

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TRABALHO DE CONCLUSÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRODUÇÃO DE VITAMINA B12 POR CO-CULTIVO ENTRE *Propionibacterium
freudenreichii* E *Lactobacillus plantarum* UTILIZANDO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL DE SOJA COMO MEIO DE CULTURA

BRUNO ASCHIDAMINI PRANDI

Porto Alegre, 2018

BRUNO ASCHIDAMINI PRANDI

PRODUÇÃO DE VITAMINA B12 POR CO-CULTIVO ENTRE *Propionibacterium freudenreichii* E *Lactobacillus plantarum* UTILIZANDO RESIDUO AGROINDUSTRIAL DE SOJA COMO MEIO DE CULTURA

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção do grau de bacharel em Biotecnologia, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Comissão Examinadora:

Dra. Carla Matte

Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFRGS

Msc. Lovaine Duarte

Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFRGS

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFRGS

Porto Alegre, 2018

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo incentivo e apoio constantes durante toda minha formação.

Ao professor Marco Antônio Záchia Ayub por aceitar orientar este trabalho e prover todo o necessário para que ele fosse realizado, auxiliando sempre que necessário.

Ao Dener Acosta por todo apoio durante todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho.

A Dra. Carla Matte por todo auxílio esclarecendo as mais diversas dúvidas.

Aos amigos do laboratório 212 e 216 do ICTA pelo convívio e ajuda sempre que possível.

Ao CNPq pela bolsa provida e auxílio do projeto.

A minha família pelo incentivo e por sempre estar presente.

Aos guris por estarem sempre junto nesta caminhada.

A Natali Bertoglio por estar sempre presente.

“Enquanto eles capitalizam a realidade,
eu socializo os meus sonhos.”

Sérgio Vaz

RESUMO

B12 é um cofator enzimático produzido exclusivamente por microrganismos que age em diversas vias metabólicas e sua deficiência tem relação direta com problemas de síntese de DNA, anemia perniciosa e danos neurológicos. Ela atua no sistema homocisteína-metionina e sua falta leva a um acúmulo de homocisteína que é relacionado a diversas disfunções metabólicas. *Propionibacterium freudenreichii* é uma bactéria ácido-propionica Gram-positiva anaeróbica aerotolerante capaz de sintetizar a vitamina B12 por processos fermentativos e *Lactobacillus plantarum* é uma bactéria ácido-lática Gram-positiva produtora de ácido lático e não produtora de B12. São descritos na literatura efeitos positivos da associação entre bactérias ácido-láticas e propionicas e industrialmente esta associação é observada na indústria produtora de queijo. Este trabalho visou verificar os efeitos desta associação sobre a produção de vitamina B12 por *P. freudenreichii* com a utilização de um resíduo agroindustrial obtido do processo de isolamento de proteína de soja denominado LAPRS como meio de cultivo, esta abordagem de reuso de resíduos agroindustriais para a produção de metabolitos de valor comercial via processos fermentativos é uma crescente no meio acadêmico, levando em consideração neste caso específico que a produção industrial de vitamina B12 por microrganismos tem um auto custo proveniente dos meios de culturas empregados a utilização deste resíduo agroindustrial LAPRS torna-se economicamente viável. As etapas deste trabalho dividiram-se em cultivos com *P. freudenreichii* para a produção de vitamina B12 e *L. plantarum* para a produção de ácido lático e um co-cultivo onde foi feita uma associação entre *P. freudenreichii* e *L. plantarum* com o objetivo de aumentar a produção da vitamina por *P. freudenreichii*.

ABSTRACT

B12 is an enzymatic cofactor produced exclusively by microorganisms that acts in several metabolic pathways and its deficiency is directly related to problems of DNA synthesis, pernicious anemia and neurological damage. It acts on the homocysteine-methionine system and its lack leads to an accumulation of homocysteine that is related to several metabolic dysfunctions. *Propionibacterium freudenreichii* is an aerotolerant gram-positive anaerobic acid-propionic bacterium capable of synthesizing vitamin B12 by fermentative processes and *Lactobacillus plantarum* is a lactic acid lactic acid bacterium producing lactic acid and not producing B12. Positive effects of the association between acid-lactic and propionic bacteria are described in the literature and industrially this association is observed in the cheese industry. This work aimed to verify the effects of this association on the production of vitamin B12 by *P. freudenreichii* with the use of an agroindustry residue obtained from the isolation process of soy protein called LAPRS as a culture medium, this approach of reuse of agroindustry residues for production of metabolites of commercial value through fermentative processes is a growing trend in the academic world, taking into account in this specific case that the industrial production of vitamin B12 by microorganisms has a self-cost from the means of cultures used the use of this agroindustry residue LAPRS becomes economically viable. The stages of this work were divided into cultures with *P. freudenreichii* for the production of vitamin B12 and *L. plantarum* for the production of lactic acid and a co-cultivation where an association was made between *P. freudenreichii* and *L. plantarum* with the objective of increasing vitamin production by *P. freudenreichii*.

Key words: B12, *Propionibacterium freudenreichii*, *Lactobacillus plantarum*, co-culture, agroindustry residue

LISTA DE ABREVIACOES

ALA	Ácido Aminolevulinico
DMBI	Dimetilbenzoimidazol
PAB	Bactérias ácido-propionicas (<i>propionic-acid bacterium</i>)
LAB	Bactérias ácido-láticas (<i>acid-latic bacterium</i>)
GI	Gastrointestinal
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (<i>generally recognized as safe</i>)
LAPRS	Soro ácido liquido proteico de soja (<i>liquid acid protein residuo of soybean</i>)
DO	Densidade ótica
pH	Potencial de hidrogênio
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

1	Figura 1. Estrutura química da Vitamina B12 (cobalamina).....	13
2	Figura 2. Via aeróbica e anaeróbica: Representação da via anaeróbica e anaeróbica de produção da cobalamina, em destaque a diferente ordem de metilações e inserção do cobalto em cada via	16
3	Figura 3. LAPRS concentrado: (A) LAPRS concentrado pós autoclave; (B) LAPRS concentrado e centrifugado pronto para o uso.....	25
4	Figura 4. Pré-inoculo <i>P.shermanii</i> após 120 h de incubação.....	26
5	Figura 5. Preparo do co-cultivo <i>Propionibacterium freudenreichii</i> e <i>Lactobacillus Plantarum</i>	27
6	Figura 6. Quantificação de açúcares pelo método de Dubois.....	29
7	Gráfico <i>P. freudenreichii</i> A: Variação na composição de açúcares e produção de biomassa ao longo do tempo.	30
8	Gráfico <i>P. freudenreichii</i> B: Produção e consumo de ácidos orgânicos e glicose ao longo do tempo.	31
9	Gráfico <i>P. freudenreichii</i> C: Produção de B12 ao longo do tempo.	32
10	Gráfico <i>L. plantarum</i> A: Variação na composição de açúcares e produção de biomassa ao longo do tempo.	33
11	Gráfico <i>L. plantarum</i> B: Produção de ácido lático e consumo de glicose e frutose ao longo do tempo.	33
12	Gráfico co-cultivo <i>P. freudenreichii</i> e <i>L. plantarum</i> : Consumo de açúcares totais, biomassa e variação no conteúdo de ácidos orgânicos ao longo do tempo.....	35

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Vitamina B12.....	12
1.2 Deficiência de vitamina B12	14
1.3 Produção de vitamina B12 por microrganismos.....	14
1.4 Bactérias ácido-propionicas.....	17
1.5 <i>Propionibacterium</i> na indústria	18
1.6 <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	19
1.7 <i>Lactobacillus plantarum</i>	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVO	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos específicos.....	23
4 MATERIAIS E METODOS.....	24
4.1 Microrganismos	24
4.2 Preparação do inóculo	24
4.3 Resíduo proteico ácido de soja (Liquid acid protein residue of soybean (LAPRS)) .	24
4.4 Cultivo <i>P. freudenreichii</i>	25
4.5 Cultivo <i>L. plantarum</i>	26
4.6 Co-cultivo <i>P. freudenreichii</i> e <i>L. plantarum</i>	27
4.7 Métodos analíticos.....	28
5. RESULTADOS	30
5.1 Cultivo <i>P. freudenreichii</i> em LAPRS	30
5.2 Cultivo <i>L. plantarum</i> em LAPRS	32
5.3 Co-cultivo <i>P. freudenreichii</i> e <i>L. plantarum</i>	34
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO.....	39
8 PERSPECTIVAS	40
9 REFERENCIAS	41

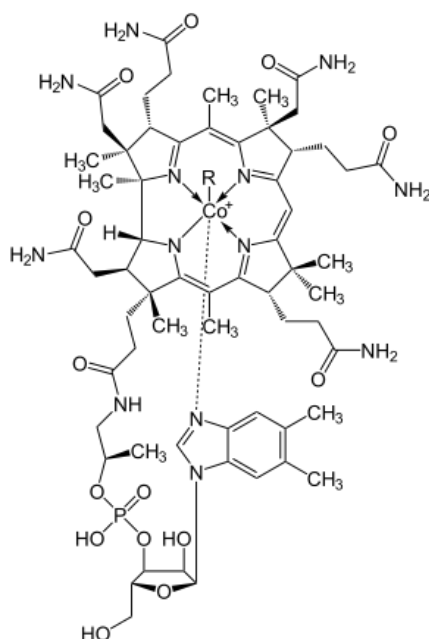
1 INTRODUÇÃO

1.1 Vitamina B12

As vitaminas compreendem um grupo diverso de compostos orgânicos, os quais são micronutrientes essenciais na nutrição. As funções das vitaminas in vivo, sob vários aspectos, são: 1. atuação como coenzimas ou seus precursores (niacina, tiamina, riboflavina, biotina, ácido pantotênico, vitamina B6, vitamina B12 e folato); 2. atuação como componentes do sistema de defesa antioxidante (ácido ascórbico (AA), alguns carotenoides e vitamina E); 3. Atuação como fatores envolvidos na regulação genética (vitaminas A, D e muitas outras); e 4. atuação em funções específicas, como a vitamina A na visão, ascorbatos em várias reações de hidroxilação e vitamina K nas reações de carboxilação específicas (DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, 2010).

