

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Dener Acosta de Assis**

**Biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *Lactobacillus plantarum* BL011 e  
*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* em efluente ácido do  
isolamento de proteína de soja**

Porto Alegre

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Dener Acosta de Assis**

**Biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *Lactobacillus plantarum* BL011 e  
*Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* em efluente ácido do  
isolamento de proteína de soja**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. PhD. Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Porto Alegre

2019

## CIP - Catalogação na Publicação

Assis, Dener Acosta de

Biossíntese de vitamina B12 por *Lactobacillus plantarum* BL011 e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* em efluente ácido do isolamento de proteína de soja / Dener Acosta de Assis. -- 2019. 67 f.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.

Coorientador: Eliseu Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Vitamina B12. 2. Bioprocessos. 3. Probióticos. 4. Resíduos agroindustriais. I. Ayub, Marco Antônio Záchia, orient. II. Rodrigues, Eliseu, coorient. III. Título.

Dener Acota de Assis

**Biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *Lactobacillus plantarum* BL011 e  
*Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* em efluente ácido do  
isolamento de proteína de soja**

Disserta o apresentada ao Programa de Pós-  
Gradua o em Ciência e Tecnologia de Alimentos  
como requisito para a obten o do grau de Mestre  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada pela comissão examinadora:

---

Prof. PhD. Marco Ant nio Záchia Ayub – Orientador

---

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues – Co-orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Graziela Bruschi Brinques (UFSCPA)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Suse Botelho da Silva (UNISINOS)

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Rossini Augusti (PPGCTA)

Porto Alere, 27 de fevereiro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar eu agradeço ao professor Marco Ayub e ao professor Eliseu pela orientação no desenvolvimento do trabalho e a CAPES e FAPERGS pelo suporte financeiro.

Agradeço aos professores Rafael Rodrigues, Plinho Hertz e Simone Flores por disponibilizarem laboratórios, pela disponibilidade para esclarecimento de eventuais dúvidas e assim terem contribuído para o desenvolvimento do trabalho e também minha formação pessoal.

Eu sou grato por ter muitas pessoas especiais ao meu redor que são a minha base e que me dão forças para continuar na caminhada em busca dos meus sonhos. Dentre elas faço meu agradecimento especial a minha mãe por sempre estar ao meu lado me ajudando em tudo que eu precisei e me inspirando a ser uma pessoa melhor a cada dia que passa.

A minha família Acosta e os amigos de infância Dener e Lukas agradeço por todos bons momentos que recarregam as minhas energias a cada volta para casa.

Agradeço a minha madrinha Vanice e sua família por terem me acolhido com tanta boa vontade em sua casa durante os dois anos de mestrado.

Neste curto período que estou em porto alegre tive a oportunidade de conviver com pessoas incríveis dentro do laboratório, que muito mais do que colegas se tornaram grandes amigas(os). Agradeço a todos do grupo Bioteclab pela amizade e todo carinho que sempre tiveram comigo, vocês moram no meu coração, muito obrigado!

## RESUMO

A deficiência em vitamina B<sub>12</sub> ainda existe e uma das principais causas é a baixa ingestão de produtos de origem animal, afetando principalmente vegetarianos, veganos e a população de países subdesenvolvidos. Alternativas biotecnológicas vem sendo estudadas na literatura visando atender a demanda nutricional da população através da produção de vitamina B<sub>12</sub> em meios de cultivo alternativos como os resíduos agroindustriais e bio-enriquecimento de alimentos. Objetivou-se com este estudo investigar a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> utilizando o efluente agroindustrial de soja (LAPRS) como meio de cultivo alternativo de baixo custo e livre de produtos de origem animal. O LAPRS foi doado por uma empresa local e os microrganismos utilizados no estudo foram o *Lactobacillus plantarum* BL011 e a *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673. O LAPRS foi concentrado até 25% do volume inicial e caracterizado quimicamente. A quantificação da vitamina B<sub>12</sub> foi realizada em sistema HPLC-DAD e um processo de validação foi conduzido para garantir a confiabilidade dos resultados. Afim de selecionar um método adequado para extração da vitamina B<sub>12</sub>, foram testados 3 métodos comumente empregados no rompimento celular, sendo eles: calor úmido, ultrassom e moinho de bolas (pérolas de vidro). Para maximizar a biossíntese do micronutriente, a suplementação do LAPRS com elementos chave foi testada através de planejamento experimental Plackett & Burman contendo 8 variáveis analisadas em 2 níveis e 3 repetições no ponto central. A partir dos resultados obtidos nesses experimentos foi conduzido um novo planejamento experimental do tipo composto central 2<sup>2</sup> para otimizar a concentração das variáveis que apresentaram efeito positivo sobre a biossíntese. Em relação aos resultados, a análise da composição química do LAPRS concentrado revelou alta concentração de carboidratos totais (51,45 g.L<sup>-1</sup>), proteínas (12 g.L<sup>-1</sup>) e também micronutrientes como potássio (5478 mg.L<sup>-1</sup>), fósforo (527 mg.L<sup>-1</sup>) e magnésio (370 mg.L<sup>-1</sup>). Entretanto, o mineral cobalto componente central da cobalamina, não foi detectado e portanto foi uma das variáveis testadas no planejamento Plackett & Burman. O método selecionado para quantificação da vitamina B<sub>12</sub> apresentou boa linearidade ( $R^2 > 0,99$ ) nos intervalos de concentração estudados (0,25 até 5 mg.L<sup>-1</sup>). Além disso, apresentou baixos limites de detecção (0,07 mg.L<sup>-1</sup>) e quantificação (0,21 mg.L<sup>-1</sup>). Em relação a extração de vitamina B<sub>12</sub>, o método de calor úmido revelou alta eficácia frente aos demais métodos testados e foi aplicado nos experimentos posteriores. Os resultados da biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *L. plantarum* demonstraram que a linhagem foi incapaz de produzir o micronutriente na concentração detectável pelo sistema HPLC-DAD, sendo assim, somente a linhagem propiônica foi utilizada no estudo de suplementação. A suplementação do LAPRS com cloreto de cobalto, 5,6-dimetilbenzimidazol (DMBI) e cloreto de cisteína exerceu efeito positivo sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *P. freudenreichii subsp. shermanii*. O acúmulo máximo do micronutriente nas condições ótimas foi igual a 0,59 mg.g<sup>-1</sup> células. Este é o primeiro relato sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> em LAPRS e resultados promissores foram obtidos. Ainda assim, alguns parâmetros devem ser otimizados para extrair o máximo rendimento deste bioprocessos.

Palavras-chave: Vitamina B<sub>12</sub>, *Lactobacillus plantarum* BL011, *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*, resíduos agroindustriais, soja, bioprocessos.

## ABSTRACT

Vitamin B<sub>12</sub> deficiency still exists and one of the main causes is the low intake of animal products, affecting vegetarians, vegans and the population of underdeveloped countries. Biotechnological alternatives have been studied aiming to meet the nutritional demand of the population through the production of vitamin B<sub>12</sub> in alternative culture media such as agroindustrial residues and bio-enrichment of food. The objective of this study was to investigate the biosynthesis of vitamin B<sub>12</sub> using the soybean agroindustrial effluent (LAPRS) as an alternative, low-cost and animal free culture media. The LAPRS was donated by a local company and the microorganisms used in the study were *Lactobacillus plantarum* BL011 and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673. LAPRS was concentrated to 25% of the initial volume and chemically characterized. Quantification of vitamin B<sub>12</sub> was performed in the HPLC-DAD system and a validation process was conducted to ensure the reliability of the results. In order to select a suitable method for extraction of vitamin B<sub>12</sub>, 3 methods commonly used in cell disruption were tested, among them: humid heat, ultrasound and ball mill (glass beads). In order to maximize micronutrient biosynthesis, LAPRS supplementation with key elements was performed using the Plackett & Burman experimental plan containing 8 variables analyzed at 2 levels and 3 replicates at the central point. From the results obtained in these experiments, a new experimental design of the central composite 2<sup>2</sup> was conducted to optimize the concentration of the variables that had a positive effect on biosynthesis. In relation to the results, the analysis of the chemical composition of the concentrated LAPRS revealed a high concentration of total carbohydrates (51.45 g.L<sup>-1</sup>), proteins (12 g.L<sup>-1</sup>) and also micronutrients such as potassium (5478 mg.L<sup>-1</sup>) phosphorus (527 mg.L<sup>-1</sup>) and magnesium (370 mg.L<sup>-1</sup>). However, the mineral cobalt core component of cobalamin, was not detected and therefore was one of the variables tested in the Plackett & Burman design. The method selected for quantification of vitamin B<sub>12</sub> showed good linearity ( $R^2 > 0.99$ ) in the concentration ranges studied (0.25 to 5 mg.L<sup>-1</sup>). In addition, it presented low detection limits (0.07 mg.L<sup>-1</sup>) and quantification (0.21 mg.L<sup>-1</sup>). In relation to the extraction of vitamin B<sub>12</sub>, the wet heat method showed high efficacy compared to the other methods tested and was applied in the later experiments. The results of vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by *L. plantarum* demonstrated that the lineage was unable to produce the micronutrient at the concentration detectable by the HPLC-DAD system, so that only the propionic strain was used in the supplementation study. Supplementation of LAPRS with cobalt chloride, 5,6-dimethylbenzimidazole (DMBI) and cysteine chloride had a positive effect on vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis by *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. The maximum micronutrient accumulation under optimum conditions was 0.59 mg.g<sup>-1</sup> cells. This is the first report on vitamin B<sub>12</sub> biosynthesis in LAPRS and promising results were obtained. Nevertheless, some parameters must be optimized to extract the maximum yield of this bioprocess.

Key-words: Vitamin B<sub>12</sub>, *Lactobacillus plantarum* BL011, *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*, agricultural residue, soybean, bioprocess.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrutura química da vitamina B <sub>12</sub> .....	15
<b>Figura 2.</b>	Rotas metabólicas para biossíntese de vitamina B <sub>12</sub> .....	17
<b>Figura 3.</b>	Metabolismo homofermentativo e heterofermentativo das bactérias ácido lácticas.....	20
<b>Figura 4.</b>	Ciclo de Wood-Werkman utilizado pelas <i>Propionibacterium</i> spp. para produção de ácido propiônico.....	23
<b>Figura 5.</b>	Fluxograma do processo de isolamento de proteína de soja.....	25
<b>Figura 6.</b>	Composição de carboidratos do LAPRS.....	39
<b>Figura 7.</b>	Cromatograma do extrato do cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> BL011 (A), cromatograma do padrão analítico de vitamina B <sub>12</sub> (B), espectro UV do pico majoritário do extrato de <i>Lactobacillus plantarum</i> BL011 (C) e espectro UV do padrão analítico de vitamina B <sub>12</sub> (D).....	44
<b>Figura 8.</b>	Superfície de resposta gerada pelo planejamento composto central 2 <sup>2</sup> .....	51
<b>Figura 9.</b>	Cinética de crescimento da <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> ATCC 13673 em LAPRS otimizado em A) está representada a produção de vitamina B <sub>12</sub> em 168 h de cultivo; em B) o consumo de açúcares e produtos do metabolismo, onde ■ corresponde a biomassa, ✕ a produção de vitamina B <sub>12</sub> , □ a variação de pH do cultivo, ○ os açúcares totais, ▽ ácido lático, △ ácido propiônico e ● ácido acético.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Variáveis do planejamento Plackett & Burman e seus respectivos níveis.....	34
<b>Tabela 2.</b>	Variáveis do planejamento composto central $2^2$ e seus respectivos níveis.....	35
<b>Tabela 3.</b>	Atividade enzimática referente ao cultivo de <i>Aspergillus brasiliensis</i> blf1 em substrato casca de soja, fibra de soja e mistura na proporção 50:50 entre eles (Mix).....	37
<b>Tabela 4.</b>	Composição físico-química do LAPRS concentrado 4 vezes.....	38
<b>Tabela 5.</b>	Extração de vitamina B12 pelos métodos de calor úmido, moinho de bolas (esferas de vidro) e ultrassom.....	42
<b>Tabela 6.</b>	Matriz do planejamento Plackett & Burman utilizado para seleção de componentes significativos na biossíntese de vitamina B <sub>12</sub> e os resultados experimentais obtidos.....	47
<b>Tabela 7.</b>	Efeitos das variáveis independentes do planejamento Plackett e Burman sobre a biossíntese de vitamina B <sub>12</sub> .....	48

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>13</b>
2.1.	Objetivo geral.....	13
2.2.	Objetivos específicos.....	13
<b>3.</b>	<b>Revisão bibliográfica.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1.</b>	<b>Cobalamina (Vitamina B<sub>12</sub>).....</b>	<b>14</b>
3.1.1.	Estrutura química.....	14
3.1.2.	Biossíntese.....	15
3.1.3.	Absorção.....	17
3.1.4.	Funções metabólicas.....	18
<b>3.2.</b>	<b>Bactérias ácido lácticas (LAB).....</b>	<b>19</b>
<b>3.3.</b>	<b>Bactérias propiônicas (PAB).....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.</b>	<b>Efluente ácido do isolamento de proteína de soja (LAPRS).....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>Material e Métodos... ..</b>	<b>26</b>
<b>4.1.</b>	<b>Estudos prévios.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.</b>	<b>Reagentes e padrões.....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.</b>	<b>Microrganismos e amostras.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4.</b>	<b>Composição e propriedades do LAPRS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.5.</b>	<b>Preparo dos cultivos.....</b>	<b>28</b>
4.5.1.	Cultivo do <i>Lactobacillus plantarum</i> BL011.....	28
4.5.2.	Cultivo da <i>Propionibacterium freudenreichi subsp. shermanii</i> ATCC13673.....	29
<b>4.6.</b>	<b>Análise de vitamina B<sub>12</sub> por HPLC-DAD.....</b>	<b>30</b>
<b>4.7.</b>	<b>Seleção do método de extração de vitamina B<sub>12</sub>.....</b>	<b>30</b>
<b>4.8.</b>	<b>Análise de biomassa, carboidratos e ácidos orgânicos.....</b>	<b>32</b>

4.9.	<b>Influência da suplementação do LAPRS sob a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub></b> .....	32
4.10.	<b>Planejamento composto central 2<sup>2</sup></b> .....	35
4.11.	<b>Cinética de crescimento em LAPRS suplementado</b> .....	35
4.12.	<b>Análise estatística</b> .....	36
5.	<b>Resultados e Discussão</b> .....	37
5.1.	<b>Estudos prévios</b> .....	37
5.2.	<b>Composição química do LAPRS</b> .....	38
5.3.	<b>Validação do método</b> .....	41
5.4.	<b>Seleção do método de rompimento celular</b> .....	41
5.5.	<b>Investigação da produção de vitamina B<sub>12</sub> por <i>Lactobacillus plantarum</i> BL011</b> .....	42
5.6.	<b>Planejamento experimental Plackett &amp; Burman</b> .....	45
5.7.	<b>Planejamento composto central 2<sup>2</sup></b> .....	50
5.8.	<b>Cinética de crescimento nas condições otimizadas</b> .....	51
6.	<b>Conclusão</b> .....	57
7.	<b>Perespectivas futuras</b> .....	58
8.	<b>Referências bibliográficas</b> .....	59

## Introdução

A vitamina B<sub>12</sub> ou cobalamina possui a estrutura química mais complexa entre as vitaminas. No organismo humano ela atua como cofator das enzimas (R)-metilmalonil COA mutase (EC 5.4.99.2) e metionina sintase (EC 2.1.1.13). Estas enzimas são importantes no metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos e a ação da enzima metionina sintase está associada, indiretamente, a síntese de DNA (NIELSEN et al., 2012).

O organismo humano não é capaz de sintetizar a cobalamina, obtendo essa vitamina exclusivamente através da alimentação. Os alimentos mais ricos em vitamina B<sub>12</sub> são, em ordem decrescente: carne vermelha, peixes, ovos e leite. Esses alimentos por sua vez contêm a vitamina devido a ação de microrganismos ou pela dieta dos animais suplementada com o micronutriente (CHAMLAGAIN et al., 2015).

A deficiência da vitamina B<sub>12</sub> no organismo acarreta no desenvolvimento da anemia megaloblástica e problemas neurológicos como mudanças de humor e comportamento, psicose e demência. Ela pode ocorrer devido a três motivos principais, nomeadamente: (1) problemas relacionados à má absorção desse micronutriente, (2) baixa ingestão de alimentos de origem animal, e (3) infecções gastrointestinais consecutivas por microrganismos (exemplo: *Helicobacter pylori*) (MOLL; DAVIS, 2017).

