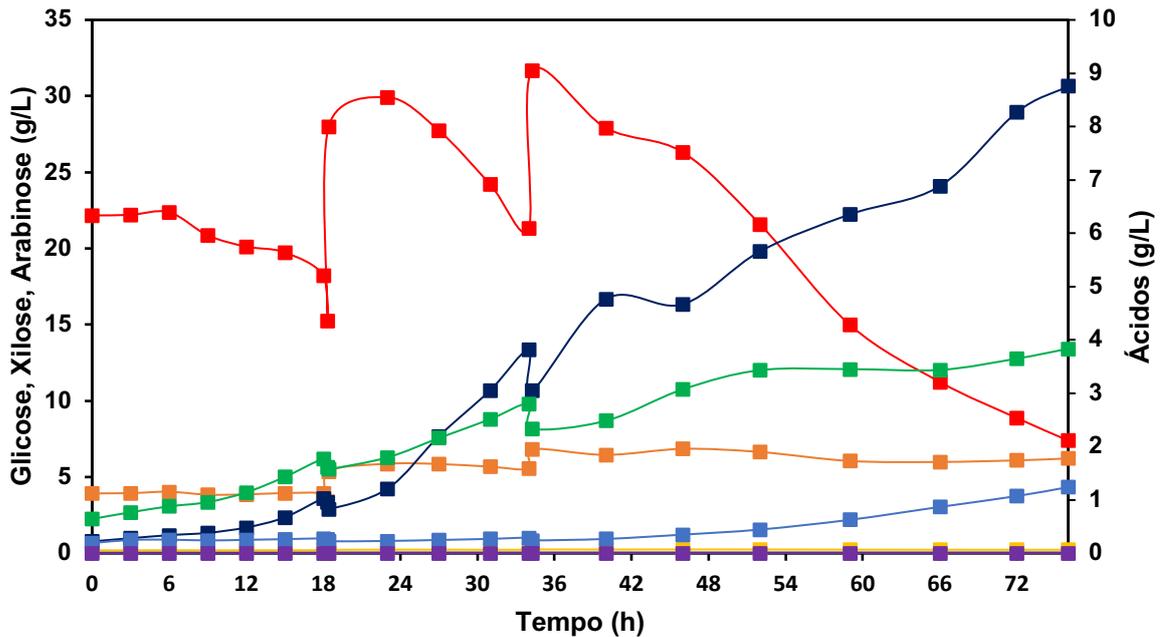
Para obtenção de AP foi realizada uma fermentação em batelada alimentada em biorreator de bancada. As Figura 11 e 12 apresentam os dados da cinética da fermentação de AP realizada com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como fonte de carbono, utilizando a cepa *P. acidipropionici*.

Figura 11 - Cinética da produção de AP por *P. acidipropionici* em biorreator utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, cultivada a 32 °C por 76 h, em pH $6,8 \pm 0,2$ mantido com NaOH 4M. AP (■), AA (■), AS (■), AL (■), glicose (■), xilose (■), arabinose (■).



Fonte: Autora (2023).