Vitamina B12 é o termo genérico para o grupo de compostos (cobalaminas) com atividades vitamínicas semelhantes às da cianocobalamina. Esses compostos são corrinoídes, estruturas tetrapirrólicas nas quais um íon cobalto (Co) é ligado de forma covalente e coordenada aos quatro nitrogênios pirrólicos. A quinta ligação covalente coordenada com o Co é um nitrogênio do agrupamento dimetilbenzimidazolil, enquanto a sexta posição pode ser ocupada por cianeto, um grupo 5-deoxiadenosil, um grupo metila, glutatona, água, um íon hidroxila ou outros ligantes como nitrito, amônia ou sulfito (DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, 2010).

A cianocobalamina, uma forma sintética de vitamina B12 utilizada na fortificação de alimentos e em suplementos nutricionais, exibe estabilidade superior, sendo de fácil disponibilidade comercial. As formas de coenzima da vitamina B12 são a metilcobalamina e a 5-deoxiadenosilcobalamina. A metilcobalamina age de maneira coenzimática na transferência de um grupo metil (de 5-metil-tetra-hidrofolato) na metionina sintetase, enquanto a 5-deoxiadenosilcobalamina age como coenzima em uma reação de isomerização enzimática catalisada pela (R)-metilmalonil-CoA mutase (STABLER, 2001)



1 FIGURA 1. ESTRUTURA QUÍMICA DA VITAMINA B12 (COBALAMINA)

Ao contrário de outras vitaminas que são sintetizadas principalmente por plantas, apenas os microrganismos produzem cobalaminas. Algumas leguminosas têm sido relatadas por absorver pequenas quantidades de vitamina B12, produzidas por bactérias associadas a nódulos de suas raízes, no entanto, apenas uma pequena porção dessa substância entra nas sementes. A maioria dos alimentos de origem vegetal é desprovida de vitamina B12, a menos que esteja contaminada, por exemplo, a partir de fertilizantes (HERBERT, 1988)

A vitamina B12 existente na maioria dos tecidos animais consiste principalmente em formas de coenzimas, metilcobalamina e 5'-deoxiadenosilcobalamina, bem como aquocobalamina. Cerca de 20 análogos da vitamina B12 de ocorrência natural já foram identificados. Alguns desses não apresentam nenhuma atividade biológica em mamíferos, sendo que uns podem ser antagonistas da vitamina B12 e outros podem exibir atividade vitamínica, pelo menos parcial, mas, nesse caso, muitas vezes são mal absorvidos (DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, 2010).

Segundo a projeção de mercado intitulada “Vitamin B Complex Market Size - Industry Share Report 2017-2024” é previsto que até 2024 o mercado global de vitaminas ultrapasse a marca de 10 bilhões de dólares, tendo aplicação nas indústrias farmacêutica,

de cosméticos, alimentos, bebidas e alimentação animal. Nos EUA aproximadamente 45% dos adultos consomem algum tipo de suplemento vitamínico que contenham vitaminas do complexo B. Além de suplementos vitamínicos contendo especificamente vitamina B12, vitaminas do complexo B ou polivitamínicos, a vitamina B12 pode ser encontrada comercialmente em alimentos biofortificados como cereais, leites de soja, iogurtes e bebidas energéticas.

1.2 Deficiência de vitamina B12

A maior causa da deficiência de vitamina B12 durante a infância é a deficiência nutricional materna de vitamina B12. As causas de deficiência de B12 em adultos são primariamente a baixa ingestão e/ou mal absorção. A deficiência de B12 pode ser tolerada por adultos durante anos, em crianças pode tornar-se sintomática em um curto período de tempo (YILMAZ et al., 2016). A vitamina B12 historicamente conhecida como o “fator essencial” para cura da anemia perniciosa (MARTENS et al., 2002) tem envolvimento na síntese de DNA, metilação, síntese de neurotransmissores, e na reciclagem de homocisteína/metionina (YILMAZ et al., 2016). Sua deficiência inclui também manifestações neurológicas como polineuropatia, demência, mielopatia e neuropatia ótica (FELIPE et al., 2002). Os efeitos fisiológicos da deficiência de vitamina B12 são causados pela falta de sua ação coenzimática que leva a um acúmulo de homocisteína no sangue e por consequência uma deficiência de tetraidrofolato que leva a problemas de síntese de DNA (CARMEL; MELNYK; JAMES, 2003). A deficiência de vitamina B12 apresenta peculiaridades no seu desenvolvimento, a manifestação sintomas hematológicos como a anemia diverge do aparecimento de danos neurológicos tanto em ocorrência quanto severidade sendo inversamente proporcionais (CARMEL; MELNYK; JAMES, 2003).

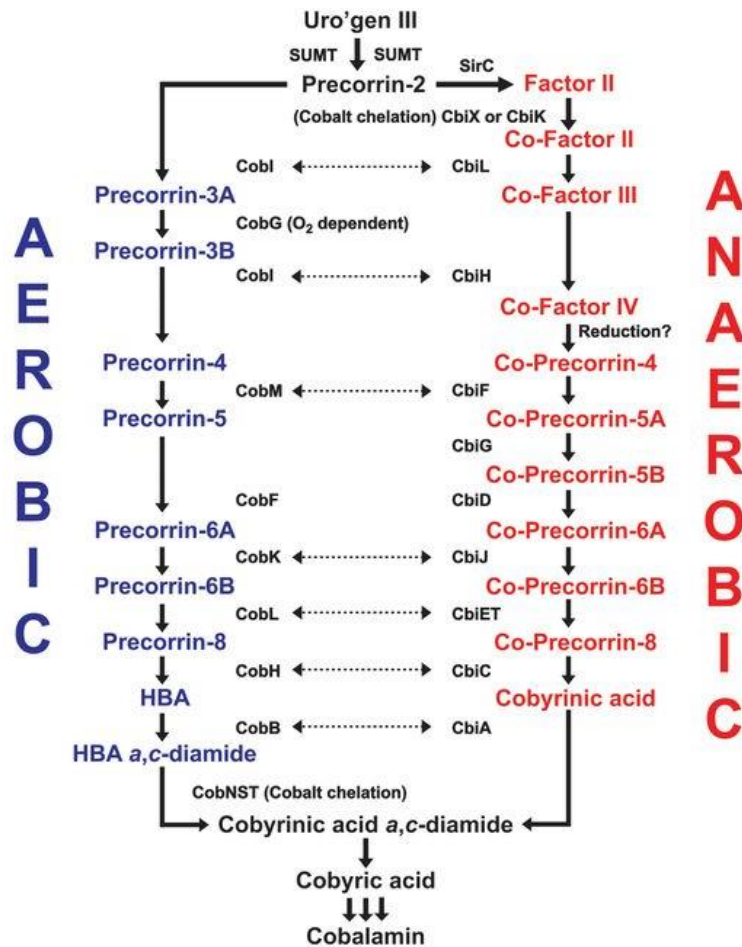
1.3 Produção de vitamina B12 por microrganismos

A biossíntese via rota de novo da vitamina B12 é restrita a microrganismos. Devida sua alta complexidade estrutural, mais de 30 genes são requeridos para a biossíntese de novo da cobalamina, o que equivale a cerca de 1% de um genoma bacteriano típico (ROTH et al., 1993). Existem duas rotas distintas para biossíntese de B12 nos microrganismos: 1. uma rota aeróbica, ou mais precisamente uma rota dependente de oxigênio que é encontrada em organismos como *P. denitrificans* e 2. uma

anaeróbica, independente de oxigênio, encontrada em organismos como *Bacillus megaterium*, *P. shermanii* e *Salmonella typhimurium* (MARTENS et al., 2002).

A formação dos derivados tetrapirrólicos é dependente de ALA, ácido aminolevulinico, e sua síntese pode começar a partir dos carbonos C-5 ou C-4. Na rota C-4 a enzima ALA sintetase catalisa a formação de ALA a partir de glicina e succinil-CoA. Na rota C-5 ALA é sintetizado a partir do glutamato em três reações enzimáticas (FANG; KANG; ZHANG, 2017). Duas moléculas de ALA são condensadas pela porphobilinogênio sintetase para formar o monopirrol porphobilinogen e quatro moléculas de porphobilinogen são então polimerizadas e ciclizadas para formar o uroporphyrinogen III. Esta reação é catalisada pelas enzimas porphobilinogen deaminase e uroporphyrinogen III sintetase. Metilação do uroporphyrinogen III nos carbonos C-2 e C-7 resulta na síntese do precorrin-2 que é o precursor da cobalamina (MARTENS et al., 2002). As vias aeróbica e anaeróbica para a produção da cobalamina divergem após a formação do precorrin-2 (FANG; KANG; ZHANG, 2017).