Os vegetarianos, veganos, populações de países subdesenvolvidos são os grupos de pessoas com maior susceptibilidade à deficiência da vitamina B<sub>12</sub> (GREEN et al., 2017). Inúmeros estudos foram desenvolvidos nos últimos anos com o intuito de oferecer fontes alternativas de vitamina B<sub>12</sub> para atender a demanda nutricional da população (GARROD et al., 2019; TARANTO et al., 2003; XIE et al., 2018).

A síntese desse micronutriente pode ser realizada, teoricamente, de duas formas: (1) síntese química ou (2) biossíntese por microrganismos. A síntese química envolve mais de 70 etapas de reação e devido a sua complexidade é inviável para uma aplicação industrial (ESCHENMOSER, 1974). Assim, comercialmente essa vitamina é produzida através de biossíntese utilizando linhagens recombinantes de *Pseudomonas*

*denitrificans*, *Bacillus megaterium* ou *Propionibacterium freudenreichii* (SYCH; LACROIX; STEVENS, 2016).

A linhagem *Propionibacterium freudenreichii* se destaca pela ótima produção de vitamina B<sub>12</sub>, aliada a sua atribuição GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo órgão norte americano FDA (*Food and Drug Administration*) (XIE et al., 2018). Os *Lactobacillus spp.* também são seguros para aplicação em alimentos e, recentemente, duas linhagens de *Lactobacillus plantarum* foram citadas pela produção de vitamina B<sub>12</sub> (BHUSHAN; TOMAR; CHAUHAN, 2017). Assim, esses microrganismos são opções promissoras para o bio-enriquecimento de alimentos o qual é uma alternativa para aumentar o valor nutricional de produtos alimentícios através de estratégias biotecnológicas (ALBUQUERQUE, 2018).

Em bioprocessos, o meio de cultivo é um elemento essencial para o desenvolvimento microbiano e pode representar até 50% do valor final do produto. Meios de cultivo alternativos compostos por resíduos agroindustriais tem sido investigados na literatura visando, principalmente, a redução de custos do bioprocessos. Esses substratos são caracterizados pela alta disponibilidade, baixo valor agregado e aliado a uma adequada composição química (carboidratos, proteínas, minerais *etc.*) os tornam atraentes para as aplicações biotecnológicas como a obtenção de biomassa e produtos do metabolismo microbiano (HAJFARAJOLLAH et al., 2015; KOŠMIDER et al., 2012; LI et al., 2013; XIA et al., 2015).

No beneficiamento da soja para isolamento da sua proteína são gerados em torno de 50.000 m<sup>3</sup> de efluente mensalmente (COGHETTO, 2015). Esse efluente oriundo das etapas de lavagem e coagulação ácida das proteínas é denominado LAPRS - *liquid acid protein residue of soybean*. O LAPRS é fonte de macronutrientes como carboidratos, proteínas e também micronutrientes como potássio, magnésio e ferro. Ele revelou-se um meio de cultivo eficaz com ótimos resultados para o desenvolvimento de microrganismos probióticos e produção de ácido láctico (COGHETTO et al., 2016).

Entretanto, não há relatos na literatura até o momento sobre a utilização do LAPRS na biossíntese de vitamina B<sub>12</sub>.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi utilizar o LAPRS (*liquid acid protein residue of soybean*) como meio de cultivo para biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *Lactobacillus plantarum* BL011 e *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* e maximizar a produção do micronutriente através de planejamento experimental.

### 2.2 Objetivos específicos:

- Validar um método analítico para quantificar vitamina B<sub>12</sub>;
- Selecionar um método adequado para extração de vitamina B<sub>12</sub>;
- Avaliar a necessidade de suplementação do LAPRS através de planejamento experimental Plackett & Burman;
- Maximizar a produção de vitamina B<sub>12</sub> em LAPRS através de planejamento experimental composto central
- Análisar a cinética de crescimento microbiano nas condições ótimas do planejamento.

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1 Vitamina B<sub>12</sub> (cobalamina)

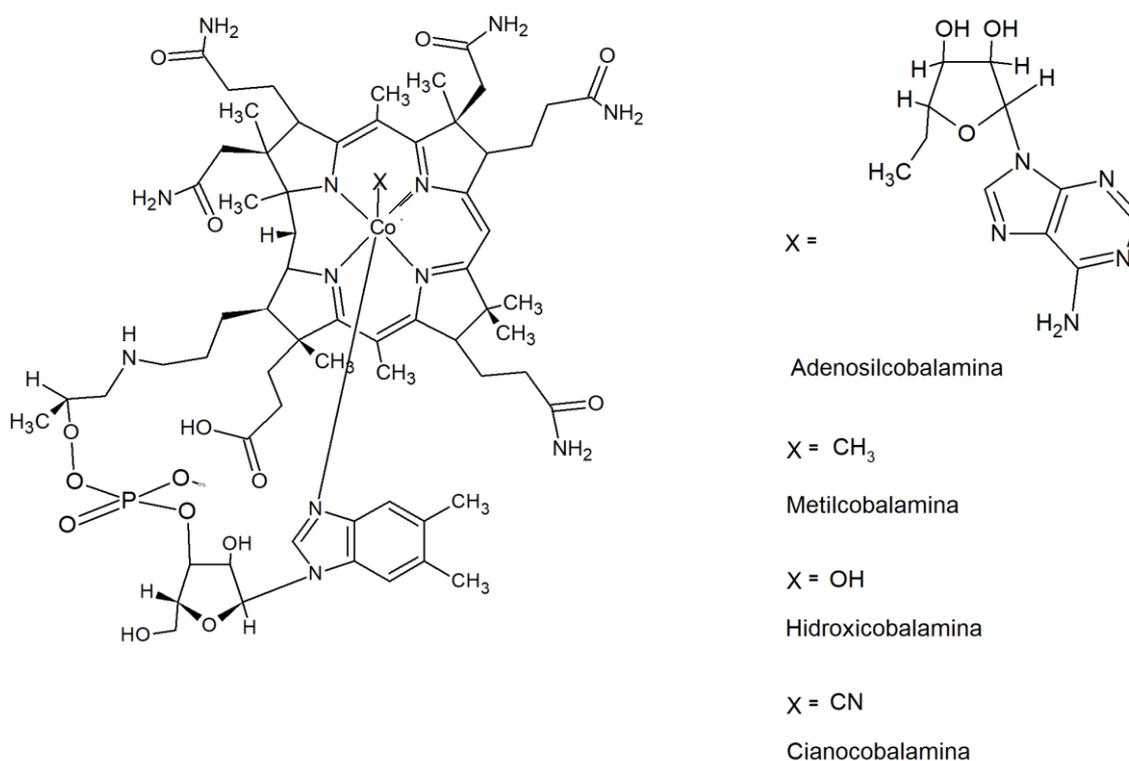
As vitaminas são moléculas orgânicas que possuem diferentes funções no organismo humano, tais como: cofator de enzimas do metabolismo (folatos e cobalamina) e no mecanismo de defesa atuando como antioxidantes (ácido ascórbico e tocoferol) dentre outras. Em geral, esses nutrientes não são sintetizados ou são em quantidades inferiores ao necessário para o funcionamento adequado do organismo humano. Assim, essas moléculas devem ser obtidas através de uma dieta equilibrada (LEBLANC et al., 2013).

Considerando a sua solubilidade, as vitaminas são classificadas em hidrossolúveis (complexo B e vitamina C) e lipossolúveis (A, D, E, K) (DAMORADAN *et al.*, 2010). Dentre as vitaminas hidrossolúveis, destaca-se a cobalamina (vitamina B<sub>12</sub>). Os primeiros relatos sobre a vitamina B<sub>12</sub> ocorreram em 1920, quando dois cientistas americanos Minot e Murphy comprovaram que uma dieta contendo fígado bovino era capaz de curar os sintomas da anemia perniciosa. Os cientistas atribuíam o sucesso da dieta a um “fator extrínseco” que o fígado continha e a sua descoberta concedeu a Minot e Murphy, juntamente com Whipple, o prêmio Nobel de medicina em 1934 (MARTENS et al., 2002).

Em torno de 20 anos após essas descobertas, duas empresas líderes no setor farmacêutico isolaram um composto vermelho cristalino a partir do fígado. O composto isolado era o “fator extrínseco” necessário para combater a anemia e, então, passou a ser chamado de vitamina B<sub>12</sub> (RICKES et al., 1948). A estrutura tridimensional da vitamina B<sub>12</sub> foi estudada por Hodkin e seu grupo de pesquisa, sendo considerada a estrutura mais complexa já vista entre as vitaminas (HODGKIN et al., 1955).

##### 3.1.1 Estrutura química

A sua estrutura química é complexa (Figura 1), sendo formada por um átomo central de cobalto ligado a 1 anel tetrapirrólico, 1 ligante axial inferior (5,6-dimetilbenzimidazol na forma ativa da molécula) e 1 ligante axial superior “X”, o qual pode ser uma molécula de desoxiadenosina (adenosilcobalamina), metil (metilcobalamina), hidroxil (hidróxicobalamina) ou cianeto (cianocobalamina) (ROTH et al., 1993). A forma de cianocobalamina não ocorre na natureza, porém devido a sua maior estabilidade química esta é a forma produzida industrialmente (MARTENS et al., 2002).



**Figura 1.** Estrutura química da vitamina B<sub>12</sub> (adaptado de MARTENS et al., 2002).

### 3.1.2 Biossíntese

Um estudo englobando mais de 100 pesquisadores foi necessário para elucidar a síntese química da vitamina B<sub>12</sub> e levou em torno de 10 anos para ser concluído. A rota química desenvolvida pelos pesquisadores é um processo complexo que envolve mais de 70 etapas de reação (ESCHENMOSER, 1974).

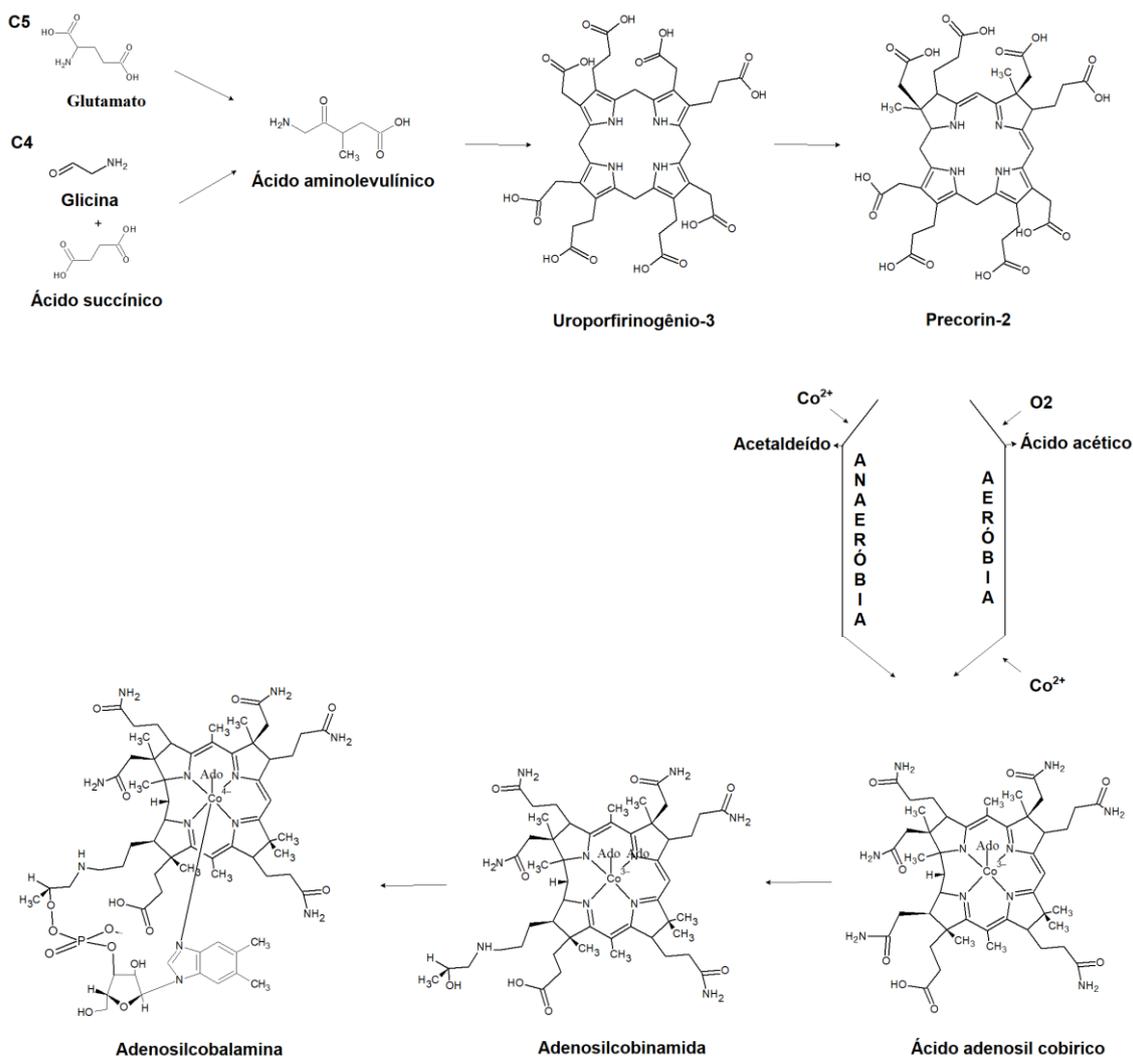
A vitamina B<sub>12</sub> não é produzida por humanos, animais ou plantas e a sua síntese química é um processo inviável comercialmente. Por outro lado, determinados microrganismos são capazes de produzi-la e são vastamente explorados para este propósito (CHAMLAGAIN et al., 2015). A biossíntese da molécula pode ocorrer através de duas rotas metabólicas, sendo elas: aeróbia ou oxigênio dependente, identificada em microrganismos como *Pseudomonas denitrificans*; ou pela rota anaeróbia ou oxigênio independente, identificada em microrganismos como *Bacillus megaterium*, *Propionibacterium freudenreichii* e *Salmonella typhimurium* (SURVASE; BAJAJ; SINGHAL, 2006).

Ambas as rotas metabólicas iniciam-se através da formação do precursor do anel tetrapirrólico, o ácido aminolevulínico (ALA) (Figura 2). Este pode ser formado a partir do rearranjo de uma molécula de glutamato (rota C5) ou a partir da combinação de uma molécula de glicina e succinil-COA (rota C4) (AVISSAR; ORMEROD; BEALE, 1989). Um anel pirrol ou porfobilinogênio é formado através da condensação de 2 moléculas de ALA. Na sequência, 4 anéis pirrólicos são polimerizados e ciclizados para formar um anel tetrapirrólico ou uroporfobilinogênio 3 o qual ainda recebe a inserção de dois grupamentos metil gerando a Precorrin-2 (JAHN; HUNGERER; TROUP, 1996).

A partir desse ponto as rotas aeróbia e anaeróbia passam a divergir. Na rota aeróbia ocorrem 8 metilações na periferia do anel antes da inserção do átomo de cobalto. Já na rota anaeróbia primeiro ocorre a inserção do átomo de cobalto no centro e após são realizadas as metilações na estrutura (RAUX et al., 1997). Outra diferença é a forma de contração do anel seguida da remoção do C-20 da estrutura. Na rota aeróbia o C-20 é oxidado pelo oxigênio molecular e liberado na forma de ácido acético. Na rota anaeróbia a contração do anel é mediada pelo próprio cobalto da estrutura, que possui a capacidade de variar o seu estado de valência entre +1 e +3 e auxilia na oxidação do C-20 que é removido na forma de acetaldeído (MARTENS et al., 2002).

As rotas voltam a convergir após a formação do ácido adenosilcobirico, o qual recebe uma molécula de amino propanol no anel D da estrutura, gerando a adenosilcobinamida. Ela é fosforilada e adicionada de uma molécula de 5,6-dimetilbenzimidazol para completar a síntese da forma coenzimática da vitamina B<sub>12</sub>, adenosilcobalamina (FANG; KANG; ZHANG, 2017). Nos processos industriais a

forma coenzimática é convertida à cianocobalamina através da substituição do ligante axial superior adenosil por um íon cianeto, conferindo maior estabilidade à molécula (SURVASE; BAJAJ; SINGHAL, 2006).



**Figura 2.** Rotas metabólicas para biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> (adaptado de MARTENS et al., 2002).

### 3.1.3 Absorção

A primeira etapa da absorção da B<sub>12</sub> ocorre no estômago onde a B<sub>12</sub> é desligada das proteínas derivadas da matriz. As condições ácidas e presença de enzimas

proteolíticas como a pepsina promovem a proteólise das proteínas ligadas a B<sub>12</sub>, liberando o micronutriente. Na sequência, ainda no estômago, a B<sub>12</sub> é ligada a outra proteína denominada haptocorrina. Essa proteína é produzida pelas glândulas salivares e tem a função de proteger a B<sub>12</sub> da degradação ácida (FEDOSOV et al., 2007).