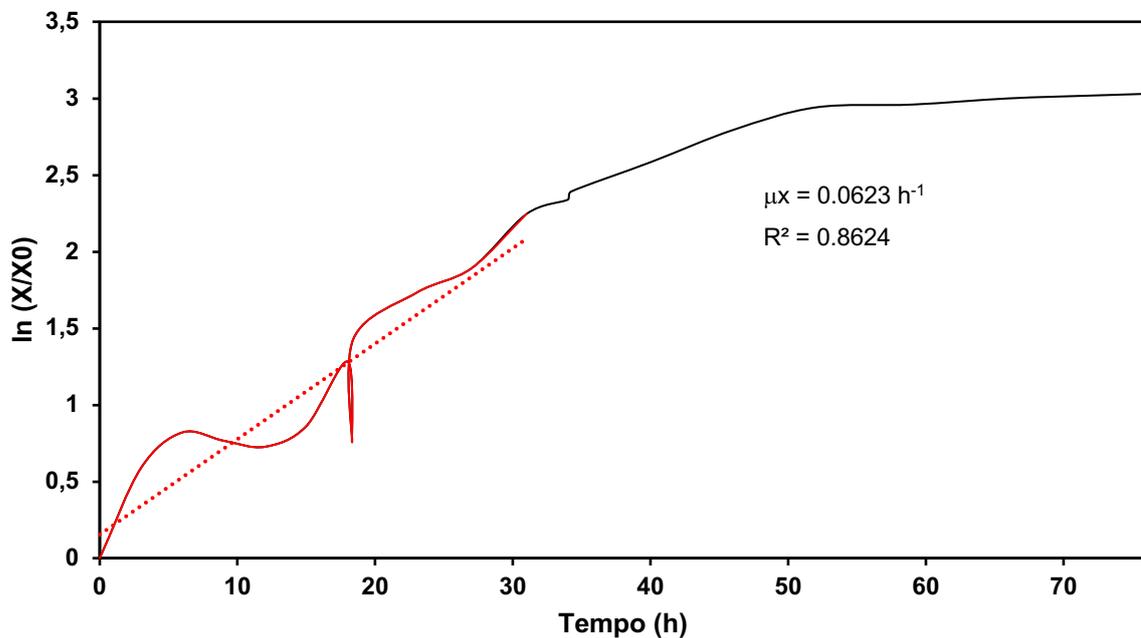
Figura 12 - Cinética da produção de AP por *P. acidipropionici* em biorreator utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, cultivada a 32 °C por 76 h, em pH $6,8 \pm 0,2$ mantido com NaOH 4M em g/L. AP (■), AA (■), AS (■), AL (■), glicose (■), xilose (■), arabinose (■).



Fonte: Autora (2023).

Como mostrado na Figura 11 e 12, a cepa *P. acidipropionici* não consumiu por completo a glicose nas 76 h de fermentação. A produção de AP se mostrou lenta até as 18 h e depois cresceu exponencialmente, já a produção de AA começou crescente e foi se estabilizar a partir das 48 horas. A xilose parou de ser consumida e se estabilizou depois do segundo pulso, enquanto a glicose continuou a ser consumida. Arabinose não apresentou concentrações significativas, AL não foi produzido e AS foi produzido em baixas concentrações.

Figura 13 - Perfis de $\ln(X/X_0)$ de *P. acidipropionici* em biorreator, a 32 °C por 76 h, em pH $6,8 \pm 0,2$ mantido com NaOH 4M. Ajuste linear (- -).



Fonte: Autora (2023).

A figura 13 mostra que a fase exponencial de crescimento acabou antes do pulso 2, e depois entrou na fase estacionária. Comparando a Figura 13 com as Figuras 11 e 12 é possível observar que mesmo a *P. acidipropionici* atingindo a fase estacionária a produção de AP continuou crescente, diferente do observando em Parizzi et al., 2012, onde a produção de AP se estabilizou junto com o crescimento microbiano.

Além disso, Figura 13 mostra uma velocidade específica máxima de crescimento de $\mu_x = 0,06 \text{ h}^{-1}$ para *P. acidipropionici* utilizando bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como fonte de carbono. Antes do pulso 1, atingiu um $\mu_x = 0,098 \text{ h}^{-1}$, e a taxa de crescimento foi diminuindo com o tempo, chegando a $0,07 \text{ h}^{-1}$ entre

os pulsos e $0,19 \text{ h}^{-1}$ depois do pulso 2. Comparando os resultados com o obtido utilizando glicose como fonte de carbono (Figura 10), temos que a fermentação com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado alcançou uma velocidade específica maior de crescimento da cepa de *P. acidipropionici* dentro do período de 24 h. Coral et al., 2008, encontrou um $\mu_{x_{max}}$ igual ($0,06 \text{ h}^{-1}$) para o melaço de cana-de-açúcar utilizando a mesma cepa *P. acidipropionici*.