A via anaeróbica começa com a inserção de cobalto no precorrin-2, enquanto na via aeróbica ele é quelado após nove outras reações, as duas vias partilham de sete metilações periféricas, porém devido a inserção do cobalto em um primeiro passo todos os intermediários formados a seguir pela via anaeróbica são complexos de cobalto e são catalisadas por enzimas diferentes da via aeróbica devida a presença do metal. As duas vias convergem com a formação de ácido adenosil-cobirico, o qual é convertido a cobinamida pela adição de um braço aminopropanol a cadeia lateral do anel D. O último passo da síntese da vitamina B12 é a montagem da uma alça de nucleotídeos e posterior adição de uma molécula de DMBI (dimetilbenzoimidazol) ao complexo (MARTENS et al., 2002).



2 FIGURA 2. VIA AERÓBICA E ANAERÓBICA: REPRESENTAÇÃO DA VIA ANAERÓBICA E ANAERÓBICA DE PRODUÇÃO DA COBALAMINA, EM DESTAQUE A DIFERENTE ORDEM DE METILAÇÕES E INSERÇÃO DO COBALTO EM CADA VIA

Os genes correspondentes para síntese da cobalamina em *S. typhimurium* e *P. denitrificans* apresentam nomenclaturas distintas, utilizando de prefixos *cbi* e *cob* respectivamente. Por exemplo *S. typhimurium* possui dois genes distintos que codificam precorrin metiltransferase e descarboxilase denominados *cbiF* e *cbiT* enquanto em *P. denitrificans* essas funções são codificadas por um único gene, *cobL*. A inserção do cobalto, na via aeróbica, é catalisada por uma cobalto quelatase dependente de ATP constituída por três subunidades codificadas por *CobN*, *CobS* e *CobT* em *P. denitrificans*, na via anaeróbica a reação pode ser catalisada por duas quelatases distintas, *CbiK* de *S. typhimurium* e *CbiX* de *B. megaterium* (MARTENS et al., 2002).

Comercialmente, para a produção industrial de vitamina B12 é utilizada uma pequena variedade de microrganismos. As maiores demandas são por microrganismos que tenham um crescimento rápido e alta produção da vitamina, sendo assim os mais amplamente utilizados são *Pseudomonas denitrificans*, a qual já foram empregadas técnicas de engenharia genética e mutagênese aleatória visando aumentar sua capacidade de produção de cobalamina, que produz a vitamina pela via aeróbica assim sendo cultivada sob condições de aerobiose e *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii*, está que apesar de apresentar uma produção relativamente menor que *Pseudomonas denitrificans* é classificada como um microrganismo GRAS (geralmente reconhecido como seguro em tradução literal) pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos, que utiliza a via anaeróbica para a produção da vitamina sendo cultivada em condições de anaerobiose (MARTENS et al., 2002).

1.4 Bactérias ácido-propionicas

Bactérias ácido-propionicas (PAB) são objetos de estudo desde a primeira metade do século XX, são conhecidas pela sua capacidade de biossíntese de metabolitos de alto valor agregado como ácido propionico, vitamina B12, bacteriocinas e trealose. Uma grande vantagem do gênero *Propionibacterium* dá-se pela sua capacidade de crescimento e biossíntese de metabolitos utilizando diversos resíduos industriais como substrato o que a torna economicamente atrativa para a indústria em diferentes processos biotecnológicos (RUHAL; CHOUDHURY, 2012; XU et al., 2016; YAZDANI; GONZALEZ, 2007; ZHU et al., 2012).

Existem diversas evidências sobre o potencial efeito probiótico de PAB, baseadas na sua capacidade de síntese de compostos que melhoram a saúde humana como ácido fólico, prolina, ácido linoleico conjugado (CLA) e vitamina B12 (HUGENHOLTZ et al., 2002; IIDA; OHTAKA; KAJIWARA, 2007), síntese de vários compostos bioprotetores diferentes, como bacteriocinas ou compostos antifúngicos (HO; LUO; ADAMS, 2009; LIND et al., 2007), estimulação do crescimento de bactérias ácido lácticas (LAB) benéficas e resistência a digestão gástrica (GARDNER; CHAMPAGNE, 2005).

Bactérias ácido-propionicas são Gram-positivas, sem mobilidade e não produzem esporos bacterianos, são catalase positivas, e possuem um tamanho entre 1-5 µm; Podem

ser estritamente anaeróbias ou aero tolerantes; O pH ótimo para o crescimento de PAB oscila em torno de 7.0 (entre 4.5-8.0) e são caracterizadas por sua habilidade de produzir ácido propionico e vitamina B12, e apresentam uma taxa de crescimento alta até mesmo na presença de 6.5 % de NaCl no seu pH ótimo; A temperatura ótima de crescimento é de 30 °C (PIWOWAREK et al., 2018). PAB apresentam necessidade de diferentes compostos para seu crescimento ótimo, além de fontes de carbono e nitrogênio elas também necessitam de micronutrientes (ferro, magnésio, cobalto, manganês, cobre, amino ácidos, vitaminas B5 e B7, e hidróclorato de L-cisteína) tornando muitas vezes necessária uma suplementação adequada do meio de cultura (PIWOWAREK et al., 2018)

1.5 *Propionibacterium* na indústria

As bactérias propionicas tem grande importância comercial na indústria de queijo, compondo a microflora do queijo (juntamente com bactérias ácido lácticas, as quais favorecem o microambiente para o crescimento de PAB), utilizadas na produção do queijo suíço de coalho duro (queijo suíço Emmentaler, holandês Leerdamer, francês Comté) e queijo holandês médio-duro, tipo suíço e polonês. O papel destas bactérias na produção de queijo é baseada na fermentação de lactato, produzido por LAB, em ácido propionico e acético, o que garante um aroma específico ao produto final; Eles também servem como conservantes naturais (THIERRY; MAILLARD, 2002)

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de produção de ácido propionico por PAB de maneira efetiva em processos de fermentação a partir de fontes renováveis e materiais residuais (CHEN et al., 2012; FENG et al., 2011; ZHU et al., 2012). O ácido propionico é uma matéria prima de grande importância na indústria química, com aplicações nas indústrias de celulose, plástico, herbicidas, perfumes e alimentos, produzido tradicionalmente a partir de fontes não renováveis na indústria petroquímica. A produção via fermentação microbiológica por PAB de diversas fontes de carbono como glicose, whey, xilose, sacarose e glicerol torna-se cada vez mais atrativa (ZHU et al., 2012).

Algumas cepas de PAB são utilizadas na pecuária como um probiótico na alimentação animal. *P. freudenreichii* regula a microflora intestinal, estimulando o crescimento de *Bifidobacterium*, e protege contra o crescimento de microrganismos patogênicos devido a produção de bacteriocinas (PIWOWAREK et al., 2018).

Vitamina B12 é exclusivamente produzida por microrganismos, sua síntese química é industrialmente inviável por envolver mais de 70 passos reacionais e pelo seu alto custo. *Propionibacterium* sp. juntamente com *Pseudomonas* sp. são os microrganismos de maior uso industrial para este fim (HUGENSCHMIDT; SCHWENNINGER; LACROIX, 2011; MARTENS et al., 2002)

1.6 *Propionibacterium freudenreichii*

P. freudenreichii é uma PAB com o status de Generally Recognized As Safe (GRAS) em sua tradução “geralmente reconhecida como segura” pela Food and Drug Administration (FDA) americana (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. et al., 2002). *P. freudenreichii* assim como *P. adcidipropionici* também está na lista de Qualified Presumption of Safety (QPS) em tradução “presunção qualificada de segurança” pela European Food Safety Authority (ANDREOLETTI et al., 2008).

P. freudenreichii apresenta poucos requerimentos nutricionais, é capaz de sintetizar todos os aminoácidos e a maioria das vitaminas (STACKEBRANDT, 2006). Assim *P. freudenreichii* pode crescer em meios de cultura contendo uma fonte de carbono como glicose ou lactato, amônia como fonte de nitrogênio, cobalto entre outros minerais. *P. freudenreichii* particularmente tem a capacidade de biossíntese de vitamina B12 (cobalamina), um cofator da enzima metilmalonil-CoA mutase, via rota anaeróbica independente das condições aeróbicas e anaeróbicas de fermentação (IIDA; OHTAKA; KAJIWARA, 2007).

A classificação de *P. freudenreichii* divide-se em duas subespécies com base na fermentação de lactose e atividade da enzima nitrato redutase. *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* não é capaz de fermentar lactose e apresenta atividade de nitrato redutase enquanto *P. freudenreichii* spp. *shermanii* exibe o comportamento contrário, apresenta a capacidade de fermentar lactose, porém não tem atividade de nitrato redutase. *P. freudenreichii* spp. *freudenreichii* é classificada como uma PAB anaeróbica aerotolerante, ou seja, não tem a capacidade de utilizar oxigênio para o seu crescimento, mas tolera a sua presença (THIERRY et al., 2011).

Diversos trabalhos explorando a habilidade de produção de vitamina B12 em *P. freudenreichii* tem sido publicados nos últimos anos, como cepas geneticamente modificadas de *P. freudenreichii* visando uma maior produção de vitamina B12 (PIAO et

al., 2004), ácido 5-aminolevulinico (ALA) que é o primeiro intermediário na síntese do anel tetrapirrólico (KIATPAPAN; MUROOKA, 2001). Trabalhos demonstrando a capacidade de produção de vitamina B12 e outros metabolitos de interesse como ácido propionico e outros ácidos orgânicos utilizando resíduos industriais como matérias primas também vem sendo publicados nos últimos anos, como por exemplo glicerol residual da indústria petroquímica (HIMMI et al., 2000; RUHAL; CHOUDHURY, 2012; YAZDANI; GONZALEZ, 2007), hidrolisados de melaço e bagaço de cana (CHEN et al., 2012; FENG et al., 2011; ZHU et al., 2012) e hidrolisado de milho (HUANG et al., 2002).