No duodeno, a variação do pH e a degradação da haptocorrina possibilitam a ligação da B<sub>12</sub> ao fator intrínseco produzido pelas células parietais gástricas. A ligação com o fator intrínseco é essencial pois é a partir dela é que as células do íleo reconhecem o complexo B<sub>12</sub>-FI e absorvem o micronutriente. O reconhecimento se dá devido a presença de receptores nas células do íleo especializadas para absorção (enterócitos) que reconhecem e se ligam ao complexo B<sub>12</sub>-FI e permitem a absorção do micronutriente através de endocitose mediada pelo receptor (AMINOFF et al., 1999).

Nos enterócitos, a lisozima é liberada e cliva o complexo B<sub>12</sub>-FI e a vitamina B<sub>12</sub> é removida pela sua membrana basolateral, processo facilitado pela presença da proteína MDR1. Na corrente sanguínea a vitamina B<sub>12</sub> é ligada a uma transcobalamina responsável por realizar o transporte da vitamina B<sub>12</sub> no sangue e guia-la até as células que necessitem do micronutriente (FEDOSOV et al., 2007).

#### 3.1.4 Funções bioquímicas

Em seres humanos, a vitamina B<sub>12</sub> atua como cofator enzimático de duas enzimas envolvidas no metabolismo de ácidos graxos e proteínas, sendo elas: (R)-metilmalonil COA mutase e metionina síntase. A enzima metionina sintase está envolvida na síntese de nucleotídeos, junto com o folato, e é crucial na prevenção da anemia (NIELSEN et al., 2012).

A enzima metionina sintase remove um grupamento metil do cofator metilcobalamina e transfere para a homocisteína convertendo-a em metionina. O cofator desmetilado gera um radical cobalamin (I) muito reativo, o qual remove um grupamento metil da molécula de metiltetrahydrofolato. Assim o radical se estabiliza na forma de metilcobalamina e ocorre a liberação de tetrahydrofolato (GREEN et al., 2017).

O tetrahydrofolato (THF) é a forma ativa dos folatos para a síntese de timina necessária para a replicação e reparação do DNA. Sem o THF, há inibição da síntese de DNA gerando complicações características da deficiência em vitamina B<sub>12</sub>, como a

anemia megaloblástica (glóbulos vermelhos de tamanho anormais e afuncionais) e problemas neurológicos. Para a manutenção das funções no metabolismo humano é recomendada a ingestão de 2,4 µg de vitamina B<sub>12</sub> por dia (MOLL; DAVIS, 2017).

A deficiência de vitamina B<sub>12</sub> ainda ocorre mundialmente sendo gerada, principalmente, pela baixa ingestão de produtos de origem animal e por problemas na absorção do micronutriente (GREEN et al., 2017). Portanto, a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos alimentícios bio-enriquecidos com a vitamina B<sub>12</sub> e livres de produtos de origem animal tornam-se uma opção conveniente para suprir as demandas nutricionais da população (XIE et al., 2018).

### **3.2 Bactérias ácido lácticas (LAB)**

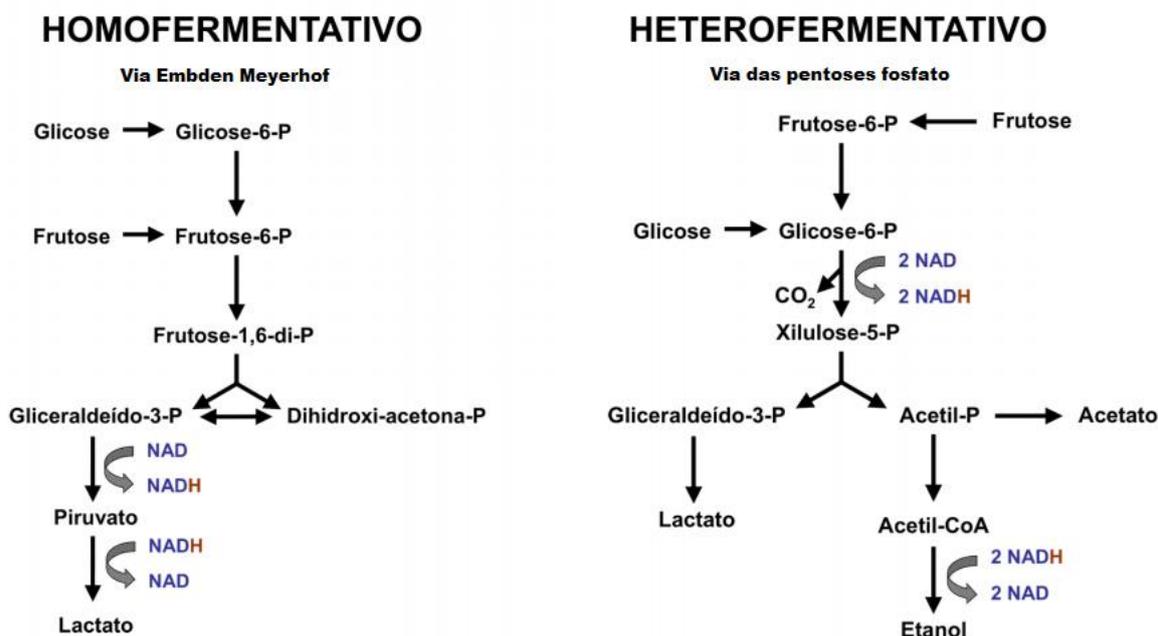
As bactérias ácido lácticas (*lactic acid bacteria* - LAB) são muito aplicadas na indústria de alimentos na produção de queijos, leites fermentados, pickles, chucrutes e bebidas. A sua aplicação deve-se a sua capacidade de produzir ácido láctico, compostos aromáticos e realçadores de sabor que contribuem com aspectos sensoriais e auxiliam na conservação dos alimentos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Elas são microrganismos gram-positivos, não-esporuladas, catalase negativa, anaeróbios facultativos, tolerantes à baixos valores de pH e produtores de ácido láctico como produto principal da fermentação (GOMES, 2009).

As LAB podem ser divididas de acordo com dois diferentes critérios, a temperatura ótima de crescimento (mesófilas e termófilas) ou em relação ao seu produto final de fermentação a partir da glicose (homofermentativas ou heterofermentativas (Figura 3). As LAB mesófilas possuem temperatura ótima de crescimento próxima a 30 °C e as termófilas desenvolvem-se melhor em temperaturas em torno de 42 °C (DONOHUE, 2004). As linhagens classificadas como homofermentativas produzem apenas ácido láctico a partir da glicose, já as heterofermentativas produzem outros compostos como ácido acético, etanol e CO<sub>2</sub> (KANDLER, 1983).

No metabolismo homofermentativo as bactérias ácido lácticas convertem a glicose ou outras hexoses à ácido láctico através da via Embden-Meyerhof ou glicólise.

Nesta via fermentativa ocorre a oxidação e quebra da molécula de glicose até formar ácido pirúvico, o qual é convertido em ácido láctico através da ação da enzima lactato desidrogenase, utilizando a coenzima NADH como doador de hidrogênio (KANDLER, 1983).

As LAB heterofermentativas utilizam a via das pentoses-fosfato para oxidar o substrato e produzir energia. Nesta via a glicose é oxidada e na sequência descarboxilada gerando uma molécula de xilulose-5P (pentose) e liberando CO<sub>2</sub>. Na sequência duas moléculas podem ser geradas a partir da quebra desta pentose, sendo



**Figura 3.** Metabolismo homofermentativo e heterofermentativo das bactérias ácido lácticas (adaptado de GOMES, 2009).

O gênero *Lactobacillus* é um dos principais dentro do grupo das LAB, sendo muito utilizado como componentes de culturas *starters* para produtos fermentados. Aliado à sua capacidade de produzir ácido láctico, alguns microrganismos deste gênero são reconhecidos pela sua ação probiótica. As linhagens probióticas são capazes de inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas, aumentar a resposta imune e

absorção de nutrientes do hospedeiro, trazendo benefícios a saúde do indivíduo. Os microrganismos que se destacam para estes fins são: *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. casei*, *L. plantarum* e *Bifidobacterium, spp* (BERNARDEAU et al., 2008).

Os *Lactobacillus spp.* também são capazes de produzir moléculas benéficas a saúde, como certas vitaminas do complexo B que podem ser utilizadas para bio-enriquecer os alimentos e aumentar o seu valor nutricional (CAPOZZI et al., 2012). A produção de cobalaminas por linhagens de bactérias ácido lácticas tem sido descrita na literatura, sendo o *Lactobacillus reuteri* CRL1098 a primeira linhagem citada com esta funcionalidade (TARANTO et al., 2003).

O *Lactobacillus plantarum* é um microrganismo versátil e muito aplicado em processos fermentativos de alimentos como queijos e leites fermentados. Ele é um microrganismo potencialmente probiótico devido a sua ação antimicrobiana e também a sua aplicação segura em alimentos (COGHETTO et al., 2016). É também um ótimo produtor de folatos (vitamina B9), capaz de produzir em torno de 350  $\mu\text{g.L}^{-1}$  em fermentações em batelada (HUGENSCHMIDT et al., 2010).

Recentemente duas linhagens de *L. plantarum*, denominadas *L. plantarum* BHM10 e *L. plantarum* BCF20, isolados de fontes humanas (leite materno e fezes infantis) demonstraram a capacidade de produzir vitamina B<sub>12</sub>, produzindo em torno de 40  $\mu\text{g.L}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente (BHUSHAN; TOMAR; CHAUHAN, 2017). Estes relatos despertam o interesse pela investigação de novas linhagens de *L. plantarum* que possuam a funcionalidade de produção de vitamina B<sub>12</sub> e, futuramente, possam ser utilizadas para produzir alimentos bio-enriquecidos com este micronutriente essencial na dieta humana.

### **3.3 Bactérias propiônicas (PAB)**

As bactérias propiônicas (*propionic acid bacteria* – PAB) são de interesse para as indústrias de cosméticos, farmacêutica e de alimentos, devido a sua produção de metabólitos de interesse como o ácido propiônico, trealose, bacteriocinas, proteases, lipases e vitamina B<sub>12</sub> (HUGENHOLTZ et al., 2002). Elas são microrganismos gram-

positivos, não esporulados, catalase-positiva, anaeróbios ou aerotolerantes, comprimento de 1 à 5 µm e morfologia de *coccus* sob condições anaeróbias. As PAB são microrganismos mesófilos, sendo geralmente 30 °C a sua temperatura ótima de crescimento, o pH ótimo é próximo a neutralidade, porém, elas se desenvolvem em uma ampla faixa de pH (4,5 a 8) (PIWOWAREK et al., 2018a).

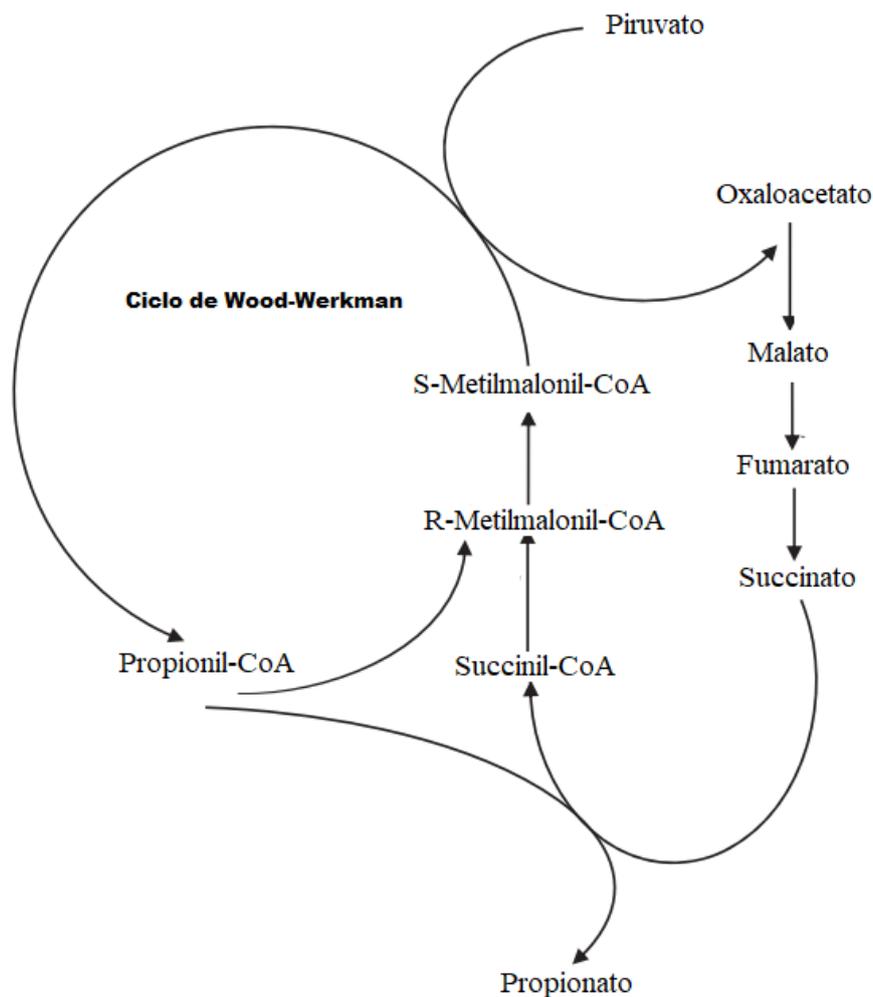
As PAB podem ser divididas em dois grupos de acordo com o seu habitat, sendo eles: cutâneas (pele) e clássicas (produtos lácteos). As PAB de origem láctea são utilizadas na maturação de queijo Suíço e também como probiótico na alimentação animal. Este grupo é composto por linhagens de *Propionibacterium freudenreichii* e suas subespécies *shermanii* e *freudenreichii* as quais diferenciam-se pela capacidade de fermentar a lactose (*P. freudenreichii* subsp. *shermanii*) e reduzir nitratos (*P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii*) (MEILE et al., 1999).

As *Propionibacterium* spp. possuem um grande quantidade de enzimas, tornando-as capazes de utilizar inúmeras fontes de carbono para o seu desenvolvimento, como: açúcares (glicose, frutose, galactose, sacarose), ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido glucônico) e polióis (glicerol e eritritol). Através do ciclo de Wood-Werkman (Figura 4) elas utilizam produtos da glicólise (coenzima NADH e piruvato) para gerar energia, produzindo ácido propiônico como principal produto de fermentação (THIERRY et al., 2011).

O ciclo se inicia na carboxilação do piruvato, convertendo-o em oxaloacetato através da ação da enzima metilmalonil-CoA carboxitransferase e seu cofator complexado biotina-CO<sub>2</sub>. O oxaloacetato é então reduzido malato, fumarato até formar uma molécula de succinato. O succinato é convertido à succinil-CoA que por sua vez é epimerizado à metilmalonil-CoA pela enzima metilmalonil-CoA mutase e seu cofator vitamina B<sub>12</sub>. A partir da metilmalonil-CoA é formada a molécula de propionil-CoA e após a ação da enzima CoA transferase a propionil-CoA é convertida em propionato (HOUWEN et al., 1991).

A vitamina B<sub>12</sub> é o cofator de uma enzima chave do metabolismo das PAB, sendo ela a metilmalonil-CoA mutase. Portanto estes microrganismos são capazes de produzir a sua própria vitamina B<sub>12</sub> através da rota anaeróbia descrita anteriormente. Para a produção industrial de vitamina B<sub>12</sub> por *Propionibacterium* spp. além de uma fonte rica em açúcares fermentescíveis e proteínas, a presença de elementos específicos

como cloreto de cisteína, minerais como o cobalto e a presença do ligante axial inferior 5,6-dimetilbenzimidazol (DMBI) são utilizados para otimizar a produção do micronutriente (WANG et al., 2015).



**Figura 4.** Ciclo de Wood-Werkman utilizado pelas *Propionibacterium* spp. para produção de ácido propiônico (adaptado de PIWOWAREK et al., 2018a).

Estudos têm sido realizados desenvolvendo meios de cultivo alternativos utilizando resíduos agroindustriais como fonte de nutrientes visando principalmente a redução de custos do bioprocesso e a potencialização da biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> (HAJFARAJOLLAH et al., 2015; KOŚMIDER et al., 2012; LI et al., 2013; XIA et al., 2015). A *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* é capaz de utilizar diversas fontes de carbono no seu metabolismo e possui poucas exigências nutricionais. Essas

características tornam-a atraente do ponto de vista industrial e tecnológico para produção de vitamina B<sub>12</sub> em meio de cultivo contendo resíduos agroindustriais (PIWOWAREK et al., 2018b).