Com base nos dados obtidos na fermentação e nos gráficos acima temos um fator de conversão de substrato em produto ($Y_{\frac{p}{s}}$) igual à $0,34 \text{ gP/gS}$, uma produtividade volumétrica global (Q_p) de $0,07 \text{ h}^{-1}$, um fator de conversão de substratos em células ($Y_{\frac{x}{s}}$) igual à $0,21 \text{ gX/gS}$, uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x_{max}}$) de $0,098 \text{ h}^{-1}$ antes do pulso 1, $0,07 \text{ h}^{-1}$ entres os pulsos 1 e 2, $0,019 \text{ h}^{-1}$ depois do pulso 2 e um rendimento de 61,8%.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos da fermentação de AP por *P. acidipropionici* em bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, a 32°C por 76 h de processo

Fator de conversão	Produtividade volumétrica global	Velocidade específica máxima de crescimento	Rendimento AP
--------------------	----------------------------------	---	---------------

$$Y_{\frac{p}{s}} = 0,34 \text{ gP/gS}$$

$$Q_p = 0,07 \text{ gP L}^{-1}\text{h}^{-1} \quad \mu_{x_{max}total} = 0,06 \text{ h}^{-1} \quad n = 61,8\%$$

$$Y_{\frac{x}{s}} = 0,21 \text{ gX/gS}$$

Fonte: Autora (2023).

Comparando os resultados obtidos com os resultados da Tabela 2, temos que a fermentação alcançou uma produtividade semelhante a produtividade de uma batelada alimentada com melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono (CORAL et al., 2008). Além disso, a produtividade ficou consideravelmente menor em relação à fermentações de batelada alimentada utilizando fontes de carbono simples como glicose e glicerol (HIMMI et al., 2000; ZANG E YANG, 2009; ZHU et al., 2012). Zhu, 2012 realizou uma fermentação em batelada alimentada utilizando a mesma cepa e o mesmo substrato desse estudo, porém atingiu uma produtividade 5 vezes maior.

5 CONCLUSÃO

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a produção de AP utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como substrato em uma estratégia de fermentação em batelada alimentada. Com os resultados obtidos foi possível observar que o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado pode ser utilizado como substrato, porém estudos futuros são necessários para aprimorar o processo de produção deste ácido.

A cinética de crescimento microbiano obteve uma velocidade específica de crescimento em glicose de $\mu_x = 0,086 \text{ h}^{-1}$, que é condizente com valores encontrados na literatura. Porém, quando em meio hidrolisado, a velocidade decaiu para $\mu_x = 0,06 \text{ h}^{-1}$.

O pré-tratamento e a hidrólise garantiram uma concentração de 59,4 g/L de glicose no hidrolisado, com um rendimento de glicose por grama de biomassa de 0,47 gG gB⁻¹. Quando comparado com dados da literatura, o rendimento da hidrólise é consideravelmente maior.

A cepa *P. acidipropionici* durante 76 h de fermentação alcançou apenas uma concentração final de AP de 8,7 g/L e uma produtividade volumétrica de 0,07 h⁻¹, consideravelmente abaixo do encontrado na literatura e em outros estudos com a mesma biomassa lignocelulósica.

