

Cinética da Produção de Vitamina B₁₂ e Ácido Propiônico por *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271

Ozair Souza⁽¹⁾, Andréa Roberta H. Campos⁽¹⁾, Haroldo Hiss⁽²⁾, Sandra Aparecida Furlan⁽¹⁾

(1) Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, Departamento de Química Industrial
Caixa Postal 246, 89237-700, Joinville - SC. E-mail: osouza@univille.edu.br

(2) Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, 05503-900, São Paulo - SP

RESUMO

Propionibacterium freudenreichii DSM 20271 foi cultivada em processo fermentativo descontínuo anaeróbico, em meio de cultura contendo água de maceração de milho em substituição ao extrato de levedura, com o objetivo da determinação dos parâmetros cinéticos da produção de cianocobalamina (B₁₂) e de ácido propiônico (P). O cultivo foi realizado em fermentador Biostat MD B.Braun com volume de trabalho de 1,5L, frequência de agitação de 150 min⁻¹, temperatura 37 °C e pH 6,5. Os valores dos fatores de conversão $Y_{B_{12}/X}$ e $Y_{P/S}$ e das produtividades em B₁₂ e em ácido propiônico encontrados foram de 0,09 mg.g⁻¹, 0,49 g.g⁻¹, 0,008 mg.L⁻¹.h⁻¹ e 0,23 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente.

INTRODUÇÃO

A vitamina B₁₂, ou cianocobalamina, e o ácido propiônico são produtos largamente utilizados na indústria química. A vitamina B₁₂ é utilizada, principalmente, como complemento alimentar em rações para animais e aves, e o ácido propiônico, como matéria prima das indústrias de herbicidas, de polímeros e de alimentos. O ácido propiônico tem ganhado grande importância na preservação de alimentos devido a sua potencialidade na inibição do crescimento de fungos e de bactérias causadores da podridão (FLORENT, 1979; SAMEL, 1993).

Atualmente, a produção industrial de vitamina B₁₂ é feita, exclusivamente, por processos microbiológicos. De acordo com YE e colaboradores (1996), durante as duas últimas décadas, vários microrganismos têm sido investigados e apontados como bons produtores de vitamina B₁₂, incluindo-se entre eles as propionibactérias.

Em relação ao ácido propiônico, SAMEL (1993) aponta a indústria petroquímica como a grande responsável pela maior parte de sua produção industrial utilizando, quase que exclusivamente, os processos de carbonilação do etileno, oxidação do propanal e direta oxidação de hidrocarbonetos. No entanto, o emprego de processos microbiológicos para a sua produção comercial vêm sendo vistos como uma alternativa economicamente atraente pois podem ser conduzidos a partir de recursos renováveis.

As bactérias do gênero *Propionibacterium* têm sido indicadas como ideais para a produção simultânea de vitamina B₁₂ e ácido propiônico, através de diferentes tipos de condução de processos fermentativos. As espécies *P. shermanii* e *P. freudenreichii* são as mais utilizadas. A espécie *P. freudenreichii* tem como destaque a possibilidade de sintetizar biologicamente a

vitamina B₁₂ sem a necessidade do fornecimento do precursor 5,6-dimetilbenzimidazol (DBI), essencial para a maioria dos outros microrganismos produtores de B₁₂ (FLORENT, 1986).

Enquanto o ácido propiônico produzido é excretado para o meio de cultivo, a produção de vitamina B₁₂ é intracelular. A cinética de formação de ácido propiônico por propionibactérias já é bem conhecida. No entanto, em relação à formação de vitamina B₁₂, apenas valores finais de sua concentração têm sido publicados.

Em 1998, através de um convênio de acordo bilateral Brasil-Alemanha, a UNIVILLE, a GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung) de Braunschweig e a Fachhochschule Hamburg (Universidade de Ciências Aplicadas de Hamburgo), com o apoio do CNPq, iniciaram um projeto de pesquisa visando o estudo da produção de vitamina B₁₂ e de ácido propiônico por *P. freudenreichii* DSM 20271.

Este trabalho é parte integrante desse projeto e teve como objetivo avaliar o comportamento cinético do processo fermentativo descontínuo de modo a contribuir com o desenvolvimento de processos fermentativos alternativos que conduzam à minimização de custos e maximização da produtividade do processo.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo – *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271, recebido na forma liofilizada e mantido em cultivo de profundidade em tubos de ensaio a 37°C, durante 72 horas, com posterior acondicionamento em refrigerador a 4 °C. Mensalmente, o microrganismo foi reativado, através do cultivo em meio líquido e, a partir desta cultura, repiques semanais em novo meio líquido foram realizados visando o seu uso corrente.