Ela também é reconhecida como GRAS e segura para aplicação em alimentos. Sendo assim, a própria célula pode ser utilizada no bio-enriquecimento de vitamina B<sub>12</sub> em diversos produtos alimentícios. A fermentação de matrizes cereais por este microrganismo já demonstrou eficácia na produção *in situ* do micronutriente (CHAMLAGAIN et al., 2015; XIE et al., 2018).

### **3.4 Efluente ácido do isolamento de proteína de soja (LAPRS)**

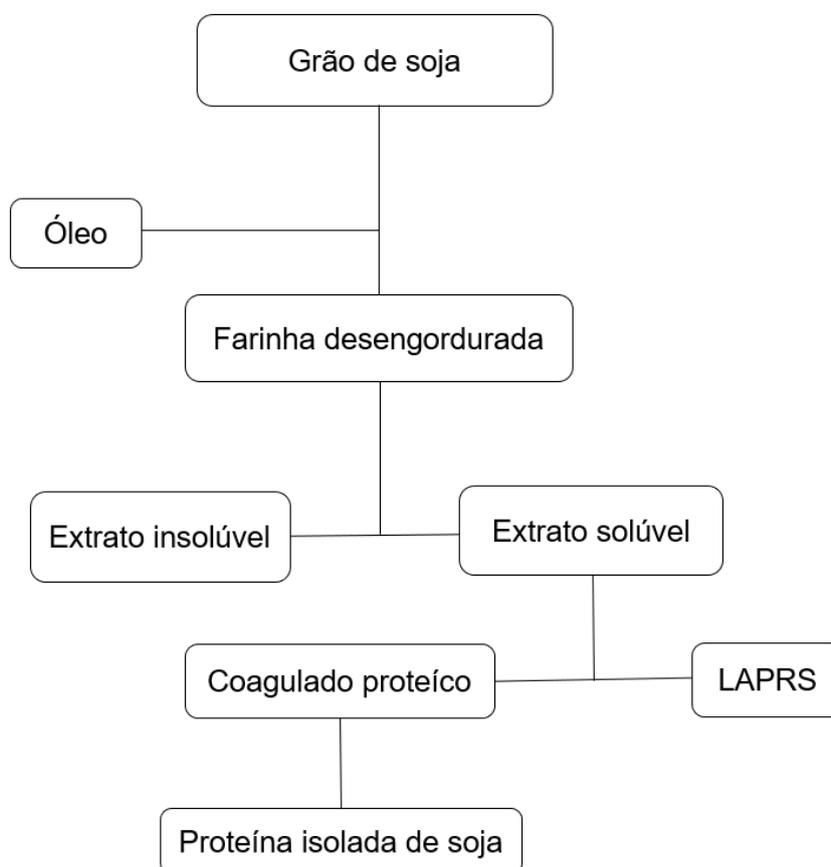
A soja (*Glycine max*) é uma das principais culturas produzidas mundialmente, sendo o Brasil segundo maior produtor do grão, com estimativa de 118 milhões de toneladas na safra 2018/2019 (CONAB, 2019). A proteína de soja é um dos principais produtos oriundos do grão, sendo aplicada em diversos produtos alimentícios industrializados como análogos de carne, bebidas e sobremesas (CHEN; ERH; SU, 2012).

Um processo genérico de isolamento da proteína de soja inicia-se pelos processos de limpeza, descascamento e remoção do seu óleo (Figura 5). A farinha desengordurada é lixiviada com solução alcalina para separar as proteínas e açúcares dos flocos desengordurados gerando um extrato solúvel (proteínas e açúcares) e insolúvel (fibras).

As proteínas do extrato solúvel são precipitadas pela adição de ácido até atingir o seu ponto isoelétrico em torno de pH 4,5, gerando um coágulo proteico ácido e um líquido ácido residual (LAPRS). O coagulado proteico ainda passa por tratamentos como lavagem, neutralização, desodorização entre outros até gerar a proteína isolada de soja com teor de proteína próximo a 90 %. O LAPRS contendo os açúcares do extrato solúvel e proteínas de baixa massa molecular, é destinado a planta de tratamento de efluente.

Em torno de 50.000 m<sup>3</sup> de efluente são gerados mensalmente no processo de isolamento da proteína de soja somente pela empresa DuPont, localizada no município

de Esteio, RS, que é a maior planta de produção de proteína isolada de soja na América Latina. Este efluente possui uma carga orgânica muito alta e precisa passar pelo tratamento de efluentes antes do seu descarte. A empresa utiliza reatores anaeróbios tipo UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) e lodos ativados por agitação prolongada (fluxo contínuo) para digerir a matéria orgânica até níveis aceitáveis para descarte de acordo com a Fundação Estadual de Proteção Ambiental – FEPAM. Em 2013 a estimativa de custo mensal para este tratamento estava em torno de R\$ 175.000,00 (COGHETTO, 2015).



**Figura 5.** Fluxograma do processo de isolamento de proteína de soja.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Estudo prévios

O objetivo inicial deste projeto era a para produção de vitamina B<sub>12</sub> a partir do cultivo de *Lactobacillus plantarum* BL011 em meio de cultivo contendo prebióticos oriundos da hidrólise enzimática de biomassa lignocelulósica. Os dados gerados não foram utilizados para elaboração do artigo científico, entretanto, fizeram parte do período inicial de mestrado. Esta secção trata sobre as análises realizadas e os protocolos utilizados nesses estudos prévios.

Para obtenção das enzimas lignocelulolíticas foram realizados cultivos em estado sólido do fungo *Aspergillus brasiliensis* blf1 testando a utilização de casca de soja, fibra de soja e uma mistura na proporção de 50:50 entre elas como substrato. Os cultivos foram realizados de acordo com condições ótimas definidas para este microrganismo em estudos prévios do grupo Bioteclab (MENEZES et al., 2018).

A recuperação do extrato enzimático bruto foi realizada adicionando 40 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 em cada frasco do cultivo, os quais foram agitados a 180 rpm, 30 °C, por 30 min em agitador orbital (*shaker*). Por fim, o fluído extracelular foi centrifugado a 3.500 g, a 4 °C por 15 min e os sobrenadantes coletados para análise da atividade enzimática.

No extrato bruto foram avaliadas as atividades das seguintes enzimas: xilanases, celulasas,  $\beta$ -xilosidases e  $\beta$ -glicosidases que participam da hidrólise da biomassa lignocelulósica e liberação dos oligossacarídeos prebióticos.

A determinação da atividade de xilanase e celulase foi realizada de acordo com método proposto por Menezes et al. (2018). Para avaliar a atividade de xilanase e celulase 1 mL de solução de xilana 1 % ou carboximetilcelulose 1 %, respectivamente, foram dispostos para reação com 1 mL de extrato enzimático bruto a 50 °C por 30 min. Então, 1 mL de ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) foi adicionado e a solução mantida a 100 °C por 5 min, e na sequência foi mensurada a absorbância da solução em 540 nm

para a quantificação dos açúcares redutores (xilose ou glicose) gerados na hidrólise enzimática. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor (xilose ou glicose) por minuto nas condições do ensaio.

As determinações de  $\beta$ -xilosidases e  $\beta$ -glicosidases foram realizadas através da hidrólise dos reagentes  $p$ -nitrofenil-  $\beta$ -D-xilosídeo (pNPX, 9 mM) e  $p$ -nitrofenil-  $\beta$ -D-glicosídeo (pNPG, 9 mM). Em tubos de ensaio, 100  $\mu\text{L}$  citrato de sódio 50 mM (pH 4,8), 100  $\mu\text{L}$  de pNPX ou pNPG e 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático bruto foram adicionados para reação. Os tubos foram incubada a 50 °C por 30 min e a reação interrompida pela adição de 1,5mL de carbonato de sódio (500mM). Após foi realizada a leitura da absorbância em 400nm, região de absorção do radical  $p$ -nitrofenil produto da hidrólise.

Por fim, uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de  $p$ -nitrofenil por minuto nas condições do ensaio.

#### 4.2 Reagentes e padrões

Para a construção das curvas analíticas foram utilizados padrão analítico de vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha), água Milli-Q (Sistema Millipore, EUA) e metanol grau HPLC da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os demais reagentes utilizados no projeto foram de grau analítico.

#### 4.3 Microrganismos e amostras

Para a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> foram utilizados os seguintes microrganismos: *Lactobacillus plantarum* BL011 e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673. O *L. plantarum* BL011 foi isolado em estudos prévios e faz parte da coleção de microrganismos do Laboratório Bioprocessos (BiotecLab), do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (SOUZA; ROSA; AYUB, 2003). A *P. freudenreichii* subsp.

*shermanii* ATCC 13673 é uma linhagem comercial e foi adquirida da fundação André Tosello, Campinas, SP.

Ambas linhagens estão cadastradas no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SisGen) e fazem parte do projeto de código A021C96.

O LAPRS foi gentilmente doado pela empresa DuPont (Esteio, RS, Brasil). O mesmo foi coletado na planta industrial de tratamento de efluentes na etapa de precipitação. O LAPRS foi coletado em recipientes de 50 L e encaminhado até o BiotecLab onde foi congelado (-18 °C) e posteriormente concentrado.

O LAPRS foi descongelado e submetido a centrifugação (a 3500 x g, por 15 min) para a remoção de partículas em suspensão. A concentração foi realizada em evaporador à vácuo na temperatura de 60 °C até redução em 4 vezes do volume inicial. O LAPRS concentrado foi armazenado em recipiente de 5 L até sua utilização no cultivo dos microrganismos.

#### **4.4 Composição e propriedades do LAPRS**

A determinação de carboidratos totais, proteínas foram realizadas de acordo com os métodos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

Os elementos minerais (potássio, fósforo, manganês, magnésio, sódio, enxofre, ferro, cálcio e cobalto) foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica (AAS) através de leitura direta em equipamento Optical Emission Spectrometer - ICP - OES, modelo Optima 8300 (Perkin Elmer, EUA). A pressão osmótica do LAPRS foi medida em equipamento osmômetro de pressão de vapor (Vapro 5520, EUA).

#### **4.5 Preparo dos cultivos**

##### **4.5.1 Cultivo do *Lactobacillus plantarum* BL011**

As células do estoque de *L. plantarum* BL011 (1 mL, DO=1) foram reativadas em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio MRS. Os microrganismos foram incubados a 37 °C, em modo estático, por 24 h. Um dos componentes do meio

MRS é o extrato de carne, o qual contém vitamina B<sub>12</sub> e os *Lactobacillus spp.* são capazes de acumular intracelularmente o micronutriente presente no meio de cultivo.

Para garantir que a vitamina B<sub>12</sub> quantificada fosse proveniente da biossíntese, realizou-se um esgotamento da vitamina B<sub>12</sub> acumulada pelo microrganismo. Para o esgotamento, as células reativadas foram cultivadas seriadamente 10 vezes em meio MRS modificado (sem extrato de carne) a 37 °C, em modo estático, por 24 h (BHUSHAN; TOMAR; CHAUHAN, 2017). Ao final do décimo cultivo foi preparado um novo estoque em glicerol com as células do microrganismo livre de vitamina B<sub>12</sub>, o qual foi congelado e armazenado a -20 °C até o preparo do inóculo.

O pré-inóculo foi realizado em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio MRS modificado, com a seguinte composição: glicose, 30 g.L<sup>-1</sup>; glicerol, 0,5 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 15 g.L<sup>-1</sup>; peptona, 10 g.L<sup>-1</sup>; acetato de sódio, 5 g.L<sup>-1</sup>; fosfato de potássio, 2 g.L<sup>-1</sup>; citrato de amônio, 2 g.L<sup>-1</sup>; sulfato de magnésio, 0,2 g.L<sup>-1</sup>; sulfato de manganês, 0,05 g.L<sup>-1</sup>; cloreto de cobalto, 15 mg.L<sup>-1</sup>; ácido glutâmico 15 mg.L<sup>-1</sup>, DMBI, 15 mg.L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado para 6,5 com ácido clorídrico 0,1 M. Em torno de 500 µL da cultura estoque foram inoculados nos frascos e incubados a 37 °C, em modo estático, até DO<sub>600</sub>= 1.

Os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyer de 50 mL contendo 27 mL de meio MRS modificado, o qual foi purgado com gás nitrogênio por 30 s para eliminar o oxigênio dissolvido e promover condições anaeróbias ao cultivo. Na sequência os frascos foram inoculados com 10 % da pré-cultura (3 mL) e incubados a 37 °C, em modo estático, por 10 h, seguido de agitação (180 rpm) por 4 h em agitador orbital (*shaker*). A fase anaeróbia inicial é necessária para a formação do anél precursor da vitamina B<sub>12</sub>, já a etapa subsequente de microaerofilia é necessária para garantir a formação e inserção do ligante axial DMBI na fração inferior da estrutura (BHUSHAN; TOMAR; CHAUHAN, 2017).

#### 4.5.2 Cultivo da *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC13673

As células do estoque da *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC13673 (1mL, DO<sub>600</sub> 1) foram reativadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de meio BF (B<sub>12</sub> free) adaptado de Hugenschmidt *et. al* (2010), substituindo a fonte de

carbono por glicose. O meio BF possui a seguinte composição: Glicose, 20 g.L<sup>-1</sup>; Extrato de levedura, 20 g.L<sup>-1</sup>; Lactato de sódio, 13 g.L<sup>-1</sup>; Tween, 0,1 g.L<sup>-1</sup>; Sulfato de manganês, 0,02 g.L<sup>-1</sup>; Sulfato de magnésio, 0,2 g.L<sup>-1</sup>; Cloreto de cisteína, 0,5 g.L<sup>-1</sup>; Cloreto de cobalto, 15 mg.L<sup>-1</sup>; DMBI, 15 mg.L<sup>-1</sup>; Tampão fosfato de potássio, 100 mL.L<sup>-1</sup> e o pH ajustado em 6,5. Os microrganismos foram incubados a 30 °C, estático, por 48 h. As células reativadas (5 mL) foram inoculadas em 45 mL de meio BF e incubadas nas mesmas condições até atingirem DO<sub>600</sub>= 1.

Os cultivos da bactéria propiônica foram realizados em frascos erlenmeyer de 50 mL contendo 27 mL de meio BF ou LAPRS, purgado com gás nitrogênio por 30 s para expulsar o oxigênio dissolvido e promover condições anaeróbias ao cultivo. Os frascos foram inoculados com 10 % da pré-cultura (3 mL, DO<sub>600</sub>= 1), e incubados a 30 °C, em modo estático, por 72 h, seguido de adição de solução de DMBI. Nesta fase de microaerofilia o cultivo foi realizado com agitação (180 rpm) por 96 h em agitador orbital (*shaker*) (HUGENSCHMIDT et al., 2010).

#### **4.6 Análise de vitamina B<sub>12</sub> por HPLC-DAD**

A análise de vitamina B<sub>12</sub> foi realizada em equipamento HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com bomba quaternária (LC-20AD), injetor automático (SIL-20A), coluna Shimadzu C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm de tamanho de partícula), forno (CTO-20A) e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A). A separação cromatográfica foi conduzida utilizando um gradiente de água e metanol (0,5 % de ácido fosfórico), temperatura do forno de 40 °C, fluxo da fase móvel de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e um volume de injeção de 20 µL. O gradiente teve as seguintes condições (água:metanol): 0,1 - 0,5 min (90:10, v/v), 0,6-6 min (60:40, v/v) e 6,1-15 min (90:10, v/v). Os cromatogramas foram processados a 361 nm (MOHAMMED et al., 2014).

O método foi validado através da avaliação dos seguintes parâmetros de desempenho: linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). Os parâmetros foram obtidos a partir da análise dos resultados de cinco curvas analíticas independentes do padrão analítico de vitamina B<sub>12</sub> no intervalo de 0,25 a 5 mg.L<sup>-1</sup>.

#### **4.7 Seleção do método de extração de vitamina B<sub>12</sub>**

Tendo em vista que a vitamina B<sub>12</sub> é um metabólito intracelular, 3 métodos comumente empregados no rompimento celular microbiano foram testados visando a extração da vitamina, nomeadamente: calor úmido, ultrassom e moinho de bolas (esferas de vidro). Os testes foram realizados com cultivos da linhagem propiônica devido a sua produção de vitamina B<sub>12</sub> conhecida.

Em um frasco erlenmeyer de 1000 mL contendo 225 mL de meio BF foram inoculados 10 % da pré-cultura do microrganismo (25 mL) e incubados conforme descrito previamente (4.4.2). As células foram recuperadas por centrifugação (4 °C, 3500 x g, 15 min) de 20 mL de caldo fermentado.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspensionado em tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7) e centrifugado (4 °C, 3500 x g, 15 min). O *pellet* celular lavado foi então ressuspensionado em 20 mL de tampão de extração (fosfato de potássio 0,1 M, pH 4,5 e cianeto de potássio 0,1 %) e os extratos foram congelados (-18 °C) até o processo de extração. Em média os extratos ficaram armazenados por 10 dias.