REFERÊNCIAS

- AGBOR, V. L., et al. **Biomassa pretreatment: Fundamentals toward application.** Biotechnology Advances, 2011.
- AHMADI, N.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MORTAZAVIAN, A. M. **An overview of biotechnological production of propionic acid: from upstream to downstream processes.** Electron J Biotechnol, 2017.
- ALI, R. et al. **Propionic acid production from food waste in batch reactors: Effect of pH, types of inoculum, and thermal pre-treatment.** Bioresource Technology, 2021.
- ALMEIDA, J.L. **Processo de recuperação de leveduras ou processo Melle Boinot.** In: Semana da Fermentação Alcoólica, Piracicaba, SP, 1960.
- Alvarez Gomez, P. A. **Simulação de diferentes alternativas de arranjo de uma unidade de fermentação piloto móvel para produção de etanol.** Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, SP, IBICT, 2011.
- ALVIRA P.; et al. **Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review.** Bioresource Technology, 2010.
- AMMAR, E.M.; JIN Y.; WANG, Z.; YANG S-T. **Metabolic engineering of *Propionibacterium freudenreichii*: effect of expressing phosphoenolpyruvate carboxylase on propionic acid production.** Appl Microbiol Biotechnol, 2014.
- ATASOY, M.; CETECIOGLU, Z. **Bioaugmentation as a strategy for tailor-made volatile fatty acid production.** J. Environ. Manag, 2021.
- LIU, L.; ZHUGE, X.; SHIN, H.D.; CHEN, R.R.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. **Improved production of propionic acid in *Propionibacterium jensenii* via combinational overexpression of glycerol dehydrogenase and malate dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*.** Appl. Environ. Microbiol, 2015.
- ANASTASIOU, R. *et al.* **Changes in protein synthesis during thermal adaptation of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*.** Internat. J. Food Microbiol, 2006.
- ASSUMPÇÃO, S. M. N. **Pré-Tratamento Químico Combinado do Bagaço da Cana Visando a Produção de Etanol de Segunda Geração.** Universidade Federal da Bahia UFBA, BA, Escola Politécnica, 2015.
- AYAN, E.; BAYLAN, N.; SUHEYLA, C. **Chemical engineering research and design optimization of reactive extraction of propionic acid with ionic liquids using Central composite design.** Chem Eng Res Des, 2020.

BAI, L.; HU, H.; XU, J. **Influences of configuration and molecular weight of hemicelluloses on their paper-strengthening effects.** Carbohydrate Polymers, Barking, 2012.

BALAT, M. **A production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review.** Energy Conversion and Management, 2011.

BARBIRATO, F.; CHEDAILLE, D.; BORIES, A. **Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrate.** Appl Microbiol Biotechnol. 1997.

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada.** Universidade Federal de Uberlândia UFU, MG, 2008.

BOYAVAL, P.; CORRE, C.; MADEC, M. **Propionic acid production in a membrane bioreactor.** Enzyme Microb. Technol, 1994.

BURGI, M. **Produção do bagaço de cana-de-açúcar auto hidrolisado e avaliação do seu valor nutritivo, para ruminantes.** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz. 1985. p. 61.

CALZADO, F. **Análise comparativa do mecanismo de secreção de proteínas heterólogas em Aspergillus nidulans: Comparative analysis of the heterologous protein secretion in Aspergillus nidulans.** Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, SP, Instituto de Biologia, 2017.

CANDIDO, R. G.; GODOY, G. G.; GONÇALVES, A. R. **Study of Sugarcane Bagasse Pretreatment with Sulfuric Acid as a Step of Cellulose Obtaining.** World Academy of Science, Engineering and Technology, 2012.

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, 1988.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua.** In: Schmidell, Willibaldo et al. (coord). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher, 2001.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação descontínua.** In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher,, 2001.

CHATUVERDI, V.; VERMA, P. **An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products.** 3 Biotech, 2013.

CHEN, C.; WEN, D.; WANG, J. **Cellular surface characteristics of Saccharomyces cerevisiae before and after Ag(I) biosorption.** Bioresource Technology, 2014.

CHOI, C. H.; MATHEWS, A. P. **Fermentation metabolism and kinetics in the production of organic acids by *Propionibacterium acidipropionici***. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1994.

COLAÇO, C.; SEN, S.; THANGEVALU, M.; PINDER, S.; ROSER, B. **Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology**. Biotechnol, 1992.