Meios de cultivo - para a manutenção e reativação do microrganismo, a seguinte composição de meio de cultivo foi empregada (em g.L⁻¹): glicose, 20; extrato de levedura, 10; KH₂PO₄, 2; (NH₄)₂HPO₄, 4; FeSO₄.7H₂O, 0,005; MnSO₄.H₂O, 0,0025; MgSO₄.7H₂O, 0,010; CaCl₂.6H₂O, 0,010; NaCl, 0,010; CoCl₂.6H₂O, 0,010; e ágar, 15, para o caso de meio sólido. Para a manutenção do microrganismo em cultura líquida, produção de inóculo e ensaios de fermentação, foram utilizados os mesmos constituintes descritos anteriormente, com exceção do ágar e com a substituição do extrato de levedura por água de maceração de milho (milhocina) na concentração de 50g.L⁻¹. A milhocina foi diluída para a concentração desejada, autoclavada separadamente na temperatura de 120 °C, durante 20 minutos, e adicionada ao restante do meio de cultivo, esterilizado nas mesmas condições, após centrifugação asséptica (14000g, durante 15min em centrífuga HERAEUS Instruments, modelo D37520 Biofuge primo para remoção dos sólidos precipitados.

Ensaio de fermentação – foi empregado o cultivo em batelada. O processo foi conduzido em fermentador de bancada BIostat MD B.Braun com cuba de 2 litros, acoplado ao controlador de processos UBICON. A temperatura foi controlada em 37 °C e o pH em 6,5 através da adição automática de NaOH 6N. A frequência de agitação empregada foi de 150 min⁻¹. O processo foi iniciado em anaerobiose, após a passagem de gás nitrogênio pelo meio de cultura durante 10 minutos. O volume de trabalho foi de 1,5 litros sendo que o inóculo constitui 10% desse volume. Como inóculo empregou-se uma suspensão microbiana obtida após cultivo em frascos Erlenmeyers de 500 ml, durante 36 horas, a 37 °C, utilizando meio de cultura de mesma composição utilizada no fermentador. O processo foi repetido oito vezes, nas mesmas condições experimentais, e interrompido nos seguintes tempos de cultivo: ensaio 1, 12 horas; ensaio 2, 18 horas; ensaio 3, 24 horas; ensaio 4, 30 horas; ensaio 5, 36 horas; ensaio 6, 42 horas; ensaio 7, 48

horas; ensaio 8, 54 horas. O objetivo deste procedimento foi o de fornecer o volume de amostra necessário para a análise da vitamina B₁₂.

Métodos analíticos – todas as análises foram realizadas em duplicata. A determinação da concentração celular foi feita por turbidimetria utilizando-se a curva de calibração previamente determinada. Para as determinações da concentração de glicose residual em cada experimento, 2ml de amostra foi centrifugada a 14.000g (frequência de agitação de 12.000 min⁻¹), durante 10 minutos em centrífuga HERAEUS Instruments, modelo D37520 Biofuge primo, e o sobrenadante analisado em cromatografia líquida (HPLC Merck Hitachi) em coluna ORH-801 Interaction Chromatography, utilizando H₂SO₄ 0,01N como fase móvel com fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

A determinação da concentração de vitamina B₁₂ foi realizada de acordo com o método proposto por QUESADA-CHANTO e colaboradores (1998), com base no método químico descrito por RUDKING & TAYLOR (1952). O método consiste na complexação e conversão da cobalamina intracelular em cianocobalamina, na presença de NaCN, seguido do rompimento celular através do aquecimento da mistura a 120 °C, durante 15 minutos, com posterior extração da vitamina por solventes orgânicos e água. Após extração com água, foram pipetados dois volumes de 5 mL cada um e adicionado 1mL de solução de KCN 2,5% sobre o primeiro volume (A) e 1 mL de KH₂PO₄ 12,5% sobre o segundo volume (B). Decorridas seis horas de repouso, procedeu-se as leituras da absorvância dos volumes A e B em espectrofotômetro LKB, em comprimento de onda de 582 nm. O cálculo da concentração de vitamina B₁₂, expresso em mg/L, foi feito utilizando a equação dada por FISHER (1953).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os perfis cinéticos obtidos nos experimentos de fermentação.