A extração com esferas de vidro foi realizada em tubos plásticos de 2 mL contendo 1/3 de esferas de vidro e 2/3 de suspensão celular. Os tubos foram agitados (velocidade 7) em vortex modelo CERTOMAT<sup>(R)</sup>MV (B.Braun, Alemanha) de 1 até 15 min. A extração em ultrassom foi realizada em equipamento modelo Q700 (Qsonica, EUA), operando com 5 ciclos de 30 seg de processo, seguidos de 1 min de intervalo em banho de gelo e com os seguintes percentuais de amplitude da potência (%): 20, 30 e 40. A extração por calor úmido foi testada em autoclave (Phoenix, Brasil) variando o binômio tempo x temperatura de processo entre 121 °C/15 min e 111 °C/30 min.

Os extratos obtidos foram centrifugados (4 °C, 3500 x g, 15 min) e filtrados em membrana de acetato de celulose (0,22 µm). Tendo em vista que os *Lactobacillus spp.* produzem vitamina B<sub>12</sub> em baixas concentrações, o extrato do *Lactobacillus plantarum* BL011 foi, exclusivamente, submetido a um processo pré-purificação por extração em fase sólida (SPE), visando o aumento da concentração do analito no em solução.

O processo de SPE foi realizado utilizando cartuchos Strata C18E (500 mg, 6 mL). Os cartuchos foram ativados com 2 mL de acetonitrila, carregados com 10 mL de extrato do cultivo e lavados com 12 mL de água destilada. A vitamina B<sub>12</sub> foi eluída com 6 mL de acetonitrila 50 % e o conteúdo líquido do extrato foi evaporado em

evaporador rotatório a 60 °C. O extrato seco obtido foi ressuspensão em 1 mL de diluente (água e metanol, 90:10, v/v) filtrada em membranas de acetato de celulose (0,22 µm) e analisado por HPLC-DAD.

Todo processo de extração foi realizado com o mínimo de exposição a luz para evitar a degradação da vitamina B<sub>12</sub>.

#### **4.8 Análise de biomassa, carboidratos e ácidos orgânicos**

A biomassa foi avaliada através da análise de massa seca, onde 5 mL do caldo fermentado foram centrifugados (4°C, 3500 x g, 15 min), o sobrenadante foi coletado e o *pellet* celular foi lavado com tampão fosfato (0,1 M, pH 7). O *pellet* celular foi então seco em estufa a 90 °C até massa constante. O sobrenadante coletado foi utilizado para a análise de ácidos orgânicos. Ele foi diluído 10 vezes e filtrado em membranas de acetato de celulose (0,22 µm) antes da análise em sistema HPLC.

A análise dos ácidos propiônico, láctico e acético foi conduzida em HPLC Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com bomba quaternária (LC-20AD), injetor automático (SIL- 20A), Coluna Bio-Rad HPX-87H (300 x 7,8 mm e 5µm de tamanho de partícula), forno (CTO-20A) e detector de índice de refração (RID-10A). A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico (5 mM), a temperatura de 65 °C, fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL.

Para análise qualitativa de carboidratos foi utilizado o mesmo sistema HPLC-RID, porém, equipado com coluna Coluna Bio-Rad HPX-87C (300 x 7,8 mm e 5µm de tamanho de partícula) e a fase móvel aplicada na eluição foi água deionizada, a temperatura de 45 °C, fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e volume de injeção de 20 µL. Os carboidratos totais foram analisados pelo método de Lane-Eynon, de acordo com os protocolos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

#### **4.9 Influência da suplementação do LAPRS sob a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub>**

O planejamento experimental Plackett e Burman foi aplicado com o objetivo de avaliar a influência da suplementação do LAPRS sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> do

microrganismo selecionado (*Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673). O planejamento foi composto por 8 variáveis reais e 3 variáveis inertes avaliadas em 2 níveis (Tabela 1). Foram realizados 12 experimentos e 3 repetições independentes no ponto central para mensurar o erro experimental.

Os componentes extrato de levedura, triptona,  $K_2HPO_4$  foram pesados em balança analítica e dissolvidos no próprio LAPRS. O ácido glutâmico, sulfato de ferro, cloreto de cobalto, cloreto de cisteína e DMBI foram adicionados a partir de uma solução estoque de cada componente, contendo as seguintes concentrações: ácido glutâmico,  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ; cloreto de cobalto,  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ; sulfato de ferro,  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ; cloreto de cisteína,  $100 \text{ g.L}^{-1}$  e DMBI,  $0,625 \text{ g.L}^{-1}$ . O cultivo e a extração da vitamina  $B_{12}$  por calor úmido foram realizados conforme descrito nas seções 4.4.2 e 4.6, respectivamente.

**Tabela 1.** Variáveis do planejamento Plackett & Burman e seus respectivos níveis.

Níveis	Variáveis reais							
	Extrato de levedura (g.L <sup>-1</sup> )	Triptona (g.L <sup>-1</sup> )	Fosfato de potássio (g.L <sup>-1</sup> )	Cloreto de Cisteína (mg.L <sup>-1</sup> )	Sulfato de Ferro II (mg.L <sup>-1</sup> )	Ácido glutâmico (mg.L <sup>-1</sup> )	Cloreto de cobalto (mg.L <sup>-1</sup> )	DMBI (mg.L <sup>-1</sup> )
-1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	5	5	2,5	250	15	15	15	15
1	10	10	5	500	30	30	30	30

#### 4.10 Planejamento composto central 2<sup>2</sup>

O planejamento composto central 2<sup>2</sup> foi aplicado para otimizar as concentrações das variáveis significativas definidas pelo planejamento anterior. O planejamento completo foi composto por 2 variáveis independentes testadas em 2 níveis mais 2 pontos axiais (Tabela 2). Foram realizados 8 ensaios e 3 repetições no ponto central para estimativa do erro experimental. Todos cultivos foram suplementados com sulfato de ferro (30 mg.L<sup>-1</sup>) e DMBI (30 mg.L<sup>-1</sup>), já as variáveis testadas foram adicionadas ao LAPRS conforme os níveis de cada ensaio experimental.

**Tabela 2.** Variáveis do planejamento composto central 2<sup>2</sup> e seus respectivos níveis.

Níveis	Variáveis reais	
	Cloreto de cobalto (mg.L <sup>-1</sup> )	Cloreto de cisteína (mg.L <sup>-1</sup> )
-1,41	50	250
-1	79,08	526,24
0	150	1200
1	220,92	1873,76
1,41	250	2150

#### 4.11 Cinética de crescimento em LAPRS suplementado

Com base na análise da superfície de resposta gerada pelo planejamento composto central 2<sup>2</sup> realizou-se uma cinética de crescimento nas condições de máxima produção de vitamina B<sub>12</sub> pela *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*. A seguinte suplementação foi utilizada neste experimento (mg.L<sup>-1</sup>): Cloreto de cobalto, 250; Cloreto de cisteína, 1200; Sulfato de ferro, 30 e DMBI, 30. O cultivo e a extração da vitamina B<sub>12</sub> por calor úmido foram realizados conforme descrito nas seções 4.4.2 e 4.6, respectivamente.

#### **4.12 Análise estatística**

A análise estatística (ANOVA) dos planejamentos experimentais foi conduzida no software Statistica 10.0 (StatSoft, EUA) e a análise estatística dos demais experimentos foi realizada no Microsoft Excel 2010.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Estudos prévios

Nos estudos prévios foi observado que o *Aspergillus brasiliensis* foi capaz de produzir as enzimas lignocelulolíticas em todos os substratos testados (Tabela 3). A mistura entre casca e fibra de soja (50:50), revelou-se eficaz para obtenção de uma maior atividade das enzimas xilanase e  $\beta$ -xilosidase.

**Tabela 3.** Atividade enzimática referente ao cultivo de *Aspergillus brasiliensis* blf1 em substrato casca de soja, fibra de soja e mistura na proporção 50:50 entre eles (Mix).

Substrato	Atividade enzimática (U.g <sup>-1</sup> )			
	Xilanase	$\beta$ -xilosidase	Celulase	$\beta$ -glicosidase
Casca de soja	28,2 $\pm$ 3,9	53,8 $\pm$ 8,3	3,0 $\pm$ 1,4	47,1 $\pm$ 1,53
Fibra de soja	142,1 $\pm$ 0,4	68,4 $\pm$ 7,0	3,6 $\pm$ 0,5	104,7 $\pm$ 1,24
Mix	229,2 $\pm$ 4,4	99,9 $\pm$ 10,5	4,8 $\pm$ 0,3	98,6 $\pm$ 7,53

A enzima xilanase é particularmente importante pois está envolvida na hidrólise da hemicelulose e na liberação de xilo-oligossacarídeos prebióticos que promovem o desenvolvimento seletivo de microrganismos probióticos como *Lactobacillus spp.* Por outro lado, a presença de alta atividade de  $\beta$ -xilosidase é prejudicial para obtenção de prebióticos, pois esta enzima atua hidrolisando os oligômeros formados e convertendo-os em xilose a qual é um carboidrato simples (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

Em estudos do grupo BiotecLab concomitantes a este trabalho, observou-se que apesar da alta atividade enzimática do extrato bruto do *Aspergillus brasiliensis* blf1 a hidrólise da biomassa lignocelulósica com este extrato libera baixas concentrações de oligossacarídeos prebióticos totais no meio (17 mg.g<sup>-1</sup> de substrato). Além disso, a presença de inúmeras enzimas no extrato bruto do *Aspergillus brasiliensis* blf1 promove a hidrólise de outros componentes da biomassa como a celulose e liberação de carboidratos simples não desejáveis (MENEZES et al., 2018).

Portanto, seria necessário a aplicação de etapas de purificação das enzimas do extrato bruto de *Aspergillus brasiliensis* blf1 e também otimizar a concentração e pureza dos prebióticos obtidos nesse bioprocessos. Além disso, o fator determinante para a

modificação do projeto original foi a incapacidade do *Lactobacillus plantarum* BL011 em biossintetizar a vitamina B<sub>12</sub> em concentrações detectáveis no sistema HPLC-DAD. Sendo assim, optou-se pela utilização do LAPRS como meio de cultivo de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* para dar continuidade aos trabalhos de biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> em resíduos agroindustriais de soja.

## 5.2 Composição química do LAPRS

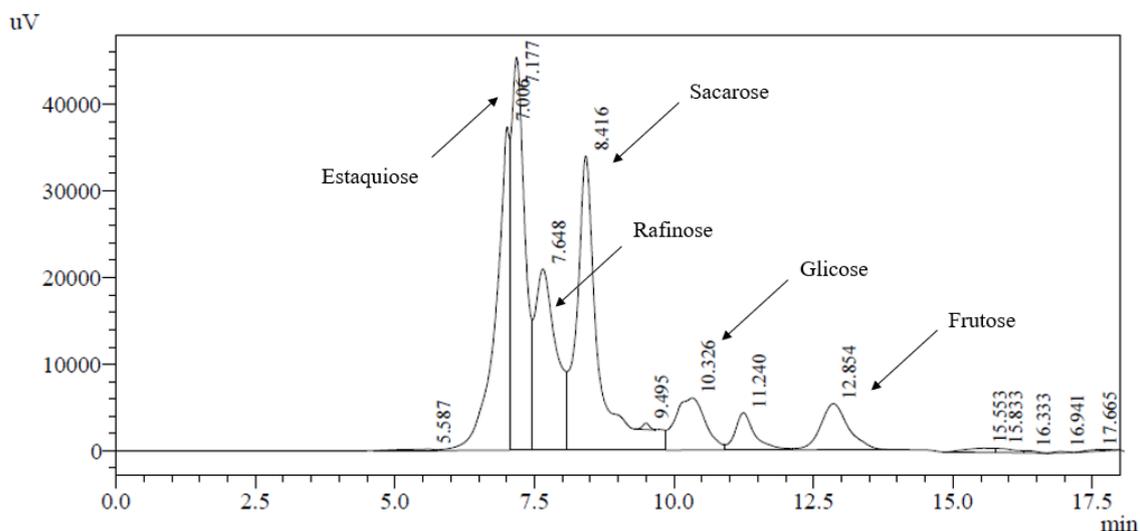
O LAPRS é rico em carboidratos (Tabela 4), o que o torna muito atraente para aplicação em bioprocessos (COGHETTO et al., 2016).

**Tabela 4.** Composição físico-química do LAPRS concentrado 4 vezes.

<b>Análise</b>	<b>Resultado</b>
<b>pH</b>	4,60 ± 0,21
<b>Carboidratos (g.L<sup>-1</sup>)</b>	51,45 ± 3,29
<b>Ácido láctico (g.L<sup>-1</sup>)</b>	1,27 ± 0,12
<b>Proteínas (g.L<sup>-1</sup>)</b>	12,00 ± 0,02
<b>Minerais (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	
<b>Potássio (K)</b>	5478,15 ± 0,64
<b>Sódio (Na)</b>	405,68 ± 0,21
<b>Cálcio (Ca)</b>	196,69 ± 0,36
<b>Fósforo (P)</b>	527,23 ± 0,43
<b>Enxofre (S)</b>	208,37 ± 0,61
<b>Magnésio (Mg)</b>	370,05 ± 0,87
<b>Mangânes (Mn)</b>	4,33 ± 0,54
<b>Ferro (Fe)</b>	2,75 ± 0,44
<b>Cobalto (Co)</b>	nd*
<b>Pressão osmótica (mmol.kg<sup>-1</sup>)</b>	500 ± 2,05

\*Não detectado

A análise quantitativa de cada carboidrato presente no LAPRS não foi viável devido a complexidade da matriz. Porém, a partir do cromatograma obtido pela análise em HPLC-IR (Figura 6), observa-se que os carboidratos majoritários são a estaquiiose, a rafinose e a sacarose.



**Figura 6.** Composição de carboidratos do LAPRS.

Os microrganismos necessitam hidrolisar estes oligossacarídeos para utilizá-los como fonte de energia. Determinados microrganismos como a *Propionibacterium acidipropionici* possuem a capacidade de expressar enzimas chave como a invertase e  $\alpha$ -galactosidase que clivam estes oligossacarídeos em açúcares fermentescíveis (YANG et al., 2018).

As proteínas de baixa massa molecular não coaguladas na etapa de coagulação ácida do processo de isolamento da proteína de soja mantêm-se no efluente e junto com rejeitos do processo (limpeza de tanques e extravases) compõe a carga proteica do LAPRS (COGHETTO, 2015). O grão de soja possui alta concentração de proteína em torno de 35 %, destacando-se das demais leguminosas. O principal aminoácido presente nas proteínas da soja é a lisina e os aminoácidos limitantes são a metionina e a cisteína (EMBRAPA, 2015).

A cisteína possui um grupamento tiol (SH) que é utilizado para conferir estabilidade a estrutura tridimensional das proteínas através das pontes de dissulfeto realizadas com outros grupamentos tióis. A presença da cisteína também auxilia na

manutenção das condições anaeróbias do cultivo, pois em contato com o ar ela tende a oxidar-se e formar cistina, reduzindo a taxa de oxigênio disponível no meio (PEIXOTO, 2013). Tendo em vista a importância deste aminoácido e o fato de que ele é limitante nas proteínas oriundas da soja, o efeito da sua suplementação sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> em LAPRS foi estudado nos experimentos seguintes.

Os minerais são elementos importantes do meio de cultivo pois são utilizados pela célula microbiana para formar proteínas, enzimas, estruturas celulares (ferro e enxofre), também participam como cofator enzimáticos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, manganês) e no metabolismo energético (fósforo) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O elemento mineral majoritário no LAPRS foi o potássio e em menores proporções também foram encontrados fósforo, enxofre, sódio, cálcio, magnésio, manganês e ferro. Entretanto, não foi detectada a presença do mineral cobalto, o qual é componente central da molécula de vitamina B<sub>12</sub> (MARTENS et al., 2002). Sendo assim, a suplementação do LAPRS com íons de cobalto também foi testada nos experimentos seguintes.

O valor de pH ácido é característico deste efluente devido a etapa de coagulação das proteínas pela adição de ácido até as mesmas atingirem o seu ponto isolétrico (em torno de pH= 4,5) e precipitarem. O pH influencia fortemente a taxa de crescimento microbiano. Altas concentrações de íons H<sup>+</sup> ou OH<sup>-</sup> modificam a configuração eletrostática das enzimas celulares, afetando também a sua atividade enzimática (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O pH ótimo de desenvolvimento da *Propionibacterium subsp. shermanii* situa-se próximo a neutralidade (PIWOWAREK et al., 2018a). Portanto, previamente a cada experimento o pH do LAPRS foi ajustado em pH 6,5 visando promover condições favoráveis ao desenvolvimento da linhagem propiônica.