CORAL, JEFFERSON. **Propionic acid production by propionibacterium sp. using low-cost carbon sources in submerged fermentation**. Université de Provence, 2008.

COUTINHO, C. et al. **Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains**. J. Biotechnol, 1988.

CRESPO, J. P. S. G.; MOURA, M. J.; ALMEIDA, J. S.; CARRONDO, M. J. T. **Ultrafiltration membrane cell recycle for continuous culture of *Propionibacterium***. Journal of Membrane Science, 1991.

CRUZ, M. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***. Universidade Federal de Uberlândia UFU, MG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. 2019.

DAWSON, L.; BOOPATHY, R. **Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification**. BioResources, 2008.

ELBEIN, A.D. et al. **New insights on trehalose: a multifunctional molecule**. Glycobiology, 2003.

EMDE, R.; SCHINK, B. **Enhanced propionate formation by *Propionibacterium freudenreichii* spp. *freudenreichii* in a three-electrode amperometric culture system**. Applied and Environmental Microbiology, 1990.

FARHADI, S.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MASHAYEKH, M. et al. **Production of propionic acid in a fermented dairy beverage**. Int J Dairy Technol, 2013.

FENG, X.; CHEN, F.; XU, H.; WU, B.; LI, H.; LI, S.; OUYANG, P. **Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor**. Bioresour Technol, 2011.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood, chemistry, ultrastructure, reactions**. New York : Waster & Grugter, 1984.

FUKUMOTO, J.,; OKADA, S.; **Studies on bacterial amylase, Amylase types of *Bacillus subtilis* species**. J. Ferment. Technol, 1963.

GIBSON, L. J. **The hierarchical structure and mechanics of plant materials**. Journal of the Royal Society Interface, 2012.

GONZALEZ-GARCIA, R. A.; MCCUBBIN, T.; NAVONE, L. et al. **Microbial propionic acid production**. Fermentation, 2017.

GOSWAMI, V.; SRIVASTAVA, A. K. **Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici***. Bioch. Eng. Journal, 2000.

GU, Z.; GLATZ, B. A.; GLATZ, C. E. **Effects of propionic acid on propionibacteria fermentation**. Enz. Microbial. Technol, 1998.

GUALBERTO, D. S. P. **Rendimentos da hidrólise enzimática e fermentação alcoólica de capim-elefante, capim-andropogon, capim-mombaça e bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol de segunda geração**. Universidade Federal de Viçosa UFV, MG, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2013.

HABIBI, YOUSSEF & LUCIA, LUCIAN & ROJAS, ORLANDO. **Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications**. Chemical reviews, 2010.

HANNIBAL, LUCIANA et al. **Transcellular transport of cobalamin in aortic endothelial cells**. FASEB Journal, 2018.

HERRMANN, WOLFGANG; GEISEL, JÜRGEN. **Vegetarian lifestyle and monitoring of vitamin B-12 status**. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2002.

HIMMI, E. H. et al. **Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii***. Appl. Microbiol. Biotechnol, 2000.

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, 2000.

HOFFMAM, Z. B.; SOARES, L. B.; MORAIS, E. R.; SOUZA, J. M.; ANDRADE, A. L. D.; JESUS, C. D. F.; MARTINS, B.; BONOMI, A.; RULLER, R.; WARD, R. J.; IENCZAK, J. L. **Evolutionary engineering and chemical mutagenesis of *Propionibacterium acidipropionici* for improved propionic acid production from sugarcane-derived saccharides**. Process Biochemistry, 2023.

HSU, S-T.; YANG, S-T. **Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: Effects of pH**. Biotechnol. Bioeng, 1991.

ITURRIAGA, G.; SUAREZ, R.; NOVA-FRANCO, B. **Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling**. Int. J. Mol. Sci, 2009.