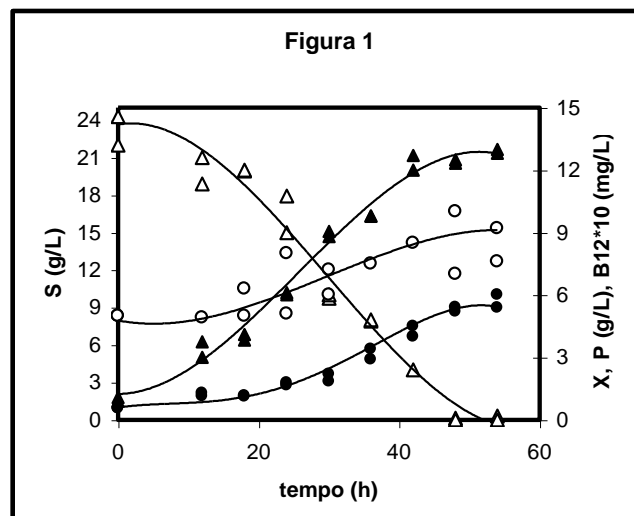


Figura 1: Perfis das concentrações de glicose (ΔS), células (●X), ácido propiônico (▲P) e vitamina B₁₂ (○ B12) em função do tempo de cultivo.

A Figura 2 apresenta os valores das velocidades específicas em função do tempo de cultivo e na Tabela 1 são mostrados os valores dos fatores de conversão global, produtividades, velocidades específicas máximas de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$), de consumo de substrato ($\mu_{S, m\acute{a}x}$) de formação de ácido propiônico ($\mu_{P, m\acute{a}x}$) e de formação de vitamina B₁₂ ($\mu_{B12, m\acute{a}x}$).

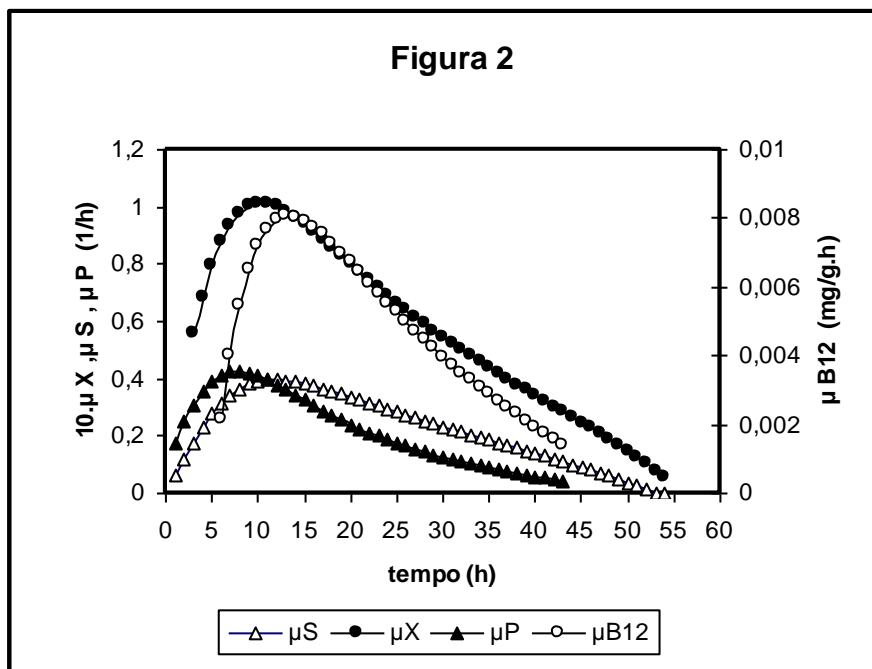


Figura 2 : Velocidades específicas de crescimento celular ($\bullet\mu$), de consumo de substrato ($\Delta\mu_S$), de formação de ácido propiônico ($\blacktriangle\mu_P$) e de formação de vitamina B₁₂ ($\circ\mu_{B12}$) em função do tempo de cultivo em processo fermentativo descontínuo.

Tabela 1 : Parâmetros cinéticos do cultivo de *Propionibacterium freundenreichii* DSM 20271, conduzidos a 37 °C e pH 6,5.