Em ambiente hipertônico com altas concentrações de solutos, como açúcares ou sais, a pressão osmótica é elevada e os microrganismos perdem seu conteúdo líquido para o meio externo (mais concentrado) pelo processo de osmose. Esse fenômeno causa plasmólise celular e, conseqüentemente, inativação do microrganismo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A pressão osmótica de hidrolisados ácidos de casca de soja pode atingir valores acima de 3000 mmol.kg<sup>-1</sup> (CORTIVO et al., 2018). É recomendável que a pressão osmótica do meio de cultivo não exceda 2108 mmol.kg<sup>-1</sup>, pois este valor é suficiente para inibir o crescimento até mesmo de microrganismos osmofílicos (LIU; LIU; ZHONG, 2006). Portanto, o valor obtido para o LAPRS (500 mmol.kg<sup>-1</sup>) é considerado satisfatório para permitir o desenvolvimento microbiano.

Em geral, a composição físico-química deste lote de LAPRS foi semelhante ao relatado por Coghetto *et al.* (2016) que obteve a seguinte composição para o efluente concentrado 4 vezes (g.L<sup>-1</sup>): carboidratos totais, 40; proteínas, 8; lipídeos, 4, cinzas, 8 e pH 4,6.

### 5.3 Validação do método

Para garantir a confiabilidade do resultados gerados na quantificação da vitamina B<sub>12</sub> pelo método HPLC-DAD, um processo de validação foi conduzido. O método apresentou boa linearidade ( $R^2 > 0,99$ ) nos intervalos de concentração estudados (0,25 até 5 mg.L<sup>-1</sup>), de acordo com parâmetros estabelecidos pelo Inmetro ( $R^2 > 0,90$ ) e Anvisa ( $R^2 > 0,99$ ) (INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

Além disso, apresentou limites de detecção (0,07 mg.L<sup>-1</sup>) e quantificação (0,21 mg.L<sup>-1</sup>) baixos, o que possibilitou a quantificação com confiabilidade a vitamina B<sub>12</sub> biossintetizada pelos microrganismos estudados. Cabe destacar que o *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* produz vitamina B<sub>12</sub> na faixa de concentração (1,5 mg.L<sup>-1</sup>) que permite a sua análise direta no extrato. Enquanto isso, os *Lactobacillus spp.* produzem a vitamina B<sub>12</sub> em concentrações inferiores (20 a 100 µg.L<sup>-1</sup>), necessitando de uma etapa de pré-purificação por extração em fase sólida (SPE) visando a concentração do analito previamente à análise (BHUSHAN; TOMAR; CHAUHAN, 2017).

### 5.4 Seleção do método de rompimento celular

A vitamina B<sub>12</sub> é um metabólito intracelular, sendo assim para sua obtenção é necessária uma etapa de rompimento celular que libere a mesma para o meio (MARTENS et al., 2002). Os três métodos testados (calor úmido, moinho de bolas e ultrassom) apresentaram capacidade de liberar a vitamina B<sub>12</sub>, porém, a eficiência variou consideravelmente entre eles. Destaca-se o método de calor úmido que apresentou uma capacidade cerca de 3 vezes superior aos demais métodos testados (Tabela 5).

**Tabela 5.** Extração de vitamina B<sub>12</sub> pelos métodos de calor úmido, moinho de bolas (esferas de vidro) e ultrassom.

<b>Método de extração</b>	<b>Condição</b>	<b>Vitamina B<sub>12</sub> (mg.g<sup>-1</sup>)</b>
Calor úmido	121 °C por 15 min	0,41 ± 0,01 <sup>a</sup>
	111 °C por 30 min	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>
Moinho de bolas (esferas de vidro)	5 min	0,08 ± 0,01 <sup>b</sup>
	7 min	0,11 ± 0,03 <sup>b</sup>
	9 min	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>
	11 min	0,11 ± 0,01 <sup>b</sup>
	13 min	0,15 ± 0,01 <sup>b</sup>
	15 min	0,12 ± 0,02 <sup>b</sup>
Ultrassom	20% da amplitude	*
	30% da amplitude	*
	40% da amplitude	0,10 ± 0,01 <sup>b</sup>

\*Concentração de vitamina B<sub>12</sub> abaixo do limite de detecção.

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão (n=2).

Médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa pelo método de tukey (5% de significância).

A maior capacidade do método de calor úmido em extrair a vitamina B<sub>12</sub> está relacionado ao seu princípio. Trata-se de um método agressivo que destrói estruturas microbianas essenciais, como a parede celular e também é capaz de desnaturar proteínas transportadoras ligadas a vitamina B<sub>12</sub>. Portanto, é o processo mais empregado na literatura para extração de vitamina B<sub>12</sub>, devido a termorresistência do micronutriente e eficiência do método (LIMA et al., 2001).

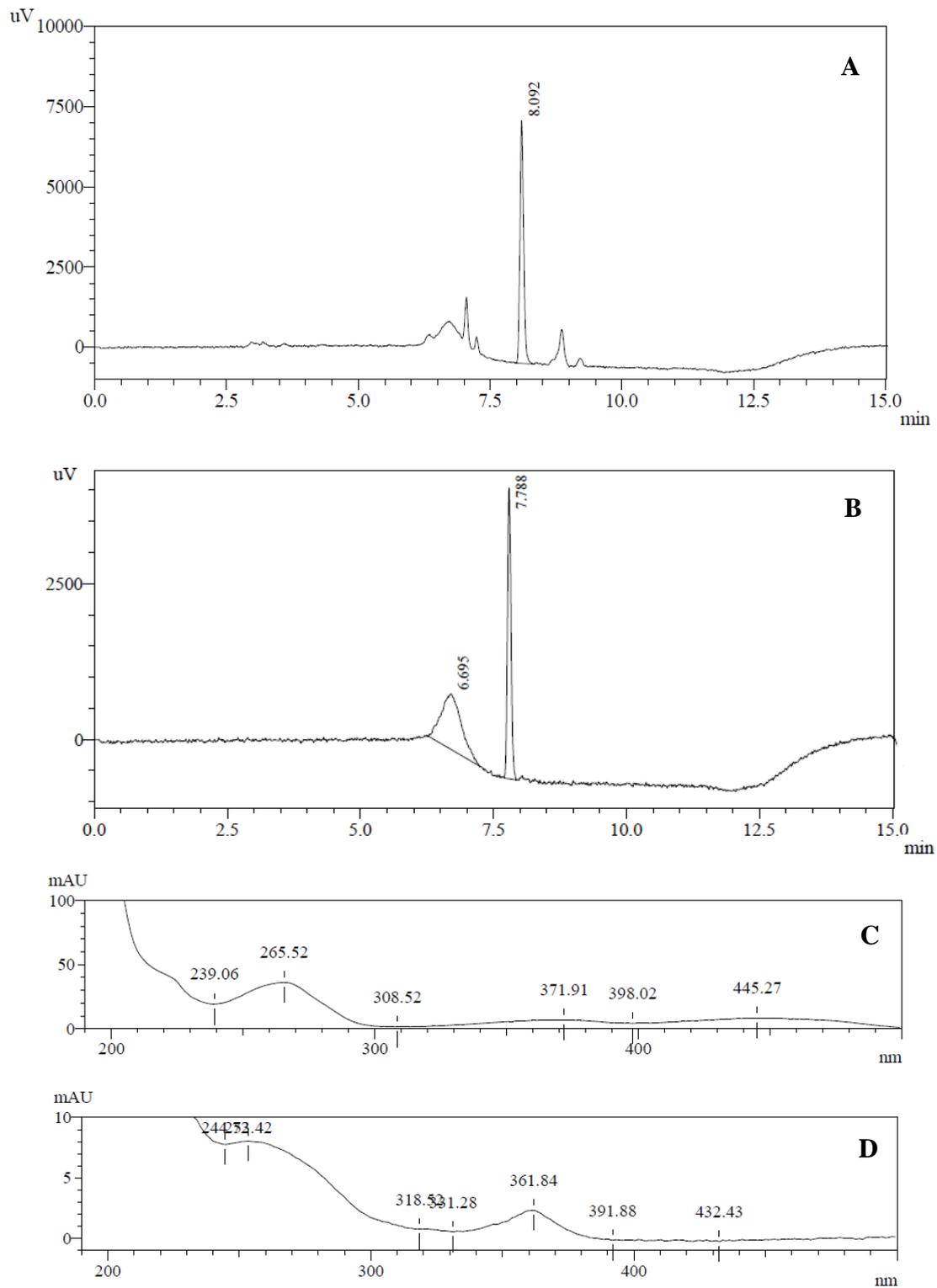
Os outros métodos testados são menos agressivos que o calor úmido, sendo comumente utilizados para extração de enzimas intracelulares ou outros metabólitos termosensíveis (MEDEIROS et al., 2008). Provavelmente estes métodos não foram eficazes em romper as ligações da vitamina B<sub>12</sub> com as suas proteínas transportadoras e possibilitar a sua quantificação. Portanto, os demais experimentos foram conduzidos pela aplicação de calor úmido para a quantificação de vitamina B<sub>12</sub>.

### **5.5 Investigação da produção de vitamina B<sub>12</sub> por *Lactobacillus plantarum* BL011**

A biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *Lactobacillus plantarum* BL011 foi investigada em meio MRS modificado. Os resultados (Figura 8-A e 8-B) indicaram que esse microrganismo não foi capaz de sintetizar a vitamina B<sub>12</sub> na concentração detectável pelo sistema HPLC-DAD (>70 µg.L<sup>-1</sup>). A análise dos resultados dos cromatogramas apresentados na figura 8 revela uma diferença entre os tempos de retenção do padrão de cianocobalamina e o pico majoritário do extrato de *L. plantarum* BL011.

Além disso, o espectro UV-Vis desses dois picos apresentou grande diferença (figura 8-C e 8-D). A vitamina B<sub>12</sub> possui um pico máximo de absorbância em torno de 361 nm, de acordo com as especificações da Farmacopeia Internacional da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2016). O padrão de cianocobalamina (Figura 8-D) apresenta este perfil de absorção característico da vitamina, já o pico majoritário do extrato do *L. plantarum* BL011 (Figura 8-C) revelou absorção máxima em 265 nm.

A diferença no tempo de retenção e nos perfis de absorção na região UV-Vis entre o padrão de vitamina B<sub>12</sub> e o composto majoritário produzido pelo *L. plantarum* BL011 indicam que os mesmos são compostos distintos.



**Figura 7.** Cromatograma do extrato do cultivo de *Lactobacillus plantarum* BL011 (A), cromatograma do padrão analítico de vitamina B<sub>12</sub> (B), espectro UV do pico majoritário do extrato de *Lactobacillus plantarum* BL011 (C) e espectro UV do padrão analítico de vitamina B<sub>12</sub> (D).

Os *Lactobacillus plantarum* são reconhecidos pela sua alta capacidade de biossintetizar outra vitamina do complexo B, a vitamina B9 ou folato (HUGENSCHMIDT et al., 2010; LI; ZHOU; GU, 2016). A partir da análise do espectro de absorção UV-Vis do pico majoritário presente no extrato de *L. plantarum* BL011 há indícios que o composto observado seja na verdade uma forma de vitamina B9 (HUGENSCHMIDT; SCHWENNINGER; LACROIX, 2011).

A produção de vitaminas pelas bactérias ácido lácticas varia consideravelmente, sendo uma característica específica de cada espécie ou dependente da linhagem (CAPOZZI et al., 2012). As linhagens de *Lactobacillus plantarum* relatadas pela produção de vitamina B<sub>12</sub> foram isoladas de fontes humanas (leite materno e fezes infantis) e, portanto podem ter adquirido a capacidade biossintética de outros microrganismos produtores de vitamina B<sub>12</sub> presentes no organismo humano (BHUSHAN; TOMAR; MANDAL, 2016). Entretanto, o *Lactobacillus plantarum* BL011 foi isolado de queijo serrano e pode não possuir esta funcionalidade (SOUZA; ROSA; AYUB, 2003).

Sendo assim, a linhagem *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 foi utilizada para dar continuidade aos trabalhos de biossíntese de vitamina B<sub>12</sub>. A linhagem propiônica também é segura para aplicação em alimentos (GRAS) e possui a capacidade reconhecida de produzir vitamina B<sub>12</sub> a partir de diversos substratos (PIWOWAREK et al., 2018b).

## 5.6 Planejamento experimental Plackett & Burman

Os microrganismos variam quanto a sua necessidade nutricional, mas em geral, necessitam de uma fonte de carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais para obtenção de energia e biossíntese de novos componentes celulares (BORZANI et al., 2001). Em relação a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* além dos macronutrientes, a presença de íons de cobalto e do ligante inferior 5,6 dimetilbenzimidazol é essencial para maximizar a biossíntese do micronutriente (KOŚMIDER et al., 2012).

A influência da suplementação do LAPRS com fonte externa de proteína e aminoácidos, assim como microelementos envolvidos no metabolismo e/ou precursores da vitamina B<sub>12</sub> foi avaliada através do planejamento experimental Palckett & Burman. A matriz do planejamento e os resultados experimentais estão presentes na tabela 6 e os efeitos estimados de cada variável sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> obtidos através da análise de variância (ANOVA) estão presentes na tabela 7.

A maior produção de vitamina B<sub>12</sub> foi obtida nas condições do ensaio 8 (Tabela 6), com a produção de vitamina atingindo a concentração de 0,29 mg.g<sup>-1</sup>. As variáveis que apresentaram efeito significativo sobre a produção de vitamina B<sub>12</sub> foram o cloreto de cobalto e o 5,6-dimetilbenzimidazol. Estes compostos quando adicionados ao LAPRS exerceram efeito positivo sobre a biossíntese da vitamina B<sub>12</sub>.

**Tabela 6.** Matriz do planejamento Plackett & Burman utilizado para seleção de componentes significativos na biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> e os resultados experimentais obtidos.

Ensaio	Variáveis codificadas											Biomassa (g.L <sup>-1</sup> )	Vitamina B <sub>12</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	VI1	VI2	VI3		
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	7,52	0,20
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	8,72	0,08
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	6,04	0,07
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	7,18	0,09
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	8,12	0,17
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	7,84	0,09
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	5,9	0,10
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	3,44	0,29
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	3,56	0,19
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	7,6	0,13
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	6,26	0,17
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3,36	0,00
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,46	0,19
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,64	0,19
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,76	0,19

X1= Extrato de levedura; X2= Triptona; X3= Fosfato de potássio; X4= Cloreto de cisteína; X5= Sulfato de Ferro II; X6= Ácido glutâmico; X7= Cloreto de cobalto; X8= DMBI; VI1, VI2, VI3 são variáveis inertes do planejamento.

**Tabela 7.** Efeitos das variáveis independentes do planejamento Plackett e Burman sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub>.

Variável	Efeito	Valor de p
<b>Extrato de levedura</b>	-0,015	0,5575
<b>Triptona</b>	-0,042	0,1354
<b>Fosfato de Potássio</b>	0,012	0,6463
<b>Cloreto de Cisteína</b>	0,038	0,1637
<b>Sulfato de Ferro</b>	0,045	0,1118
<b>Ácido glutâmico</b>	-0,012	0,6463
<b>Cloreto de Cobalto*</b>	0,085	0,0125
<b>DMBI*</b>	0,072	0,0251

Erro padrão= 0,024160; R<sup>2</sup>=0,8378

\*Estatisticamente significativo ao nível de significância de 95 %.

A disponibilidade de íons cobalto no meio de cultura é essencial para biossíntese da vitamina B<sub>12</sub>, tendo em vista que o mesmo é o componente central do anel corrinóide (ROTH et al., 1993). Em preparações comerciais de vitamina B<sub>12</sub> (5 mg.10 mL<sup>-1</sup>) das marcas Dexalgen<sup>®</sup>, Citoneurin<sup>®</sup> e Cronobê<sup>®</sup>, a concentração de íons cobalto na estrutura vitamínica situou-se em torno de 65 a 252 mg. L<sup>-1</sup>, respectivamente (ADOLFO et al., 2016).

O mecanismo do efeito de sais de cobalto na biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> ainda não foi esclarecido, entretanto, a presença deste componente no meio de cultivo de linhagens propiônicas tem se revelado benéfico para biossíntese do micronutriente (HAJFARAJOLLAH et al., 2015; KOŚMIDER et al., 2012; PIWOWAREK et al., 2018b). Portanto, visando maximizar a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> a concentração do cloreto de cobalto foi otimizada em um novo experimento.