1.7 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum é uma espécie versátil e flexível de bactérias ácido lácticas, possui um dos maiores genomas do gênero *Lactobacillus* e é encontrada em uma grande variedade de nichos ambientais, incluindo laticínios em geral, carnes, fermentados vegetais, comidas fermentadas, além de ser comumente encontrado como colonizador do trato gastrointestinal (GI) humano (CONNELLY, 2008; KLEEREBEZEM et al., 2002). O *L. plantarum* é um microrganismo classificado como GRAS (geralmente reconhecido como seguro em português) pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e apresenta um grande potencial probiótico e de biofortificação, já foi associado a regulação do sistema imune das mucosas do trato GI e de algumas inflamações do mesmo e apresenta linhagens comercializadas como suplementos probióticos (CONNELLY, 2008).

Este probiótico tem sido estudado por diversos autores diferentes, os quais utilizaram diferentes resíduos agroindustriais como substrato para a produção de biomassa, também tem sido estudada a produção de seus metabolitos de interesse, especialmente o ácido láctico. Tais substratos incluem malte, trigo, melaço de beterraba, torta de amendoim, farelo de arroz, farinha de milho e recentemente o resíduo efluente ácido do isolamento de soja LAPRS (COGHETTO et al., 2016).

Alguns estudos conseguiram realizar o co-cultivo de *L. plantarum* e *P. freudenreichii* com sucesso, utilizando o co-cultivo com a finalidade de inibir o crescimento de fungos em silagem de milho pela produção de ácidos orgânicos como o ácido láctico e ácido propionico (RAHMAN et al., 2017), também foi conduzido com sucesso o co-cultivo visando a produção de ácido fólico por *L. plantarum* e vitamina B12

por *P. freudenreichii* utilizando permeado de whey suplementado como meio de cultura (HUGENSCHMIDT; SCHWENNINGER; LACROIX, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

A vitamina B12 é de grande importância industrial tendo os mais diversos usos, tanto na indústria alimentícia por meio de suplementos alimentares específicos e polivitamínicos, biofortificação de alimentos, produção de bebidas e alimentação, quanto nas indústrias farmacêuticas e na alimentação animal. A sua deficiência traz diversos malefícios para saúde humana como anemia perniciosa, problemas na síntese de DNA, acúmulo de homocisteína no sangue e outras disfunções metabólicas até danos neurológicos severos. Sua produção é exclusiva de microrganismos e os custos de produção industrial tornam-se elevados pelo custo do meio de cultura que pode chegar até 90% do custo final de produção. Isto leva a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias de produção da vitamina B12. A procura de novos meios de cultura como resíduos industriais torna-se uma alternativa economicamente atrativa para a redução de custos na produção.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Produzir vitamina B12 utilizando o resíduo LAPRS como meio de cultura em um co-cultivo com os microrganismos *P. freudenreichii* spp. *shermanii* e *L. plantarum*.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir vitamina B12 em um cultivo de *P. freudenreichii* spp. *shermanii* utilizando LAPRS como meio de cultura;
- Produzir ácido lático em um cultivo de *L. plantarum* utilizando LAPRS como meio de cultura com o intuito de melhorar a taxa de crescimento e produção de B12 de *P. freudenreichii* spp. *shermanii*;
- Aumentar a produção de vitamina B12 por *P. freudenreichii* spp. *shermanii* em um co-cultivo com *L. plantarum* utilizando LAPRS como meio de cultura.

4 MATERIAIS E METODOS

4.1 Microrganismos

A cepa de *L. plantarum* BL011 foi isolada e descrita a partir do queijo Serrano pelo nosso grupo (FERNANDA et al., 2003), foi usada nesse estudo. Esta cepa é identificada como *L. plantarum* BL011 e é mantida na Coleção de Cultura de Microbiologia do Bioteclab (UFRGS, Porto Alegre, Brasil). A cepa de *Propionibacterium freudenreichii* ATCC é uma linhagem comercial adquirida da Fundação André Tosello e mantida na Coleção de Cultura de Microbiologia do Bioteclab (UFRGS, Porto Alegre, Brasil).

4.2 Preparação do inoculo

Os inoculos foram preparados em frascos Erlenmeyer (120 mL) contendo 50 mL de MRS para *L. plantarum* BL011 ou 50 mL de meio BF (Lactato de sódio e Extrato de levedura) inoculados com 200 µL para *L. plantarum* BL011 e 1 mL para *Propionibacterium freudenreichii* de culturas em estoque de glicerol. As culturas foram incubadas a 30 °C em estufa até que atingissem densidade ótica (DO) 1.0 a 600 nm. As culturas foram transferidas para o meio de cultura final em uma concentração de 10 % para os cultivos independentes e em uma fração de 1 % *L. plantarum* e 9 % *P. freudenreichii* do volume total de meio de cultura para o co-cultivo em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo um volume final de 25 mL a composição do meio de cultivo é descrita a seguir.

4.3 Resíduo proteico ácido de soja (Liquid acid protein residue of soybean (LAPRS))

O LAPRS é a fração líquida resultante dos passos de lavagem e separação provenientes da produção de proteína de soja isolada. Esta fração líquida compreende açúcares e proteínas de baixo peso molecular (COGHETTO et al., 2016). O LAPRS foi cedido pela empresa DuPont (Esteio, Rio Grande do Sul, Brasil). Este resíduo foi coletado na planta industrial na fase de precipitação, o qual é a primeira operação da unidade da estação de tratamento de águas residuais. O líquido foi imediatamente estocado em bombonas plásticas de 50 L, seladas e transportadas ao laboratório onde foram armazenadas a -4 °C e concentradas em concentrador a vácuo semi-industrial à 65 °C até uma concentração final 25% de seu volume original.



3 FIGURA 3. LAPRS CONCENTRADO: (A) LAPRS CONCENTRADO PÓS AUTOCLAVE; (B) LAPRS CONCENTRADO E CENTRIFUGADO PRONTO PARA O USO.

4.4 Cultivo *Propionibacterium freudenreichii*

Foram realizados no trabalho quatorze cultivos independentes com a cepa *P. freudenreichii* ATCC em frascos Erlenmeyer de 50 mL com um volume final de 25 mL e uma carga de inóculo de 10 % do volume final em DO 1.0 a 600 nm para que pudesse ser feita a cinética de crescimento, quantificação de consumo de açúcares, produção de vitamina B12 e ácidos orgânicos em duplicata analítica com sacrifício de ponto. Os pontos foram coletados a cada vinte e quatro horas a partir do ponto 1 (24 h) até o ponto 7 (168 h). O pré-inóculo foi incubado em estufa a 30 °C durante 120 h para que atingisse DO 1.0 a 600 nm. Os cultivos foram incubados em shaker sob anaerobiose relativa, sem agitação a 30 °C durante as primeiras 72 h e após suplementados com dimetilbenzoimidazol (DMBI) em uma concentração final de 15 mM/L para que fosse possível a produção de vitamina B12, após a suplementação os cultivos foram incubados em shaker sob micro-aerofilia a 30 °C 180 rpm até o fim do cultivo. O meio de cultura foi o LAPRS, teve seu pH ajustado para pH 6.4 (pH ~4 inicial) e foi suplementado com solução contendo sulfato de manganês 20 mg/L e sulfato de magnésio 200 mg/L, cobalto

15 mg/L e ácido glutâmico 15 mg/L (precursores de vitamina B12). O LAPRS foi autoclavado a 121 °C e pressão de 1 atm por 15 min e posteriormente centrifugado em frascos estéreis a fim de separar proteínas precipitadas em suspensão.



4 FIGURA 4. PRÉ-INOCULO P.SHERMANII APÓS 120 H DE INCUBAÇÃO

4.5 Cultivo *L. plantarum*

Foram realizados no trabalho dezesseis cultivos independentes com a cepa *L. plantarum* BL011 em frascos Erlenmeyer de 50 mL com um volume final de 25 mL e uma carga de inóculo de 10 % do volume final em DO 1.0 a 600 nm para que pudesse ser feita a cinética de crescimento, a quantificação de consumo de açúcares e produção de ácidos orgânicos em duplicata analítica com sacrifício de ponto. Os pontos foram coletados inicialmente de duas em duas horas a partir do ponto 1 (2h) até o ponto 5 (10h) após foram coletados pontos referentes ao tempo 24 h (ponto 6), 34 h (ponto 7) e 48 h (ponto 8) para as análises quantitativas. O pré-inóculo foi incubado a 30 °C overnight para que atingisse DO 1.0 a 600 nm. Os cultivos foram incubados em shaker a 30 °C sem agitação durante as dez primeiras horas, após os cultivos foram incubados sob agitação de 180 rpm até o final. O meio de cultura foi o LAPRS, teve seu pH ajustado para pH 6.4 (pH ~4 inicial) e foi suplementado com solução contendo sulfato de manganês 20 mg/L e sulfato de magnésio 200 mg/L, cobalto 15 mg/L e ácido glutâmico 15 mg/L (precursores de vitamina B12). O LAPRS foi autoclavado a 121 °C e pressão de 1 atm por 15 min e posteriormente centrifugado em frascos estéreis a fim de separar proteínas precipitadas em suspensão.