Parâmetro	valor calculado
Fator de conversão global de substrato em células ($Y_{X/S}$)	0,20 g/g
Fator de conversão global de substrato em ácido propiônico ($Y_{P/S}$)	0,50 g/g
Fator de conversão global de células em vitamina B ₁₂ ($Y_{B12/X}$)	0,09 mg/g
Produtividade total em biomassa (Pr_X)	0,09 g/L.h
Produtividade total em ácido propiônico (Pr_P)	0,23 g/L.h
Produtividade total em vitamina B ₁₂ (Pr_{B12})	0,008 mg/L.h
Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{X,m\acute{a}x}$)	0,10 h ⁻¹
Velocidade específica máxima de consumo de substrato ($\mu_{S,m\acute{a}x}$)	0,43 h ⁻¹
Velocidade específica máxima de formação de ácido propiônico ($\mu_{P,m\acute{a}x}$)	0,39 h ⁻¹
Velocidade específica máxima de formação de vitamina B ₁₂ ($\mu_{B12,m\acute{a}x}$)	0,008 mg/g.h

Nas condições de cultivo realizadas, o valor de $\mu_{\text{máx}}=0,10 \text{ h}^{-1}$ obtido (Tabela 1) foi bem próximo ao valor observado por outros autores trabalhando com outra linhagem de *Propionibacterium freudenreichii*. Cultivando a linhagem IFO 12424 em processo anaeróbio, única linhagem diferente da DSM 20271 encontrada na literatura, YE e colaboradores (1996) obtiveram o valor de $\mu_{\text{máx}}$ igual a $0,09 \text{ h}^{-1}$. Em outro trabalho, onde foi empregado a aeração periódica, os mesmos autores (YE *et al.*, 1999), encontraram os valores de $\mu_{\text{máx}}=0,11 \text{ h}^{-1}$ para o período aeróbio e $\mu_{\text{máx}}=0,07 \text{ h}^{-1}$ para o período em que a anaerobiose foi aplicada.

Trabalhando com outras espécies de propionibactérias, também em anaerobiose, valores maiores de $\mu_{\text{máx}}$ foram encontrados. NAMBA e colaboradores (1983) e QUESADA-CHANTO e colaboradores (1998), encontraram para *P. shermanii* PZ-3 os respectivos valores de $0,167 \text{ h}^{-1}$ e $0,19 \text{ h}^{-1}$; BLANC & GOMA (1987), $0,11 \text{ h}^{-1}$ para *P. acidi propionici* ATCC 4875 e OBAYA e colaboradores (1992), $0,11 \text{ h}^{-1}$ para *P. acidi propionici* PP-1.

Não foram encontrados na literatura valores relativos à μ_{P} e à $\mu_{\text{B}_{12}}$ de *Propionibacterium freudenreichii* para comparação com os valores aqui obtidos. Trabalhando com outras espécies de propionibactéria, BLANC & GOMA (1987) apresentam o valor de $\mu_{\text{P,máx}}$ igual a $0,11 \text{ h}^{-1}$ para *P. acidi propionici* ATCC 4875; OBAYA e colaboradores (1992), o valor de $0,267 \text{ h}^{-1}$ para *P. acidi propionici* PP-1 e GU e colaboradores (1999), o valor de $0,07 \text{ h}^{-1}$ para *P. thoenii*. Todos esses valores ficaram abaixo do valor obtido neste trabalho com *P. freudenreichii* DSM 20271 ($\mu_{\text{P,máx}} = 0,38 \text{ h}^{-1}$).

A produtividade em ácido propiônico alcançada neste trabalho ($\text{Pr}_{\text{P}}=0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi superior aos valores obtidos por YE e colaboradores (1996, $\text{Pr}_{\text{P}}=0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e por QUESADA-CHANTO e colaboradores (1998, $\text{Pr}_{\text{P}}=0,17 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). No entanto, ficou abaixo dos valores alcançados por BLANC & GOMA (1987, $\text{Pr}_{\text{P}}=0,35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), OZADALI e colaboradores (1995, $\text{Pr}_{\text{P}}=0,24 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e GOSWAMI & SRIVASTAVA (2001, $\text{Pr}_{\text{P}}=0,25 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), que utilizaram outra espécie de propionibactéria. Em termos de rendimento desse produto, verificamos que *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271 ($Y_{\text{P/S}}=0,50 \text{ g.g}^{-1}$) apresentou valor bem superior a todos aqueles observados pelos autores anteriormente mencionados, mostrando assim a potencialidade dessa linhagem para a produção de ácido propiônico.