A presença do DMBI no meio de cultivo também foi significativa para biossíntese da cobalamina, provavelmente, porque este é o ligante axial inferior da sua estrutura molecular. A *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* possui o gene BluB/CobT2 necessário para produzir o seu próprio DMBI a partir da fragmentação e contração do mononucleotídeo de flavina em presença de oxigênio (DEPTULA et al., 2015). Porém, provavelmente a fração de DMBI biossintetizada pela bactéria não é suficiente para converter totalmente a molécula de adenosil cobinamida

em vitamina B<sub>12</sub>, e o rendimento do processo é menor em ausência do precursor como pode ser observado no ensaio 3 (Tabela 6).

O DMBI é comumente adicionado ao meio de cultura da bactéria após a formação da estrutura base, em aproximadamente 72 h de cultivo, sob condições de microaerofilia para permitir a sua inserção no anel e maximizar a biossíntese da cobalamina (MARTENS et al., 2002). A concentração de DMBI utilizada em cultivos de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* varia de 0,9 a 30 mg.L<sup>-1</sup>, devido a sua baixa solubilidade em água e potencial toxicidade para a célula (KOŚMIDER et al., 2012; WANG et al., 2015). Sendo assim, a concentração desta molécula foi fixada em 30 mg.L<sup>-1</sup> nos demais experimentos.

O extrato de levedura e a triptona são produtos ricos em proteínas e aminoácidos capazes de estimular o desenvolvimento microbiano, sendo aplicados em meios de cultivo de inúmeros microrganismos (BORZANI et al., 2001). A suplementação do LAPRS com extrato de levedura e triptona estimulou fortemente a produção de biomassa de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* (Tabela 6), porém, não exerceu efeito significativo sobre a biossíntese da vitamina B<sub>12</sub> (Tabela 7). Então, nos experimentos seguintes não foi realizada a suplementação do LAPRS com fonte extra de proteínas.

O glutamato é um intermediário da rota C5 utilizada pelos microrganismos na produção do ácido aminolevulínico (ALA), precursor do anel tetrapirrólicos (AVISSAR; ORMEROD; BEALE, 1989). A suplementação do LAPRS com ácido glutâmico não exerceu efeito significativo sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*. Provavelmente ácido glutâmico adicionado não foi assimilado pela linhagem ou não foi utilizado para produção do precursor. Assim, a suplementação com ácido glutâmico não foi realizada nos experimentos futuros.

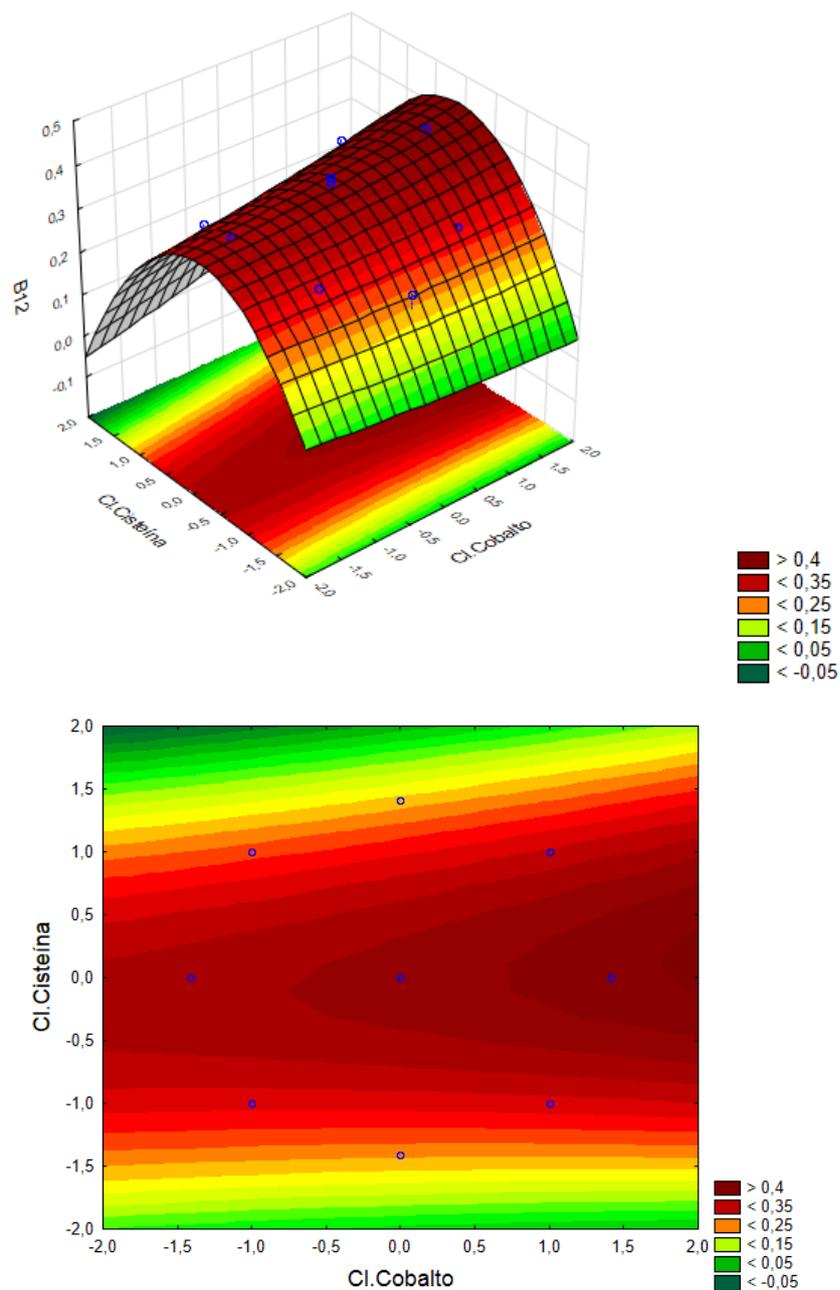
As variáveis cloreto de cisteína, sulfato de ferro II e fosfato de potássio exerceram efeito positivo, porém, não significativo. O cloreto de cisteína foi selecionado para otimização devido ao seu efeito positivo sobre a biossíntese da vitamina aliado a sua importância biológica e composição do LAPRS deficiente deste aminoácido, assim como os demais produtos oriundos da soja (EMBRAPA, 2015).

## 5.7 Planejamento composto central 2<sup>2</sup>

Com base nos dados obtidos no planejamento Plackett & Burman as variáveis cloreto de cobalto e cloreto de cisteína foram testadas em um planejamento composto central, visando a maximização da biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> em LAPRS. A superfície de resposta gerada pelos dados experimentais do planejamento obteve coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) igual a 0,9611 e está apresentada na figura 8.

Pode-se observar que o cloreto de cobalto exerceu efeito positivo sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub>. Por outro lado, o cloreto de cisteína em determinadas concentração (<500 mg.L<sup>-1</sup> e > 1800 mg.L<sup>-1</sup>) passou a causar efeito negativo. De acordo com a superfície de resposta, a máxima produção vitamina B<sub>12</sub> (acima de 0,4 mg.g<sup>-1</sup>) pode ser obtida utilizando o cloreto de cobalto e o cloreto de cisteína nas concentrações de 250 e 1200 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

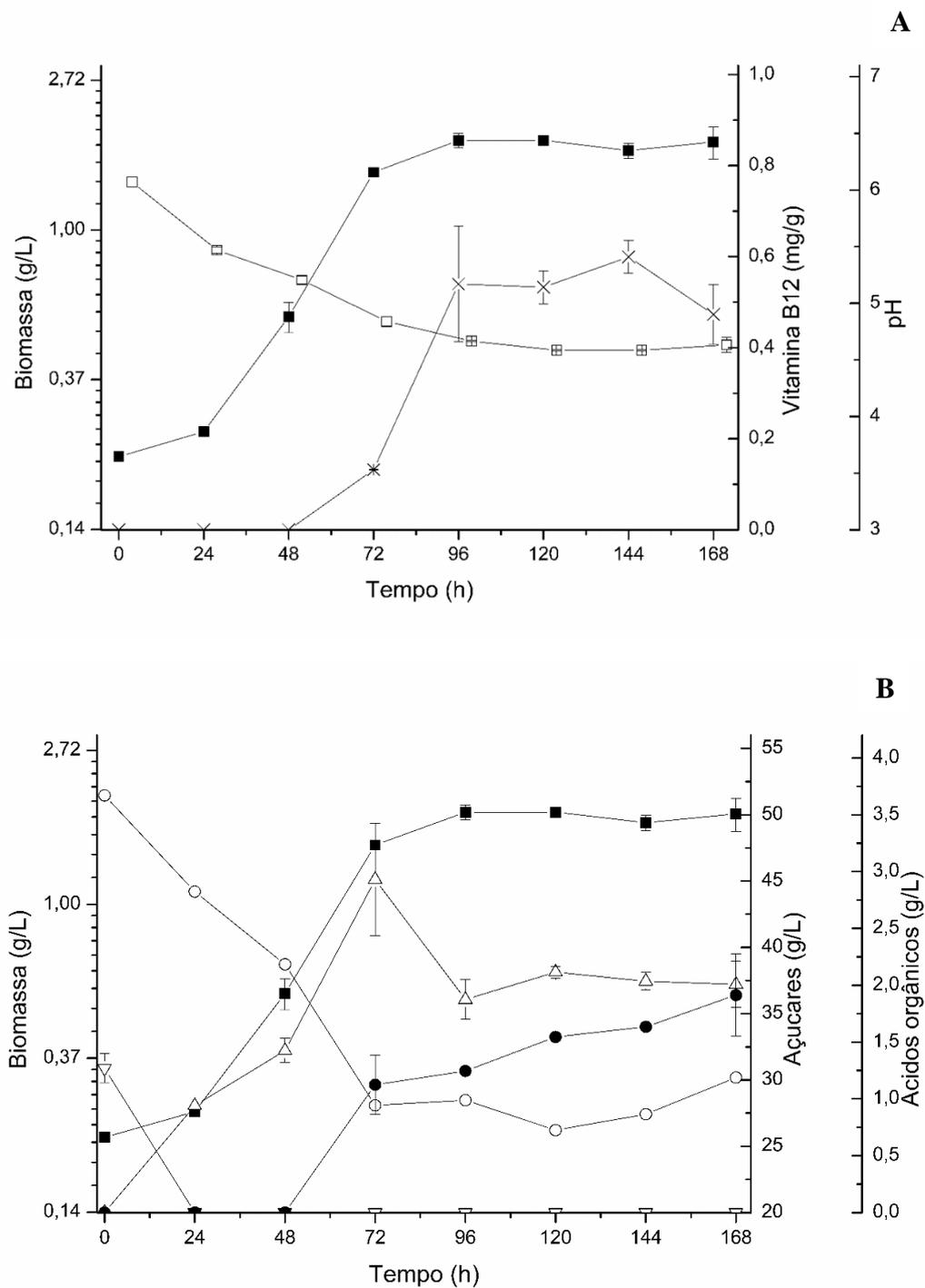
Para validar o modelo um experimento foi realizado em triplicata nas condições ótimas geradas pela análise da superfície de resposta obtendo produção de vitamina B<sub>12</sub> (mg.g<sup>-1</sup>) igual a 0,47 ± 0,06, validando experimentalmente o modelo estatístico.



**Figura 8.** Superfície de resposta gerada pelo planejamento composto central  $2^2$ .

### 5.8 Cinética de crescimento nas condições otimizadas

A cinética de crescimento da *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* em LAPRS suplementado nas condições de máxima produção de vitamina B<sub>12</sub> está disposta na figura 9.



**Figura 9.** Cinética de crescimento da *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC 13673 em LAPRS otimizado em A) está representada a produção de vitamina B<sub>12</sub> em 168 h de cultivo; em B) o consumo de açúcares e produtos do metabolismo, onde ■ corresponde a biomassa, × a produção de vitamina B<sub>12</sub>, □ a variação de pH do cultivo, ○ os açúcares totais, ▽ ácido lático, △ ácido propiônico e ● ácido acético.

A presença de vitamina B<sub>12</sub> foi observada somente após 72 h de cultivo em concentração igual a 0,13 mg.g<sup>-1</sup> (Figura 9-A). É nessa etapa que inicia-se a fase de

microaerofilia no sistema e a presença de oxigênio é necessária para que o microrganismo biossintetize o ligante inferior (DMBI) ou realize a união do mesmo à estrutura base da vitamina pré-formada (DEPTULA et al., 2015).

O máximo acúmulo de vitamina B<sub>12</sub> intracelular (0,59 mg.g<sup>-1</sup>) foi obtido em 144 h de cultivo. Resultado semelhante foi evidenciado em cultivo de *Propionibacterium freudenreichii* CICC 10019 em processo de batelada convencional (0,61 mg.g<sup>-1</sup>) e processo de batelada acoplada com sistema para remoção de ácido propiônico ISPR - *in situ product removal* (0,54 mg.g<sup>-1</sup>) (WANG et al., 2012). A biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por 27 linhagens de *Propionibacterium* em meio de cultivo contendo permeado de soro de leite revelou grande variação no acúmulo de B<sub>12</sub> intracelular (0,02 - 0,25 mg.g<sup>-1</sup>). Esta variação se deu devido a presença de lactose no meio de cultura a qual não foi assimilada por todas as linhagens afetando a formação de produtos do seu metabolismo (CHAMLAGAIN et al. 2016).

Em cultivos utilizando apenas o glicerol como fonte de carbono o acúmulo de vitamina B<sub>12</sub> por *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* atingiu menores valores de vitamina B<sub>12</sub> intracelular (0,27 mg.g<sup>-1</sup>) (KOŚMIDER et al., 2012). Aplicando a estratégia de co-fermentação de glicose/glicerol e sistema de ISPR em processo fermentativo de *Propionibacterium freudenreichii* os resultados obtidos aumentaram consideravelmente (0,72 mg.g<sup>-1</sup>) (WANG; JIAO; LIU, 2014). A partir desses resultados pode-se constatar que a composição do meio de cultivo (tipos de carboidratos, proteína e etc) assim como a condução do bioprocessamento interferem no acúmulo de produtos do metabolismo das linhagens propiônicas.

Na literatura, os resultados de vitamina B<sub>12</sub> são expressos normalmente de forma volumétrica (mg.L<sup>-1</sup>, µg.L<sup>-1</sup>, ηg.mL<sup>-1</sup> dentre outras unidades), o que não revela uma resposta clara sobre a eficiência da célula microbiana em biossintetizar o micronutriente. Em nosso grupo de pesquisa (Bioteclab) a resposta da biossíntese é expressa em função do acúmulo de B<sub>12</sub> intracelular, o que dificulta a comparação com os dados da literatura. Entretanto, pode-se constatar que a linhagem propiônica utilizada neste estudo foi capaz de acumular vitamina B<sub>12</sub> em concentrações adequadas aos relatos encontrados na literatura.

Em relação ao consumo de substratos, observa-se na figura 9-B que a *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* foi capaz de consumir totalmente o ácido láctico, porém, consumiu apenas 41 % dos carboidratos disponíveis no meio. O consumo de carboidratos pela linhagem propiônica cessou em aproximadamente 72 h de cultivo e a biomassa atingiu seu valor máximo igual a  $1,82 \text{ g.L}^{-1}$  em 96 h e manteve-se estável até o final do bioprocesso (Figura 9-B). O LAPRS é composto majoritariamente pelos oligossacarídeos estaquiose, rafinose e sacarose (Figura 6) e a presença deles pode explicar o baixo consumo de açúcares totais e biomassa obtidos neste estudo.

Anteriormente foi demonstrado que a *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* é capaz de clivar dissacarídeos como a sacarose em seus monossacarídeos constituintes e utilizá-los como fonte de carbono. Porém, o consumo da sacarose é menor em relação a glicose e frutose, consumindo em torno de 27 % do dissacarídeo em solução, comportamento similar ao observado neste estudo. O tipo de carboidrato também afetou o desenvolvimento da linhagem, quando a glicose foi substituída por sacarose ocorreu redução da biomassa de 2,8 para 1,4 (expresso em  $\text{DO}_{600}$ ) (PIWOWAREK et al., 2018b).

Em estudo similar, a presença de lactose, oriunda do permeado de soro de leite, no meio de cultivo das *Propionibacterium* spp. tendeu a reduzir o desenvolvimento de determinadas linhagens. A biomassa medida através de  $\text{DO}_{600}$  atingiu valores em torno de 1,2 para as linhagens incapazes de consumir o dissacarídeo do meio. Por outro lado, valores de  $\text{DO}_{600}$  iguais a 17,8 foram obtidos pelas linhagens capazes de consumir a lactose, demonstrando a influência do tipo de carboidrato sob a produção de biomassa de *Propionibacterium* spp. (CHAMLAGAIN et al., 2016).

