

# Seleção de bactéria produtora de ácido láctico por via fermentativa, utilizando diferentes fontes de carbono

Raissa Gabriela Martins Reis Barroso<sup>1</sup>, Fabricio Machado<sup>2</sup>, Mônica Caraméz Triches Damas<sup>3</sup>, Sílvia Belém Gonçalves<sup>4</sup>

## Resumo

O ácido láctico é um ácido orgânico com aplicações em diversas indústrias e que é obtido por rota química ou biológica (fermentação). Dentre os diferentes microrganismos utilizados em fermentações, as bactérias lácticas apresentam vantagens, visto que naturalmente produzem o ácido láctico, são resistentes a pH ácido e a uma ampla faixa de temperaturas, além de muitas vezes produzirem o ácido láctico como metabólito principal. Neste trabalho, quatro cepas de bactérias (*Enterococcus durans*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactic* e *Weissella thailandensis*) isoladas de leite de búfalas foram submetidas a fermentações com diferentes fontes de carbono (lactose, sacarose, glicose). *E. durans* teve o melhor desempenho, exaurindo as fontes de carbono, produzindo 18,44 g/L de (L)-ácido láctico com pureza óptica com um rendimento de 0,92 g/g e produtividade de 0,29 g/L h<sup>-1</sup> a partir de glicose associada com sacarose ou lactose. O ácido láctico produzido tem potencial para ser recuperado do meio fermentativo e ser utilizado em diversas aplicações.

**Termos para indexação:** *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus durans*, *Weissella thailandensis* e *Lactococcus lactis*, fermentação, L-(+)-ácido láctico.

## Introdução

O ácido láctico é um ácido carboxílico amplamente utilizado nas indústrias química, farmacêutica, de alimentos e de polímeros. Além disso, é um ácido orgânico com grupos funcionais que possibilita sua transformação química em novas moléculas para diversas aplicações (Ouyang et al., 2013).

Uma das principais aplicações do ácido láctico é na indústria de polímeros, uma vez que pode ser modificado quimicamente e ser empregado como unidade monomérica para a produção de derivados do poli (ácido láctico) (PLA). Além disso, como os plásticos derivados do petróleo têm gerado considerável acúmulo de resíduos no meio ambiente, demandando períodos longos para sua degradação, torna-se fundamental a produção de plásticos renováveis. (Esmaeili et al., 2017)

A fermentação é uma das principais formas de obtenção do ácido láctico. Diversas fontes de carbono, microrganismos e processos fermentativos são estudados visando à otimização da produção desse ácido. (Komesu et al., 2017) Açúcares como lactose, glicose e sacarose são amplamente utilizados nos processos fermentativos, uma vez que podem ser fermentados diretamente a ácido láctico. (Li; Cui, 2010) No mercado global atual, o ácido láctico é proveniente da cana-de-açúcar e do milho. O baixo custo e a abundância desses insumos viabilizam sua utilização na produção. (Jamshidian et al., 2010) Durante o processo fermentativo, as bactérias são capazes de produzir os isômeros dextrogiro ou levogiro. As enzimas L(+) ou D(-) lactato desidrogenase (nLDH), presentes nas células bacterianas, são as responsáveis pela produção dos enantiômeros. (Hofvendahl; Hahn-Hägerdal, 2000)

<sup>1</sup> Química industrial, doutoranda em Química, Universidade de Brasília, raissa.barroso@colaborador.embrapa.br.

<sup>2</sup> Engenheiro químico, doutor em Engenharia Química, Universidade de Brasília, fmachado@unb.br

<sup>3</sup> Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

<sup>4</sup> Engenheira química, doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

As bactérias lácticas são bactérias gram-positivas que usam carboidratos como principal fonte de carbono (George et al., 2018). Tais microrganismos são geralmente cocos ou bastonetes e têm forte tolerância a pH ácido. Os gêneros mais utilizados em fermentações são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Weissella*. (Mokoena, 2017) Tais bactérias também são capazes de produzir acetato, propionato, formato e succinato. (Kuley et al., 2020)

Neste trabalho, quatro cepas (*Pediococcus acidilactici*; *Enterococcus durans*; *Weissella thailandensis* e *Lactococcus lactis*) foram estudadas com a finalidade de avaliar a produção de ácido láctico, explorando diferentes fontes de carbono e parâmetros de fermentação, possibilitando a otimização da formação do produto de interesse.