Em relação à produção de vitamina B_{12} , mesmo tipo de comportamento não foi verificado. No nosso caso, tanto a produtividade como o rendimento $Y_{\text{B}_{12}/\text{X}}$ foram inferiores à maioria dos valores observados nos trabalhos mencionados. Exceção ao trabalho de QUESADA-CHANTO e colaboradores (1998) que trabalharam com a mesma linhagem só que utilizando extrato de levedura ao invés da milhocina empregada neste trabalho.

CONCLUSÃO

Os parâmetros produtivos relativos à formação de ácido propiônico obtidos neste trabalho ($\mu_{\text{P,máx}}=0,38 \text{ h}^{-1}$, $\text{Pr}_{\text{P}}=0,23 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $Y_{\text{P/S}}=0,50 \text{ g.g}^{-1}$), foram superiores aos valores descritos por outros autores, utilizando diferentes espécies de propionibactérias, comprovando a potencialidade da linhagem *Propionibacterium freudenreichii* DSM 20271 para a produção de ácido propiônico. No entanto, o baixo rendimento em relação à formação da vitamina B_{12} ($Y_{\text{B}_{12}/\text{X}}=0,09 \text{ mg.g}^{-1}$) e a sua baixa produtividade ($\text{Pr}_{\text{B}_{12}}=0,09 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indicam a necessidade de novos estudos visando o incremento desse valores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blanc, P., Goma, G. (1987). Propionic acid fermentation: improvement of performances by coupling continuous fermentation and ultrafiltration. *Bioprocess engineering*, v.2, p. 137-139.
- Cummins, C., Johnson, J. L. (1992). *The procarotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*. 2 ed. New York: Springer-Verlag, vol.1, p. 834-849.
- Florent, J., Ninet, L. (1979). Vitamin B₁₂. *Microbial Technology*, Academic Press, New York, p. 457-519,.
- Fisher, R.A. (1953). Rapid spectrophotometer determination of vitamina B₁₂ in microbial material. *Agricul. Food Chem.*, v.1, p. 951-953.
- Goswami, V., Srivastava, A.K. (2000). Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 121-128.
- Gu, Z., Richert, D.A., Glatz, A., Glatz, C.E. (1999). Feasibility of propionic acid production by extractive fermentation. *Lat*, v. 79, p. 137-148.
- Nanba, A., NUKADA, R., NAGAI, S. (1983). Inhibition by Acetic and Propionic Acids of the Growth of *Propionibacterium shermanii*. *Fermentation Technology*, v. 61, n. 6, p. 551-556.
- Obaya, M.C., Ramos, J., Eng,F., Villa, P., Valdés, E., Martínez, A., Gonzáles, J., Berovides, E., Williams, I., Chivas, M., Cuellar,A. (1992). Production of Propionic Acid by Microbiological Way. Part 1: Influence of the Initial Sugars and Product Concentrations. *Acta Biotechnology*, v. 12, n. 4, p. 269-276.
- Ozadali, F., Glatz, B.A., Glatz, C.E. (1996). Fed-batch fermentation with and without on-line extraction for propionic and acetic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 44, p. 710-716.
- Quesada-Chanto, A., Shimid-Meyer, A.C., Schoroeder, A.G., Carvalho-Jonas, M.F., Blanco, I., Jonas, R. (1998). Effect of oxygen supply on biomass, organic acids and vitamin B₁₂ production by *Propionibacterium shermanii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 14, p. 843-846.
- Rudkin, G.O., Taylor, R.J. (1952). Chemical Method for Determinig Vitamin B₁₂. *Analytic Chemistry*, v. 24, p. 1155-1156.
- Samel, U.-R. (1993). Propionic Acid and Derivatives. *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, v. 22, p. 223-238.
- SECEX – Secretaria de Comércio Exterior. Disponível no site:<www.cni.org.br>. Acesso em: 8 de novembro de 2002.
- Wódzki, R., Nowaczik, J., Hujawski, M. (2000). Separation of propionic and acetic acid by pertration in a multimembrane hibrid system. *Separation and Purification Technology*,v. 2, p.39-54.
- Ye, K., Shijo, M., Jin, S., Shimizu, K. (1996). Efficient Production of Vitamin B₁₂ from Propionic Acid bacteria under Periodic Variation of Dissolved Oxygen Concentration. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 82, n. 5, p. 484-491.
- Ye, K., Shijo, M., Miyano, K., Shimizu, K. (1999). Metabolic Pathway of *Propionibacterium* Growing with Oxygen: Enzymes ¹³C NMR Analysis, and Its Application for Vitamin B₁₂ Production with Periodic Fermentation. *Biotechnology Prog.*, v. 15, p. 201-207.