4.6 Co-cultivo *Propionibacterium freudenreichii* e *Lactobacillus plantarum*

Foram realizados no trabalho vinte cultivos independentes com as cepas *P. freudenreichii* ATCC e *L. plantarum* BL011 em frascos Erlenmeyer de 50 mL com um volume final de 25 mL e uma carga de inóculo de 10 % do volume final (1 % *L. plantarum* e 9 % *P. freudenreichii*) em DO 1.0 a 600 nm para que pudesse ser feita a cinética de crescimento, quantificação de consumo de açúcares, produção de vitamina B12 e ácidos orgânicos em duplicata analítica com sacrifício de ponto. Os pontos foram coletados inicialmente a cada quatro horas a partir do ponto 0 (0 h) até o ponto 2 (8 h), após foram coletados pontos a cada vinte e quatro horas a partir do ponto 3 (24 h) até o ponto 9 (168 h). Os pré-inóculos foram incubados em estufa a 30 °C durante 120 h para *P. freudenreichii* e overnight para *L. plantarum* para que atingissem DO 1.0 a 600 nm. Os cultivos foram incubados em shaker sob anaerobiose relativa, sem agitação a 30 °C durante as primeiras 72 h e após suplementados com DMBI em uma concentração final de 15 mM/L para que fosse possível a produção de vitamina B12, após a suplementação os cultivos foram incubados em shaker sob micro-aerofilia a 30 °C 180 rpm até o fim do cultivo. O meio de cultura foi o LAPRS, teve seu pH ajustado para pH 6.4 (pH ~4 inicial) e foi suplementado com solução contendo sulfato de manganês 20 mg/L e sulfato de magnésio 200 mg/L, cobalto 15 mg/L e ácido glutâmico 15 mg/L (precursores de vitamina B12). O LAPRS foi autoclavado a 121 °C e pressão de 1 atm por 15 min e posteriormente centrifugado em frascos estéreis a fim de separar proteínas precipitadas em suspensão.



5 FIGURA 5. PREPARO DO CO-CULTIVO *PROPIONIBACTERIUM FREUDENREICHII* E *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

4.7 Métodos analíticos

4.7.1 Biomassa

Amostras (5 mL) de meio de cultura foram coletadas para quantificação de biomassa por peso seco, as amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose 0.22 µm 47 mm previamente pesadas e em seguida secas em balança de infravermelho e após as membranas foram postas por trinta minutos no dessecador e pesadas novamente.

4.7.2 Tratamento de amostras

Amostras (20 mL) de meio de cultura foram centrifugadas a 3000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para quantificação de açúcares e ácidos orgânicos, o pallet celular foi lavado com solução tampão de fosfato de potássio 0.1 M e acidificado com ácido cítrico 0.1 M até atingir pH 7, centrifugado novamente e ressuspendido em tampão de extração contendo fosfato de potássio 0.1 M acidificado com ácido cítrico 0.1 M até atingir pH 4.5 e 1 % de cianeto para que a vitamina seja extraída em sua forma mais estável de cianocobalamina.

4.7.3 Extração e quantificação de Vitamina B12

Como a vitamina B12 é um produto intracelular o primeiro passo para a sua extração é uma etapa de rompimento celular, esta foi feita em autoclave 121 °C 1 atm por 15 minutos. Em seguida foi filtrado 1 mL de amostra em membranas de acetato de celulose 0.22 µm 13 mm e posteriormente a vitamina B12 foi determinada por HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de arranjo de diodos (UV-DAD) com varredura de 200-700 nm e coluna C18 utilizando metanol 90 % acidificado com 0.5 % de ácido fosfórico a 40 °C e fluxo de 1 mL/min.

4.7.4 Quantificação de açúcares

Para a quantificação de açúcares amostras foram filtradas em membranas de acetato de celulose 0.22 µm 13 mm e analisadas por HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) com detector de índice de refração e coluna Bio-Rad HPX-87C e nos casos onde não foi possível a concentração de açúcares totais foi determinada pelo método de Dubois, como demonstrado na Figura 6, este é um método para determinação de açúcares totais e resume-se na desidratação dos açúcares com ácido sulfúrico e posterior formação de

complexo dos mesmos com fenol. Açúcares simples ou complexos, e seus derivados, quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado, tornam a solução amarelo-alaranjada, mantendo esta coloração estável. A amostra colorida é colocada em espectrofotômetro e comparada com referencial, a fim de apresentar o valor de absorbância da solução, que é linearmente proporcional à concentração de açúcares totais, foi utilizado glicose como padrão.

4.7.5 Quantificação de ácidos orgânicos

Ácido láctico, propionico e acético foram determinados por HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um detector de índice de refração e coluna Bio-Rad HPX 87H utilizando ácido sulfúrico 5 mM como eluente a 65 °C com um fluxo de 0,8 ml/min. Foi feita uma tentativa de quantificação sob as mesmas condições utilizando a coluna Bio-Rad HPX 87C visando uma melhor eficiência na separação dos picos porém foi ineficiente.