JOHNS, A. T. **The mechanism of propionic acid formation by propionibacteria**. J. Gen. Microbiol, 1951.

KAREN CRISTINA COLLOGRAI; ALINE CARVALHO DA COSTA; JACIANE LUTZ LENCZAK. **Fermentation strategies to improve propionic acid production with propionibacterium ssp.: a review**, Critical Reviews in Biotechnology, 2022.

KESHAV, A.; WASEWAR, K. L.; CHAND, S. **Extraction of propionic acid with tri-n-octyl amine in different diluents**. Separation and Purification Technology, 2008.
KUMAR, P.; BARRET, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. **Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass of eficiente hydrolysis and biofuel production**. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2009.

LEE, I. H.; FREDRICKSON, A. G.; TSUCHYA, H. M. **Diauxic growth of *Propionibacterium shermanii***. Applied Microbiology, 1974.

LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. **Control of fed-batch fermentations**. Biotechnology Advances, 1999.

LESSMANN, W.F.; **Estudo do processo descontínuo alimentado para a produção de amiloglicosidase por *Aspergillus awarnori* NRRL3112 para concentrações de polissacarídeo de 40 e 80 g/L**. Escola Politécnica - USP, SP, 1993.

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

LIMA, A.O.S.; QUECINE, M.C.; FUNGARO, M.H.P.; ANDREOTE, F.D.; MACCHERONI JR. W.; ARAÚJO, W.L.; SILVA-FILHO, M.C.; PIZZIRANIKLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Molecular characterization of a β -1,4- endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain**. Applied Microbiology Biotechnology, 2005

LIU, Z.; GE, Y.; XU, J.; GAO, C.; MA, C.; XU, P. **Efficient production of propionic acid through high density culture with recycling cells of *Propionibacterium acidipropionici***. Bioresour. Technol, 2016.

LIU, Y.; ZHANG, Y.G.; ZHANG, R.B.; ZHANG, F.; ZHU, J. **Glycerol/Glucose Co-Fermentation: One More Proficient Process to Produce Propionic Acid by *Propionibacterium acidipropionici***. Curr Microbiol, 2011.

LIU, Z., et al. **Efficient utilization of hemicellulose hydrolysate for propionic acid production using *Propionibacterium acidipropionici***. Bioresour. Technol, 2012.

MARQUES, G. et al. **Acetylated heteroxylan from *Agave sisalana* and its behavior in alkaline pulping and TCF/ECF bleaching**. Carbohydrate Polymers, 2010.

LIU, L.; ZHUGE, X.; SHIN, H.D.; CHEN, R.R.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. **Improved production of propionic acid in *Propionibacterium jensenii* via combinational overexpression of glycerol dehydrogenase and malate dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae***. Appl. Environ. Microbiol, 2015.

MARSHALL, D. L.; ODAME-DARKWAH, J. K. **Influence of pH and NaCl on growth and survival of *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, *Bacillus purnilus* and *Saccharomyces cerevisiae* in broth media.** Lebensm. Wiss. Technol, 1995.

MARTÍNEZ-CAMPOS R.; de la TORRE M. **Production of propionate by fedbatch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose.** Biotechnol Lett, 2002.

MATINEZ-CAMPOS, R.; TORRE, M. **Production of propionate by fed-batch fermentation of *Propionibacterium acidipropionici* using mixed feed of lactate and glucose.** Biotechnology Letters, 2002.

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JUNIOR, G. B. **Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita.** Scientia Agricola, Piracicaba, SP, 2001.

MORAIS, A. P. S. da. **Estudo do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e caracterização físico-química.** Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu, SP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2010.

NANBA, A.; NUKADA, R.; NAGAI, S. **Inhibition by acetic and propionic acids of the growth of *Propionibacterium shermanii*.** J. Ferm. Technol, 1983.

NEVALAINEN, K. M.; TE'O, V. S.; BERGQUIST, P. L. **Heterologous protein expression in filamentous fungi.** Trends in Biotechnology, 2005. p. 468-74.