Cultivos em batelada de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* utilizando lactose do soro de leite como fonte de carbono revelaram baixos valores de biomassa em torno de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho (MARWAHA; SETHI; KENNEDYT, 1983). Em cultivo de *Propionibacterium freudenreichii* em batelada Wang et al. (2012) obtiveram melhores resultados de biomassa ( $6 \text{ g.L}^{-1}$ ). Entretanto, o meio de cultivo deste microrganismo foi formulado com alta concentração de glicose ( $60 \text{ g.L}^{-1}$ ) e fonte proteica ( $40 \text{ g.L}^{-1}$ ), que combinados estimulam a produção de biomassa, mas não necessariamente a biossíntese de vitamina intracelular  $\text{B}_{12}$  (LIMA et al., 2001).

Kosmider *et al.* (2012) obtiveram ótimos valores de biomassa ( $14 \text{ g.L}^{-1}$ ) utilizando glicerol como fonte de carbono através da otimização da composição do meio de cultivo com fonte externa de proteína (hidrolisado de caseína) e precursores da vitamina B<sub>12</sub>. Wang, Jiao e Liu (2014) também obtiveram alta concentração de biomassa ( $31 \text{ g.L}^{-1}$ ), porém, aplicando estratégia de batelada alimentada em biorreator de 5 L acoplado com sistema ISPR para remoção de ácido propiônico.

Com base nos dados, pode-se inferir que a linhagem *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* utilizada neste estudo não foi capaz de utilizar eficientemente os oligossacarídeos presentes no LAPRS, devido aos baixos valores de biomassa e ácidos orgânicos obtidos (Figura 9-B).

O ácido propiônico e ácido acético são os principais produtos do metabolismo de microrganismos do gênero *Propionibacterium*. A célula microbiana direciona o piruvato, oriundo da glicólise, para redução produzindo propionato ou para oxidação produzindo ácido acético e CO<sub>2</sub> visando manter o seu balanço redox. Este fenômeno é dependente da fonte de carbono. Quando glicose é utilizada a proporção entre ácido propiônico e acético é próxima a 2:1, comportamento similar foi observado (Figura 9-B) nos cultivos da *P. freudenreichii subsp. shermanii* (THIERRY *et al.*, 2011).

Neste estudo foram obtidos baixos valores de ácido propiônico e também de ácido acético ( $2,93 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,91 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente). O pico de concentração máxima de ácido propiônico foi observado ao fim da fase anaeróbia do cultivo (72 h) e a sua concentração foi reduzida após o início da fase de microaerofilia (Figura 9-B), permanecendo estável até o final do cultivo. Já a concentração máxima de ácido acético foi obtida em 168h de cultivo.

A concentração de ácido propiônico produzida por linhagens propiônicas varia de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  utilizando *Propionibacterium freudenreichii* até  $106 \text{ g.L}^{-1}$  através de modificação genética de *Propionibacterium acidipropionici* (WANG *et al.*, 2012; ZHANG; YANG, 2009). Altas concentrações de ácido propiônico causam efeito inibitório no desenvolvimento microbiano (MARSHALL, 1994). Entretanto, a manutenção da sua concentração em torno de  $10$  a  $20 \text{ g.L}^{-1}$ , como observado neste estudo, revelou-se benéfica para a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> por *Propionibacterium freudenreichii* (WANG *et al.*, 2015). A baixa concentração de ácido propiônico obtida

neste estudo é interessante para a biossíntese da vitamina B<sub>12</sub>, porém pode ser um indício da incapacidade do microrganismo em utilizar eficientemente os carboidratos disponíveis no meio.

O fenômeno de consumo de ácido propiônico e aumento na concentração de ácido acético observado a partir de 72h (Figura 9-B), é característico da presença de oxigênio no meio de cultivo da *Propionibacterium freudenreichii*. Em condições de microaerofilia ocorre uma interrupção na produção de ácido propiônico enquanto o ácido acético continua sendo produzido a partir da oxidação do piruvato (YE et al., 1999).

Associado a produção dos ácidos orgânicos ocorre a queda nos valores de pH, como pode ser observado na figura 9-A. Valores de pH em torno de 4,5 inibem o desenvolvimento da *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (MASHAYEKH, 2017). O pH interfere na configuração eletrostática das enzimas microbianas, incluindo as enzimas responsáveis pela biossíntese de vitamina B<sub>12</sub>, resultando na redução da biossíntese do micronutriente. Assim, a estratégia de controlar o pH próximo a neutralidade, entre 6,5 e 7, é recomendada para se obter máxima atividade enzimática e aumentar a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> (PIWOWAREK et al., 2018b).

## 6. Conclusão

O método de extração de vitamina B<sub>12</sub> por calor úmido foi mais eficaz dentre os métodos testados. Em relação a quantificação do micronutriente, o método selecionado revelou-se adequado e com ótima linearidade no intervalo testado além de baixos limites de detecção e quantificação. Apesar disso, a presença de vitamina B<sub>12</sub> no extrato do cultivo de *Lactobacillus plantarum* BL011 não foi evidenciada. Provavelmente a concentração do micronutriente ficou abaixo do limite de detecção do método HPLC-DAD ou o microrganismo não foi capaz de biossintetizá-lo.

O LAPRS foi utilizado com sucesso como meio de cultivo para a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> pela *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* ATCC13673. Após a otimização, o acúmulo intracelular do micronutriente situou-se dentro da faixa de valores relatados na literatura para este microrganismo. Entretanto, o fato de os carboidratos do LAPRS não serem prontamente fermentescíveis pode ter afetado o desenvolvimento do microrganismo e, conseqüentemente, baixos valores de biomassa foram obtidos nos cultivos.

Este é o primeiro relato até o momento sobre a utilização do LAPRS para biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> e resultados promissores foram obtidos. Contudo, mais estudos são necessários a fim de potencializar principalmente a produção de biomassa da linhagem e assim extrair o máximo rendimento deste bioprocessos.

## 7. Perspectivas futuras

Com estes resultados, podemos sugerir alguns trabalhos futuros com vistas à otimizar o processo de produção de vitamina B<sub>12</sub> e uso de resíduos industriais:

- Avaliar a influência de uma etapa de hidrólise dos oligossacarídeos presentes no LAPRS sobre a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub> e de produção de biomassa;

- Realizar experimentos em biorreatores para otimização de parâmetros do bioprocesso como controle de pH, concentração de oxigênio e agitação na fase de microaerofilia;

- Testar estratégia de ISPR (*in situ product removal*) para a remoção de ácido propiônico, visando potencializar a biossíntese de vitamina B<sub>12</sub>;

- Testar estratégia de batelada alimentada visando aumento de biomassa microbiana;

- Aplicar a biomassa de *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* em produtos alimentícios;

- Avaliar a resistência e liberação da vitamina B<sub>12</sub> em matriz alimentícia simulando as condições do trato gastrointestinal humano.

## 8. Referências bibliográficas

ADOLFO, Franciele Rovasi et al. Simultaneous determination of cobalt and nickel in vitamin B12 samples using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 147, p. 241–245, 2016.

ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo.

AMINOFF, M. et al. Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. **Nature Genetics**, v. 21, p. 309–313, 1999.

AVISSAR, Yael J.; ORMEROD, John G.; BEALE, Samuel I. Distribution of 6-aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups. **Archives of Microbiology**, v. 151, p. 513–519, 1989.

BERNARDEAU, Marion et al. Safety assessment of dairy microorganisms : The Lactobacillus genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 278–285, 2008.

BHUSHAN, Bharat; TOMAR, S. K.; CHAUHAN, Arun. Techno-functional differentiation of two vitamin B12producing Lactobacillus plantarum strains: an elucidation for diverse future use. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 2, p. 697–709, 2017.

BHUSHAN, Bharat; TOMAR, S. K.; MANDAL, Surajit. Phenotypic and genotypic screening of human-originated lactobacilli for vitamin B12production potential: process validation by micro-assay and UFLC. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6791–6803, 2016.

BORZANI, Walter et al. **Biotechnologia industrial: Fundamentos**. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

CAPOZZI, Vittorio et al. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins : a great potential for functional cereals products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1383–1394, 2012.

CARR, Frank J.; CHILL, Don; MAIDA, Nino. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical reviews in Microbiology**, v. 28, p. 281–370, 2002.

CHAMLAGAIN, Bhawani et al. Ultra-high performance liquid chromatographic and mass spectrometric analysis of active vitamin B12 in cells of Propionibacterium and fermented cereal matrices. **Food Chemistry**, v. 166, p. 630–638, 2015.

CHAMLAGAIN, Bhawani et al. Effect of the lower ligand precursors on vitamin B12 production by food-grade Propionibacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 117-124. 2016.

CHEN, Kuan-i; ERH, Mei-hui; SU, Nan-wei. Soyfoods and soybean products : from traditional use to modern applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 9–22, 2012.

COGHETTO, Chaline Caren et al. Lactobacillus plantarum BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 941–948, 2016.

Coghetto, C. C., 2015. Produção e encapsulamento de Lactobacillus plantarum e estudos de estabilidade e aplicação em formulação alimentar. Tese (Dotourado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – PPGCTA/ UFRGS).

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 6, p. 1–174, 2019.

CORTIVO, Paulo Roberto Dall et al. Industrial Crops & Products Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of Saccharomyces cerevisiae under diverse oxygen environments. **Industrial Crops & Products**, v. 113, p. 10–18, 2018.

DAMORADAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DEPTULA, Paulina et al. BluB / CobT2 fusion enzyme activity reveals mechanisms responsible for production of active form of vitamin B 12 by Propionibacterium freudenreichii. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 1–12, 2015.

DONOHUE, D. C. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. v.1, p. 531-546, 2004.

Embrapa. Manual de análise de solo, ed. 2. Embrapa, Rio de Janeiro. 1997.

ESCHENMOSER, A. Organische Naturstoffsynthese heute Vitamin B12 als Beispiel. **Die Naturwissenschaften**, v. 61, p. 513–525, 1974.

FANG, Huan; KANG, Jie; ZHANG, Dawei. Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 15, 2017.

FEDOSOV, S. N. et al. Mechanisms of discrimination between cobalamins and their natural analogues during their binding to the specific B12-transporting proteins. **Biochemistry**, v. 46, p. 6446–6458, 2007.

GARROD, Marjorie G. et al. Vitamin B12 added as a fortificant to flour retains high bioavailability when baked in bread. **Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, B**, v. 438, p. 136–140, 2019.

GOMES, Fernanda Sgarbosa. Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica. 2009.

GREEN, Ralph et al. Vitamin B12 deficiency. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1-17, 2017.

HAFARAJOLLAH, Hamidreza et al. Vitamin B12 biosynthesis over waste frying sunflower oil as a cost effective and renewable substrate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3273–3282, 2015.

HODGKIN, DC et al. Structure of vitamin B12. **Nature**, v. 176, p. 325–328, 1955.

HOUWEN, Frans P. et al. Propionate metabolism in anaerobic bacteria; determination of carboxylation reactions with <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1056, p. 126–132, 1991.

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

HUGENSCHMIDT, Selina et al. Screening of a natural biodiversity of lactic and propionic acid bacteria for folate and vitamin B12 production in supplemented whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 852–857, 2010.

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**, v. 46, p. 1063–1070, 2011.

Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, ed. 4.

Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. 2008.

JAHN, D.; HUNGERER, C.; TROUP, B. Ungewöhnliche Wege und umweltregulierte Gene der bakteriellen Hämbiosynthese. **Naturwissenschaften**, v. 83, p. 389–400, 1996.

KANDLER, Otto. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria The term “ lactic acid bacteria ” gradually emerged in the years around the. v. 49, p. 209–224, 1983.

KOŚMIDER, Alicja et al. Vitamin B12 production from crude glycerol by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*: Optimization of medium composition through statistical experimental designs. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 128–133, 2012.

LEBLANC, Jean Guy et al. Bacteria as vitamin suppliers to their host: A gut microbiota perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, 164–168, 2013.

LI, Kun Tai et al. Establishment of beet molasses as the fermentation substrate for industrial vitamin B12 production by *Pseudomonas denitrificans*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2013.

LI, Ping; ZHOU, Qingqing; GU, Qing. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ227, a potential probiotic strain producing B-group vitamins. **Journal of Biotechnology**, v. 234, p. 66–70, 2016.

LIMA, Urgel de almeida et al. **Biotechnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 1. ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

LIU, Hong-juan; LIU, De-hua; ZHONG, Jian-jiang. Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium. v. 41, p. 473–476, 2006.

MARSHALL, Douglas L. Mechanism of inhibited growth of *Bacillus pumilus* by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*. v. 22, n. 93, p. 11–22, 1994.

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

MARWAHA, S. S.; SETHI, R. P.; KENNEDY, J. F. Influence of 5,6-dimethylbenzimidazole (DMB) on vitamin B12 biosynthesis by strains of *Propionibacterium*. v. 5, 1983.

MASHAYEKH, Seyed Morteza. Effects of process variables on fed-batch production of propionic acid. v. 12, 2017.

MEDEIROS, Fabiana Oliveira De et al. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. v. 31, n. 2, p. 336–339, 2008.

MEILE, Léo et al. Classification of propionic acid bacteria and approaches to applied genetics To cite this version : Original article and approaches to applied genetics. **Le Lait**, v. 79, p. 71–78, 1999.

MENEZES, Silva et al. Comparative production of xylanase and the liberation of xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass by *Aspergillus brasiliensis* BLf1 and recombinant *Aspergillus nidulans* XynC. **International journal of food science and technology**, v. 53, p. 2110–2118, 2018.

MOHAMMED, Y. et al. Capability of *Lactobacillus reuteri* to Produce an Active Form of Vitamin B12 under Optimized Fermentation Conditions. **Journal of Academia and Industrial**, v. 2, n. 11, p. 617–621, 2014.

MOLL, Rachel; DAVIS, Bernard. Iron, vitamin B12 and folate. **Medicine (United Kingdom)**, v. 45, n. 4, p. 198–203, 2017.

NIELSEN, Marianne J. et al. Vitamin B12 transport from food to the body's cells - A

sophisticated, multistep pathway. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 9, p. 345–354, 2012.

PIWOWAREK, Kamil et al. Propionibacterium spp.—source of propionic acid, vitamin B12, and other metabolites important for the industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018. a.

PIWOWAREK, Kamil et al. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by Propionibacterium freudenreichii strain T82. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, 2018. b.

RAUX, E. et al. A role for Salmonella typhimurium cbiK in cobalamin (vitamin B12) and siroheme biosynthesis. **Journal of bacteriology**, v. 179, p. 3202–3212, 1997.

RICKES, E. et al. Crystalline vitamin B12. **Science**, v. 107, p. 396–397, 1948.

ROTH, John R. et al. Characterization of the Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthetic Genes of Salmonella typhimurium. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 175, p. 3303–3316, 1993.

SOUZA, Cláudia Fernanda Volken De; ROSA, Tiziano Dalla; AYUB, Marco Antônio Záchia. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 260–266, 2003.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, p. 39–67, 1997.

SURVASE, A.Shrikant; BAJAJ, B.Ishwar; SINGHAL, S.Rekha. Biotechnological Production of Vitamins. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 381–396, 2006.

TARANTO, Maria P. et al. Lactobacillus reuteri CRL1098 Produces Cobalamin. **Journal of bacteriology**, v. 185, p. 5643–5647, 2003.

THIERRY, Anne et al. New insights into physiology and metabolism of Propionibacterium freudenreichii. **International Journal of Food Microbiology**, v.

149, p. 19–27, 2011.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Vandamme, E.J., Revuelta, J.L. Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants, 1 ed. Wiley, Weinheim. 2016.

WANG, Peng et al. Novel in situ product removal technique for simultaneous production of propionic acid and vitamin B12 by expanded bed adsorption bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 652–659, 2012.

WANG, Peng et al. Improved propionic acid and 5,6-dimethylbenzimidazole control strategy for vitamin B12 fermentation by *Propionibacterium freudenreichii*. **Journal of Biotechnology**, v. 193, p. 123–129, 2015.

WANG, Peng; JIAO, Youjing; LIU, Shouxin. Novel fermentation process strengthening strategy for production of propionic acid and vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 1811–1815, 2014.

XIA, Wei et al. Industrial vitamin B12 production by *Pseudomonas denitrificans* using maltose syrup and corn steep liquor as the cost-effective fermentation substrates. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, p. 1065–1073, 2015.

XIE, Chong et al. In situ fortification of vitamin B12 in wheat flour and wheat bran by fermentation with *Propionibacterium freudenreichii*. **Journal of Cereal Science**, v. 81, p. 133–139, 2018.

YANG, Hopen et al. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, 2018.

YE, Kaiming et al. Metabolic Pathway of *Propionibacterium* Growing with Oxygen : Enzymes , <sup>13</sup>C NMR Analysis , and Its Application for Vitamin B 12 Production with Periodic Fermentation. **Biotechnology progress**, v. 15, p. 201-204, 1999.

ZHANG, An; YANG, Shang-tian. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidipropionici*. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1346–1351, 2009.