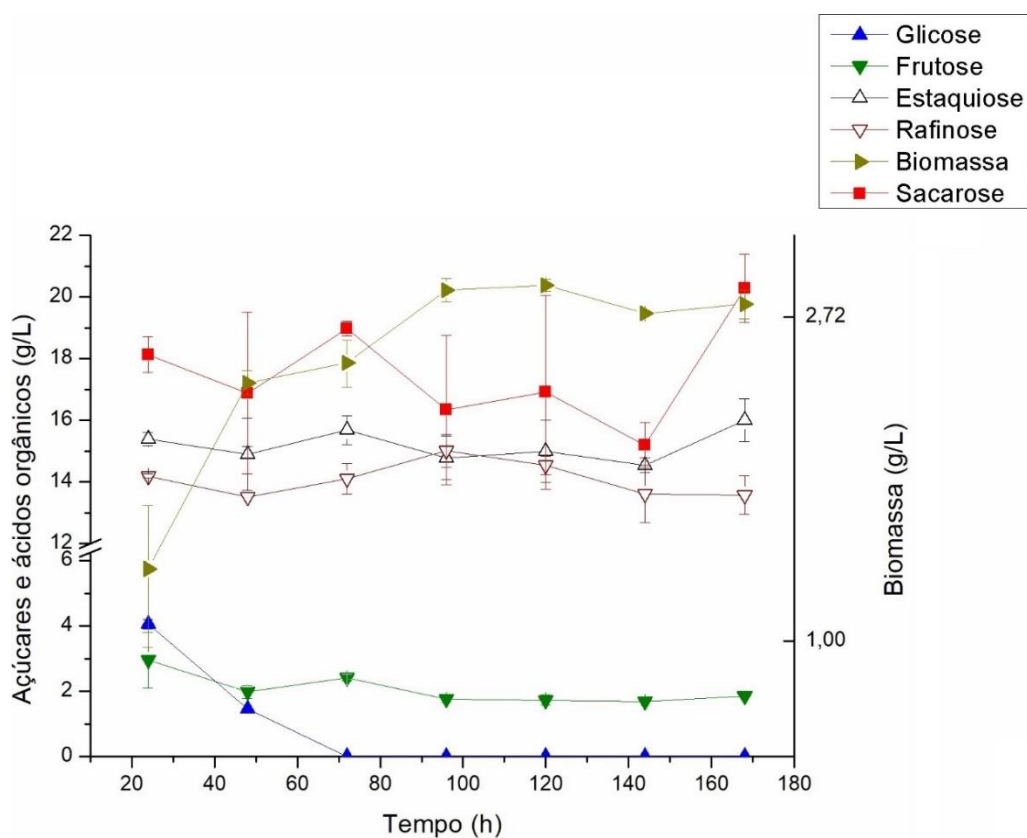


6 FIGURA 6. QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES PELO MÉTODO DE DUBOIS.

5. RESULTADOS

5.1 Cultivo *P. freudenreichii* em LAPRS

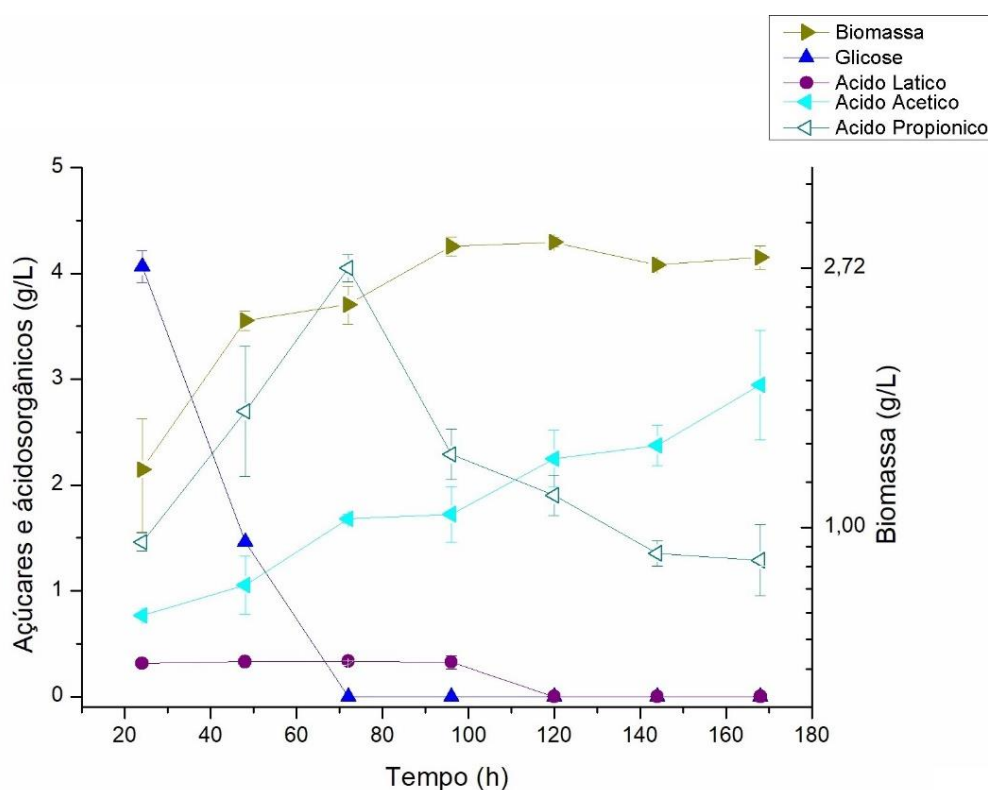
P. freudenreichii cresceu com sucesso no LAPRS, o único açúcar que foi consumido do meio de cultura foi a glicose, os outros mantiveram-se todos estáveis ao longo do tempo. A grande variação na quantidade de açúcares não consumidos dá-se por serem cultivos independentes, o que leva a microambientes diferentes bem como as possíveis diferenças no conteúdo da matriz do LAPRS que compõe o meio de cultura, este que é altamente variável dependendo de diversos fatores externos da própria produção da proteína isolada de soja onde o LAPRS é produzido como resíduo agroindustrial.



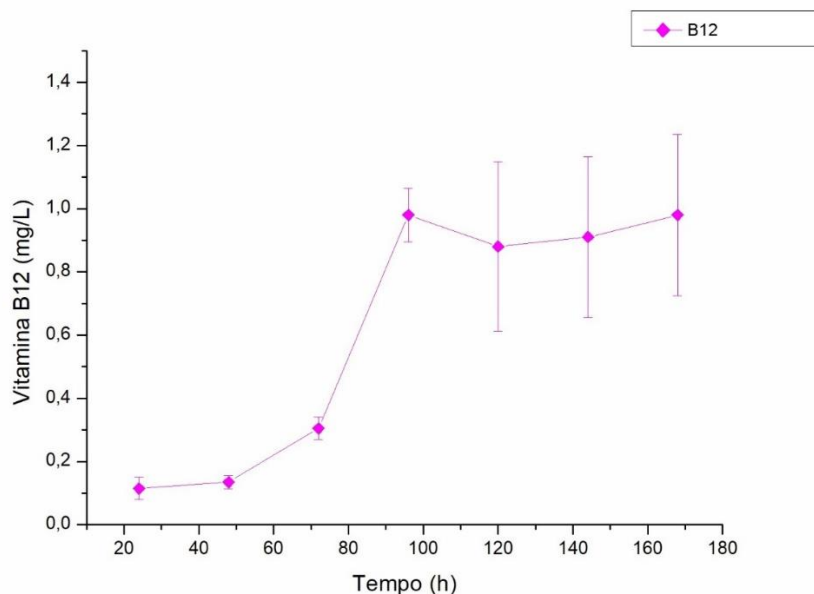
7 GRÁFICO *P. FREUDENREICHII* A: VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES E PRODUÇÃO DE BIOMASSA AO LONGO DO TEMPO.

P. freudenreichii é uma bactéria anaeróbica com um perfil de crescimento bastante lento, podemos observar um perfil de crescimento bastante variável condicionado pela ordem dos substratos que são preferencialmente consumidos pela mesma, primeiramente a glicose que é esgotada em 72 h de cultivo. Após observa-se um declínio no ácido propionico que tem seu pico de produção em 72 h de cultivo onde este passa a um regime de agitação em 180 rpm, momento em que o meio é suplementado com DMBI (intermediário da produção) para que a vitamina B12 seja produzida de forma mais eficaz. O ácido láctico do meio de cultura também é consumido rapidamente após ser a fonte de carbono preferencial, sendo esgotado entre 120~144 h.

A vitamina B12 tem seu pico de produção em 96 h, isto 24 h após a suplementação do meio de cultura com DMBI atingindo uma concentração 0,98 mg/L e mantendo-se praticamente constante até o final do cultivo. Observa-se também um aumento progressivo no conteúdo de ácido acético um subproduto da fermentação, com um perfil diretamente proporcional a oxidação e consumo do ácido propionico.



8 GRÁFICO P. FREUDENREICHII B: PRODUÇÃO E CONSUMO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E GLICOSE AO LONGO DO TEMPO.

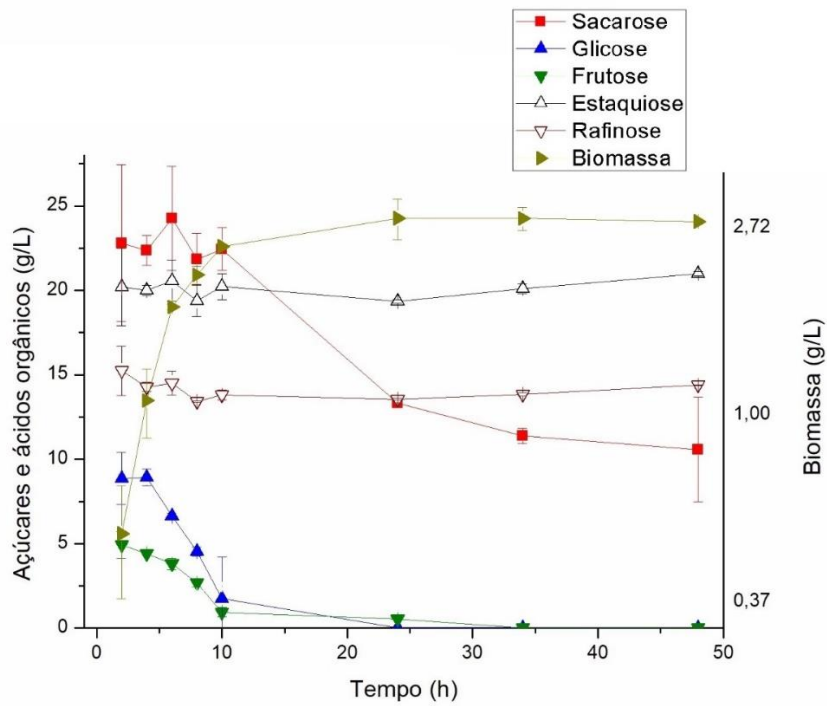


9 GRÁFICO P. FREUDENREICHII C: PRODUÇÃO DE B12 AO LONGO DO TEMPO.

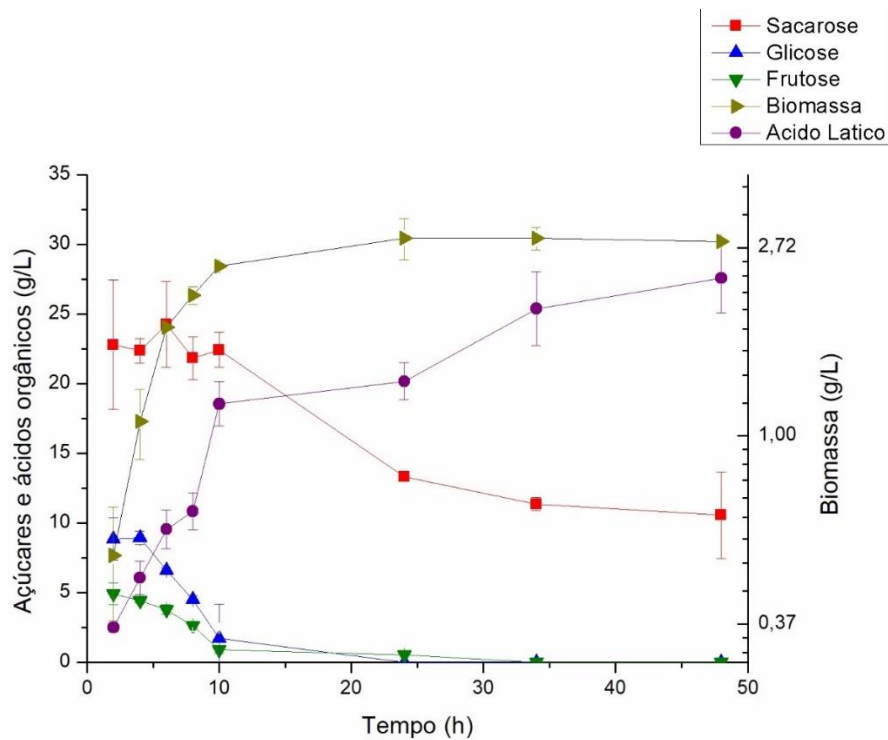
5.2 Cultivo *L. plantarum* em LAPRS

L. plantarum cresceu com sucesso em LAPRS, seu crescimento exponencial vai até aproximadamente 10 h onde é esgotada a glicose e frutose do meio de cultura, após apresenta um pico de crescimento proveniente do consumo de sacarose e sua biomassa representada pelo peso seco celular estabiliza em torno de 2,8 g/L. Como esperado *L. plantarum* não possui a capacidade de hidrolise dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose pela ausência da enzima α -galactosidase. Apresenta uma produção de ácido láctico crescente durante todo o cultivo, sendo mais expressiva durante a fase exponencial de seu crescimento e mais branda até o fim do cultivo atingindo um valor de aproximadamente 27,5 g/L no final do cultivo.