## Materiais e métodos

**Pré-inóculo** – por causa da estocagem em ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , primeiramente, os microrganismos foram submetidos a uma fase de adaptação no mesmo meio utilizado no processo de bioconversão. Essa primeira etapa foi realizada em meio MRS ágar, em estufa, por 48 horas a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O pré-inóculo foi cultivado em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do meio MRS autoclavado. Os frascos foram então incubados em shaker a 180 rpm e  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 horas.

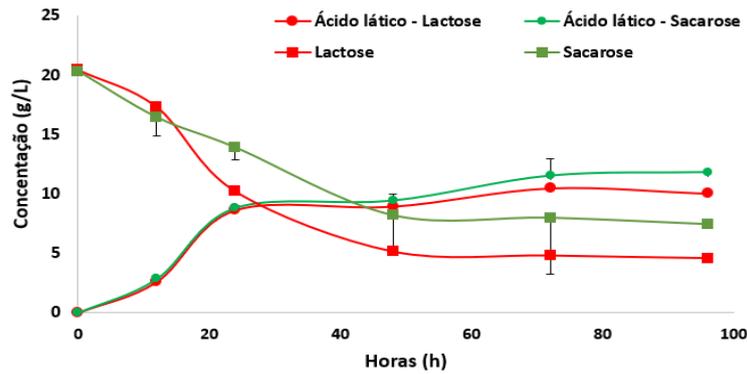
**Fermentação** – a concentração do inóculo usado foi de aproximadamente 1,5 (OD600nm) e foi realizado para as três fontes de carbono em tubos tipo Falcon de 50 mL contendo 30 mL de meio MRS modificado com 20 g/L de sacarose ou lactose (fontes para produção de ácido láctico) e 10 g/L de glicose (fonte preferencial para crescimento celular). De 24 horas em 24 horas, amostras foram retiradas para análises quantitativas de ácido láctico e da fonte de carbono e da densidade óptica (OD600nm) para verificar o crescimento celular.

**Análises** – as alíquotas coletadas durante as fermentações foram analisadas em HPLC. As amostras foram injetadas em coluna Aminex HPX-87H a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  com fase móvel de 0,005 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 0,6 mL/min. de vazão. As quantificações foram realizadas com detector de índice de refração, de acordo com a curva-padrão para cada analito. Para a identificação do enantiômero do ácido láctico produzido, o detector de arranjo de diodo DAD (254 nm) e a coluna Chirex 3126 (D)-Penicillamine foram utilizados. A fase móvel foi  $\text{CuSO}_4$  0,001 mol/L com vazão de 1 mL/min. a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . (López-Gómez et al., 2020)

## Resultados e discussão

### Avaliação da produção de ácido láctico e consumo de substrato por *P. acidilactici*

Os experimentos foram conduzidos por 96 horas. Ao final desse tempo, a bactéria *P. acidilactici* exauriu a glicose para ambos os ensaios, e a melhor condição para a *P. acidilactici* foi a fermentação com sacarose. A Figura 1 mostra a produção de ácido láctico e o consumo de cada fonte.

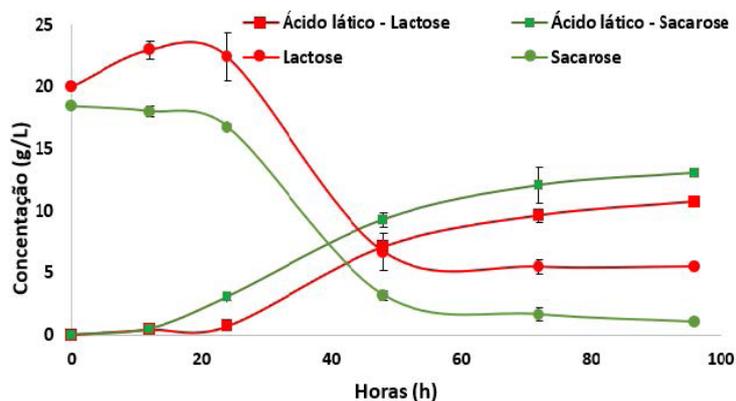


**Figura 1.** Fermentação com *P. acidilactici* utilizando glicose e sacarose ou lactose como fontes de carbono para produção de ácido láctico e crescimento celular.