OGEDA, T.L.; PETRI, D. F.S. **Hidrólise enzimática de biomassa.** Química Nova, 2010.

PÄÄKKÖ et al., **Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels.** Biomacromolecules, p. 1934-1941, 2007.

PACHECO, T. F. **Fermentação Alcoólica com Leveduras de Características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente.** Universidade Federal de Uberlândia UFU, MG, 2010.

PAIK, H. D.; GLATZ, B. A. **Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici*.** Appl. Microbiol. Biotechnol, 1994.

PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. **Advances in microbial amylases.** *Biotechnol Appl Biochem*, 2000.

Parizzi, L. P.; Grassi, M. C. B.; Llerena, L. A.; Carazzolle, M. F.; Queiroz, V. L.; Lunardi, I.; Zeidler, A. F.; Teixeira, P. J. P. L.; Mieczkowski, P.; Rincones, J.; Pereira, G. A. G. **The genome sequence of *Propionibacterium acidipropionici* provides insights into its biotechnological and industrial potential.** BMC Genom, 2012.

PAUL, M.J.; PRIMAVESI, L.F.; JHURREEA, D.; ZHANG, Y. **Trehalose metabolism and signaling**. Annu .Rev. Plant Biol, 2008.

PIWOWAREK, K.; LIPINSKA, E.; HAC-SZYMANCZUK, E. et. al. **Propionibacterium spp.-source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry**. Appl Microbiol Biotechnol, 2018.

PIWOWAREK, KAMIL et al. **Optimization of propionic acid production in apple pomace extract with Propionibacterium freudenreichii**. Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2019.

PLAYNE, M. J., Propionic and Butyric Acids. in MOO-YOUNG, M. **Comprehensive Biotechnology**. Great Britain:Pergamon Press, 1985.

PORTO, L. M. **Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série**. Universidade Estadual de Campinas, SP, Faculdade de Engenharia Química, 2005.

QUESADA-CHANTO, A.; COSTA, A.; SILVEIRA, J.P.C.L., SCHOROEDER, M. M.; SCHMID-MEYER, A. G.; JONAS, R. **Influence of different vitamin-nitrogen sources on cell growth and propionic acid production from sucrose by Propionibacterium shermanii**. Acta Biotechnol, 1998.

RABELO, S.C. et al. **Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide**. Biomass and Bioenergy, 2011.

RANAELI, V. et al. **Propionic Acid: Method of Production, Current State and Perspectives**. Food technology and biotechnology, 2020.

RETIEF, F. P.; GOTTLIEB, C. W.; HERBERT, V. **Mechanism of vitamin B12 uptake by erythrocytes**. The Journal of clinical investigation, 1966.

RICKERT, D. A.; GLATZ, C. E.; GLATZ, B. A. **Improved organic acid production by calcium alginate-immobilized Propionibacterium**. Enzyme and Microbial Technology, 1998.

ROSER B. J. **Trehalose, a new approach to premium died foods**. Trends Food Sci. Technol, 1991.

RUHAL, R.; AGGARWAL, S.; CHOUDHURY, B. **Suitability of crude glycerol obtained from biodiesel waste for the production of trehalose and propionic acid**. Green Chem, 2011.

SANTOS, F.A et al. **Potencial da palha de cana-de-açúcar para a produção de etanol**. Química Nova. Minas Gerais, 2012.

SARKAR, N. et al. **Bioethanol production from agricultural wastes: an overview**. Renewable Energy, 2012.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R.; **Biorreatores e Processos Fermentativos**. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001.

SESHADRI, N.; MUKHOPADHYAY, S. N. **Influence of environmental parameters on propionic acid upstream bioprocessing by *Propionibacterium acidipropionici***. J. Biotechnol, 1993.

SILVA M. M.; LINDON F. C. **Food preservatives - An over- view on applications and side effects**. Emir J Food Agric, 2016.