A elevada produção de ácido láctico pode ser um fator limitante para o seu crescimento nestas condições, visto que não há controle do pH durante o processo fermentativo e a diminuição do pH do meio de cultura leva a uma inibição do crescimento de microrganismos, apesar de o meio de cultura ainda conter quantidades significantes de sacarose, em torno de 10 g/L, não observamos aumento de biomassa após 24 h de cultivo.



10 GRÁFICO *L. PLANTARUM* A: VARIAÇÃO NA COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES E PRODUÇÃO DE BIOMASSA AO LONGO DO TEMPO.

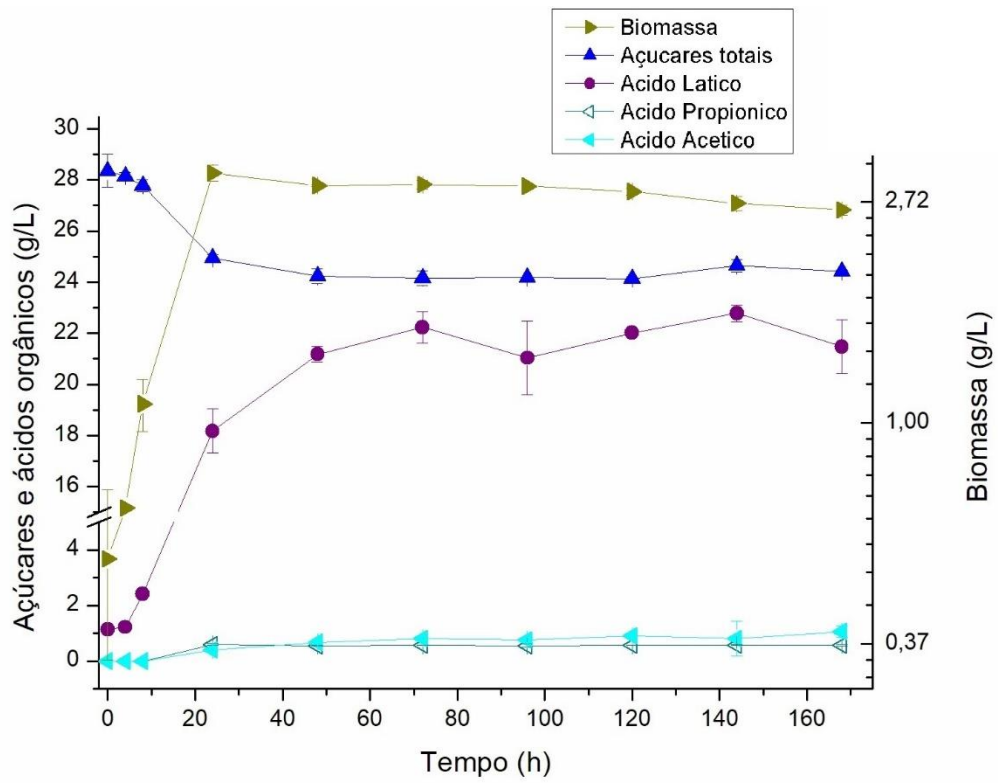


11 GRÁFICO *L. PLANTARUM* B: PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO E CONSUMO DE GLICOSE E FRUTOSE AO LONGO DO TEMPO.

5.3 Co-cultivo *P. freudenreichii* e *L. plantarum*

Não foi observada produção de vitamina B12 ao final do co-cultivo, *P. freudenreichii* teve seu crescimento fortemente inibido por *L. plantarum* provavelmente pela grande diferença na velocidade de crescimento dos dois microrganismos. *L. plantarum* cresce de maneira muito mais rápida que *P. freudenreichii* e apresenta uma produção de ácido láctico bastante acentuada, este que é um dos substratos de fonte de carbono preferenciais para o crescimento de *P. freudenreichii* (THIERRY et al., 2011), porém os efeitos deste acúmulo de ácido láctico sobre o pH do meio de cultura não foram monitorados e provavelmente esta seja a causa da inibição do crescimento de *P. freudenreichii*.

O método empregado para a quantificação de açúcares totais tem de ser otimizado, podemos observar um declínio no conteúdo de açúcares proporcional ao aumento de biomassa, representada majoritariamente por *L. plantarum*, chegando atingir uma concentração de 2,92 g/L em peso seco e tendo um leve declínio até o final do cultivo onde atingiu a concentração de 2,62 g/L em peso seco. A produção de ácido láctico chegou a uma concentração de 22,7 g/L, inferior a produção referente ao cultivo de *L. plantarum* sozinho que chegou a atingir a marca de 27 g/L. O conteúdo de ácido propionico e acético é quase irrelevante, porém indica que *P. freudenreichii* estava presente durante o cultivo e teve seu crescimento fortemente inibido pelas condições do microambiente.



12 GRÁFICO CO-CULTIVO *P. FREUDENREICHII* E *L. PLANTARUM*: CONSUMO DE AÇÚCARES TOTAIS, BIOMASSA E VARIAÇÃO NO CONTEÚDO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS AO LONGO DO TEMPO.

6 DISCUSSÃO

A vitamina B12 é produzida exclusivamente por microrganismos e sua síntese química é industrialmente inviável devido sua complexidade e alto custo, por isso trata-se de um produto de alto valor agregado indispensável para a saúde humana e animal. Ela pode ser adquirida através de alimentos de origem animal, suplementos alimentares e alimentos biofortificados. É notável sua alta complexidade estrutural (é quimicamente o mais sofisticado dentre todos os co-fatores) e seu envolvimento nas mais diversas funções biológicas, fatos estes que despertam o interesse de pesquisadores desde o início do século XX, tendo rendido em 1934 o Premio Nobel de Fisiologia ou Medicina aos pesquisadores Murphy e Whipple por demonstrarem que a cobalamina é um fator para a cura da anemia perniciosa e mais tarde em 1964 o Premio Nobel de química ao pesquisador Dorothy Hodgkin pela determinação de sua estrutura por cristalografia de raio-X (MARTENS et al., 2002; MOORE et al., 2012).

O presente trabalho teve por objetivo a produção de vitamina B12 utilizando um resíduo agroindustrial sem valor comercial para este fim, este denominado LAPRS é proveniente do processo industrial de isolamento da proteína de soja e até o momento não existem registros na literatura de seu uso para este fim, esta abordagem de uso de resíduos agroindústrias para a produção de metabolitos com valor agregado via métodos fermentativos é crescente no meio acadêmico e demonstra alta viabilidade econômica visto que os maiores custos para a produção de metabolitos de valor agregado por microrganismos é alto valor dos componentes do meio de cultura.

O trabalho configurou-se em três processos distintos, o crescimento da bactéria *P. freudenreichii* em LAPRS visando a produção de vitamina B12, o crescimento da bactéria *L. plantarum* em LAPRS com a finalidade de produção de ácido lático para promover um microambiente mais propicio para o crescimento de *P. freudenreichii* aumentando assim a viabilidade nutricional do meio de cultura, sabendo-se que ácido lático é uma das fontes de carbono preferenciais deste microrganismo (THIERRY et al., 2011) e o co-cultivo dos dois microrganismos visando uma maior produção da cobalamina por *P. freudenreichii*.

O experimento a respeito do crescimento de *P. freudenreichii* e produção da cobalamina em LAPRS foi bem-sucedido, demonstrando uma taxa de produção de

biomassa de *P. freudenreichii* não muito diferente das observadas em meio sintético (dados não presentes neste trabalho), porém o conteúdo de açúcares, principalmente oligossacarídeos, presentes no meio de cultura não foi completamente consumido o que demonstra a necessidade de novas abordagens para uma otimização do uso do LAPRS para este fim. Novos experimentos têm de ser construídos visando uma melhora no crescimento do microrganismo e por consequência uma maior produção de vitamina B12. O conteúdo final de vitamina B12 observado neste experimento foi de $0,98 \pm 0,25$ mg/L o que é relativamente baixo, porém quando levado em conta a necessidade diária de consumo desta vitamina (2,1 microgramas diárias para adultos segundo a OMS) o resultado representa a quantidade necessária de consumo de mais de um ano para um adulto.

O experimento de crescimento de *L. plantarum* em LAPRS também foi bem-sucedido, este que era sabidamente viável por já ter sido explorado em um trabalho prévio do nosso grupo, que visava a produção de biomassa de *L. plantarum* (COGHETTO et al., 2016). A produção de ácido láctico atingiu valores de $27,5 \pm 2,48$ g/L ao final de 48 h, este valor representa o dobro da concentração de ácido láctico presente em meios de cultura sintéticos para o crescimento de *P. freudenreichii* (13,5 g/L) o que pode gerar problemas de alta pressão osmótica em seu uso para este fim, porém esta produção pode ser ainda maior visto que já foi demonstrada a capacidade de uma produção de biomassa de *L. plantarum* bastante superior no LAPRS do que a observada neste estudo que atingiu valores de $2,8 \pm 0,01$ g/L e em trabalhos prévios chegou a valores de $10,85 \pm 0,03$ g/L (COGHETTO et al., 2016).

O experimento final que aborda o co-cultivo dos microrganismos utilizados neste trabalho não obteve sucesso, o crescimento de *P. freudenreichii* foi fortemente inibido por *L. plantarum* o que levanta diversos questionamentos sobre esta problemática visto que a produção de queijo tipo Suíço é feita por uma associação entre LAB e PAB e os efeitos estimulatórios de LAB sobre o crescimento de PAB já foram observados (PIVETEAU, 1999). A grande diferença na velocidade de crescimento de *L. plantarum* e *P. freudenreichii* pode ter sido um fator chave neste experimento, como *L. plantarum* produz biomassa em uma velocidade muito maior a sua produção de ácido láctico por consequência é bastante alta e rápida e isto pode ter levado a um aumento na pressão osmótica que suprimiu o crescimento de *P. freudenreichii*, além dos efeitos do crescimento de LAB em co-cultivo sobre o pH do meio de cultura, estes que já foram

observados na literatura, podem ter acarretado uma acidose no microambiente que possa ter levado a esta inibição (GARDNER; CHAMPAGNE, 2005). É sabido que os efeitos de um pH ácido elevado limitam o crescimento bacteriano e neste caso em particular as enzimas chave para a produção de vitamina B12 tem sua maior atividade em pH ~7 ou levemente abaixo disto, em um pH bastante ácido a maioria das enzimas necessárias para a síntese de B12 não apresentam atividade enzimática. Mais experimentos são necessários a fim de corrigir estes possíveis problemas, como um cultivo sob condições de pH controlado, otimização da produção de biomassa de *P. freudenreichii*, estratégias que possam tornar possível um melhor aproveitamento da matriz do meio de cultura como seu conteúdo de oligossacarídeos.

7 CONCLUSÃO

Até o presente momento foi possível cultivar *P. freudenreichii* empregando o resíduo LAPRS como meio de cultura porém o consumo do conteúdo de açúcares presentes do meio de cultivo é baixo visto que a bactéria não consome os açúcares majoritários da matriz (estaquiose e rafinose), foi possível produzir vitamina B12 utilizando o resíduo LAPRS como meio de cultura quando *P. freudenreichii* é cultivada sozinha, na situação de co-cultivo *L. plantarum* inibiu fortemente o crescimento da mesma. Foi observada uma alta produção de ácido láctico por *L. plantarum* o que representa o potencial de enriquecimento do meio de cultura empregado. Sendo assim novas abordagens devem ser estudadas tanto para um melhor aproveitamento dos açúcares majoritários da matriz do meio, como por exemplo técnicas de hidrólise enzimática dos oligossacarídeos complexos para que ocorra uma quebra dos mesmos em unidades mais simples que sejam passíveis de metabolização pelos organismos em questão. A abordagem de co-cultivo tem de ser conduzida sob condições de cultivo com pH controlado para a verificação de eficácia do mesmo ou novas estratégias como um inoculo tardio de *L. plantarum* visto que *P. freudenreichii* altera seu metabolismo e consome ácido láctico de maneira preferencial após a adição de DMBI e o cultivo ser posto em agitação no shaker.

8 PERSPECTIVAS

Como sequência a este trabalho será realizado:

- Otimização das condições de cultivo de *P. freudenreichii* em LAPRS;
- Escalonamento do cultivo de *P. freudenreichii* em LAPRS para biorreatores;
- Repetição do co-cultivo entre *P. freudenreichii* e *L. plantarum* sob condições de pH controlado.

9 REFERENCIAS

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O. R. Vitaminas. In: **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed ed. [s.l.] : Artmed, 2010, 2010. p. 346–410.

ANDREOLETTI, Olivier et al. **The maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards**. [s.l: s.n.]. v. 6 Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2008.923>>
CARMEL, Ralph; MELNYK, Stepan; JAMES, S. Jill. Cobalamin deficiency with and without neurologic abnormalities: Differences in homocysteine and methionine metabolism. **Blood**, [s. l.], v. 101, n. 8, p. 3302–3308, 2003.

CHEN, Fei et al. Propionic acid production in a plant fibrous-bed bioreactor with immobilized *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 164, n. 2, p. 202–210, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.025>>

COGHETTO, Chaline Caren et al. *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 941–948, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.003>>

CONNELLY, Patrice. **Lactobacillus plantarum - A Literature Review of Therapeutic Benefits** *Journal of the Australian Traditional-Medicine Society*, , 2008.

FANG, Huan; KANG, Jie; ZHANG, Dawei. Microbial production of vitamin B12: A review and future perspectives. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–14, 2017.

FELIPE, Luiz et al. MIELOPATIA POR DEFICIÊNCIA DE VITAMINA B12 APRESENTANDO-SE COMO MIELITE TRANSVERSA. [s. l.], v. 60, n. 1, p. 150–154, 2002.

FENG, Xiaohai et al. Green and economical production of propionic acid by *Propionibacterium freudenreichii* CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 10, p. 6141–6146, 2011.

FERNANDA, Claucia et al. CHANGES IN THE MICROBIOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SERRANO CHEESE DURING MANUFACTURE AND RIPENING. [s. l.], p. 260–266, 2003.

GARDNER, N.; CHAMPAGNE, C. P. Production of *Propionibacterium shermanii* biomass and vitamin B12 on spent media. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 1236–1245, 2005.

HERBERT, V. Vitamin B-12: plant sources, requirements, and assay. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 48, p. 852–858, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/48.3.852>>

HIMMI, E. H. et al. Propionic acid fermentation of glycerol and glucose by *Propionibacterium acidipropionici* and *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 435–440, 2000.

HO, P. H.; LUO, J. B.; ADAMS, M. C. Lactobacilli and dairy propionibacterium with potential as biopreservatives against food fungi and yeast contamination. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s. l.], v. 45, n. 4, p. 414–418, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S0003683809040115>>

HUANG, Yu Liang et al. Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a C_{10} brous-bed bioreactor. [s. l.], v. 82, 2002.

HUGENHOLTZ, Jeroen et al. Nutraceutical production by propionibacteria. **Lait**, [s. l.], v. 82, p. 103–112, 2002.

HUGENSCHMIDT, Selina; SCHWENNINGER, Susanne Miescher; LACROIX, Christophe. Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum* SM39 and *Propionibacterium freudenreichii* DF13. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 1063–1070, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.021>>

IIDA, Katsumi; OHTAKA, Kuniaki; KAJIWARA, Masahiro. Mechanism of the ring contraction process in vitamin B12 biosynthesis by the anaerobe *Propionibacterium shermanii* under aerobic conditions. **FEBS Journal**, [s. l.], v. 274, n. 13, p. 3475–3481, 2007.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION., G. et al. Food microorganisms: Health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin - International Dairy Federation**, [s. l.], n. 377, p. 4–9, 2002. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14689378>>

KIATPAPAN, P.; MUROOKA, Y. Construction of an expression vector for propionibacteria and its use in production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 56, n. 1–2, p. 144–149, 2001.

KLEEREBEZEM, Michiel et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. [s. l.], 2002.

LIND, Helena et al. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 271, n. 2, p. 310–315, 2007.

MARTENS, J. H. et al. Microbial production of vitamin B12. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 275–285, 2002.

MOORE, Simon J. et al. Biochemical Society Annual Symposium No. 79 The anaerobic biosynthesis of vitamin B 12. [s. l.], p. 581–586, 2012.

PIAO, Yongzhe et al. Production of vitamin B12 in genetically engineered *Propionibacterium freudenreichii*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 98, n. 3, p. 167–173, 2004.

PIVETEAU, Pascal. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria : A review To cite this version : HAL Id : hal-00929635 Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria : A review Pascal Piveteau *. [s. l.], 1999.

PIWOWAREK, Kamil et al. Propionibacterium spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 515–538, 2018.

RAHMAN, Norafizah Abdul et al. Determination of the Use of Lactobacillus plantarum and Propionibacterium freudenreichii Application on Fermentation Profile and Chemical Composition of Corn Silage. [s. l.], v. 2017, 2017.

ROTH, John R. et al. Characterization of the Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthetic Genes of Salmonella. [s. l.], v. 175, n. 11, p. 3303–3316, 1993.

RUHAL, Rohit; CHOUDHURY, Bijan. Use of an osmotically sensitive mutant of Propionibacterium freudenreichii subspp. shermanii for the simultaneous productions of organic acids and trehalose from biodiesel waste based crude glycerol. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 109, p. 131–139, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.039>>

STABLER, S. P. **Vitamin B-12, in Present Knowledge in Nutrition**. 8th. ed. [s.l.] : B. B. Bowman and R. M. Russell, D.C, 2001.

STACKEBRANDT, Erko. Family Propionibacteriaceae: The Genus Propionibacterium. [s. l.], p. 400–418, 2006.

THIERRY, A.; MAILLARD, M. B. Production of cheese flavour compounds derived from amino acid catabolism by Propionibacterium freudenreichii. **Lait**, [s. l.], v. 82, p. 17–32, 2002.

THIERRY, Anne et al. New insights into physiology and metabolism of Propionibacterium freudenreichii. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 19–27, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026>>

XU, Miao et al. Identification of small-molecule inhibitors of Zika virus infection and induced neural cell death via a drug repurposing screen. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 10, p. 1101–1107, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.4184>>

YAZDANI, Syed Shams; GONZALEZ, Ramon. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 213–219, 2007.

YILMAZ, Sanem et al. Different Neurologic Aspects of Nutritional B12 Deficiency in Infancy. **Journal of Child Neurology**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 565–568, 2016.

ZHU, Linqi et al. Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant Propionibacterium acidipropionici. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 112, p. 248–253, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.055>>