SILVA, A. P. **Avaliação da Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* a partir da Fração Hemicelulósica de Sorgo Sacarino Aplicando 73 Sistemas de Células Imobilizadas**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2019.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C. O.; ALSINA, L. S. **Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 2007.

SILVEIRA, LÍVIA HELENA CARRERA; REZENDE, ALBA VALÉRIA; VALE, AILTON TEIXEIRA DO. **Teor de umidade e densidade básica da madeira de nove espécies comerciais amazônicas**. Acta Amazonica, 2013.

SINGER, M.A.; LINDQUIST, S. **Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose**. Trends Biotech, 1998.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por linhagem de *S. Cerevisiae***. Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/IPT, SP, 2009.

STOWERS, CHRIS C.; COX, BRAD M.; RODRIGUEZ, BRANDON. **Development of an industrializable fermentation process for propionic acid production**. Society for Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014.

STRAND, Tor A. et al. **Cobalamin and folate status predicts mental development scores in North Indian children 12–18 mo of age**. The American Journal of Clinical Nutrition, 2013.

SUN, Y.; CHENG, J. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: a review**. BioResources Technology, 2002.

SUWANNAKHAM, S. **Metabolic engineering for enhanced propionic acid fermentation by *Propionibacterium acidipropionici***. Doctoral thesis – Ohio State University, Columbus - USA, 2005.

THEVELEIN, J. M. **Regulation of trehalose mobilization in fungi**. Microbiol, 1984.
TINGAUT, P.; ZIMMERMANN, T.; SEBEB, G. **Cellulose nanocrystals and microfibrillated cellulose as building blocks for the design of hierarchical functional materials**. Journal of Materials Chemistry, 2012.

TIWARI, S.P.; SRIVASTAVA, R.; SINGH, C.S.; SHUKLA, K.; SINGH, R.K.; SINGH, P.; SINGH, R.; SINGH, N.L.; SHARMA, R. **Amylases: An overview with special reference to alpha amylase.** Journal of Global Biosciences, 2015.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol.** Universidade Estadual de Campinas, SP, Faculdade de Engenharia Química, 2002.

TSOSKOUNOGIOU, M.; AYERIDES, G.; TRITPOULOU E. **The end of cheap oil: current status and prospects.** Energy Policy, 2008
VOROBEVA, L. I. **Propionibacterium.** Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 290.

WANDERLEY, M. C. A. **Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar em batelada alimentada para produção de etanol por *saccharomyces cerevisiae* UFPEDA 1238 em processos SHF.** Universidade Federal de Pernambuco UFPE, PE, Centro de Ciências Biológicas, 2012.

WOOD, H. G.; WERKMAN, C. H. **Mechanism of glucose dissimilation by the propionic acid bacteria.** Biochem. J, 1936.

WOSKOW, S. A.; GLATZ, B. A. **Propionic acid production by a propionic acid-tolerant strain of *Propionibacterium acidipropionici* in batch and semicontinuous fermentation.** Appl. Environmental Microb, 1991.

YANG, H.; WANG, Z.; LIN, M.; YANG, S-T. **Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis.** Bioresour Technol, 2017.

YANG, H.; WANG, Z.; LIN, M.; YANG, S.T. **Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis.** Bioresour. Technol, 2018.

ZHANG, A.; YANG, S-T.; **Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*.** Process Biochem, 2009.

ZHANG, A.; YANG, S.T. **Propionic acid production from glicerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*.** Process Biochem, 2009.

ZHENG, Y.; ZHONGLY, P.; ZHANG, R. **Overview of biomass pretreatment for cellulosic production.** International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 2009.

ZHU, L.; WEI, P.; CAI, J.; ZHU, X.; WANG, Z.; HUANG, L.; XU, Z. **Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant *Propionibacterium acidipropionici***. *Bioresource Technol*, 2012.