A bioconversão das fontes de carbono avaliadas apresentou valores absolutos de produção menores (Tabela 1) do que os relatados por Juodeikiene e colaboradores (2016), que avaliaram a bioconversão de subprodutos agroindustriais sólidos em ácido láctico usando a cepa *P. acidilactici* KTU05–7 e obtiveram 20,18 g/kg de ácido láctico em 48 horas de fermentação. Porém, o resultado do experimento com sacarose e glicose aqui apresentado alcançou rendimento maior (0,94 g/g) do que aquele relatado por Zhang et al. (2021), que utilizaram a *P. acidilactici* para produzir ácido láctico, alcançando 31,9 g/L, com rendimento de 0,742 g/g com glicose e xilose.

### Avaliação da produção de ácido láctico e consumo de substrato por *W. thailandensis*

A melhor condição de fermentação para a *W. thailandensis* foi a fermentação com glicose e sacarose como fontes de carbono. A bactéria exauriu a glicose nas primeiras 24 horas de experimento para ambas as fontes. A Figura 2 apresenta os resultados de consumo das fontes de carbono correlacionadas com a produção de ácido láctico, e a Tabela 2 mostra os resultados dos parâmetros de produção, rendimento e produtividade obtidos para as diferentes fontes de carbono.



**Figura 2.** Fermentação com *W. thailandensis* utilizando glicose e sacarose ou lactose como fontes de carbono para produção de ácido láctico e crescimento celular.

Nagarajan et al. (2022) relataram que, por meio de fermentações em batelada, utilizando glicose a 40 g/L no meio com algas marinhas hidrolisadas, produziram 17,48 g/L de ácido láctico com *Weissella* sp. e 20 g/L de ácido láctico com *W. paramesenteroides*, consumindo 88% da glicose, com rendimento de 0,68 g/g. *W. thailandensis* foi capaz de produzir ácido láctico com rendimento maior (Tabela 1) que o obtido em fermentações com glicose realizadas por Nagarajan et al. (2022). Além disso, a bactéria exauriu a glicose e consumiu 94,75% da sacarose (Figura 2). Os resultados indicam que a associação desses dois açúcares é uma alternativa eficiente para aumentar a bioconversão ao produto de interesse.

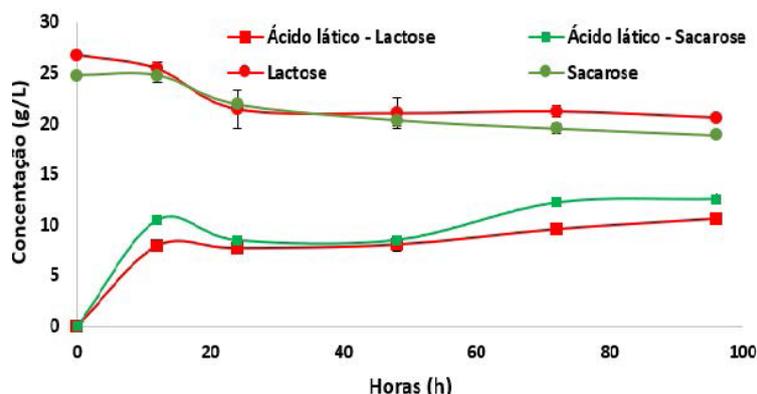
## Avaliação da produção de ácido láctico e consumo de substrato por *L. lactis*

A melhor condição para produção de ácido láctico por *L. lactis* foi a fermentação com sacarose e glicose como fontes de carbono. Em todos os experimentos, houve esgotamento da glicose antes de 12 horas de fermentação. A Tabela 1 mostra os parâmetros da produção de ácido láctico, os valores de rendimento e a produtividade para cada fonte.

**Tabela 1.** Produção de ácido láctico, rendimento e produtividade para as bactérias *P. acidilactici*, *W. thailandensis*, *L. lactis* e *E. durans* em 96 horas de fermentação em tubos.

Microrganismo	Fonte de carbono	Ácido láctico (g/L)	Rendimento (g/g)	Produtividade (g/L×h)
<i>P. acidilactici</i>	Lactose e glicose	10,03 ± 0,66	0,30	0,37
	Sacarose e glicose	11,81 ± 0,11	0,94	0,37
<i>W. thailandensis</i>	Lactose e glicose	10,74 ± 0,28	0,74	0,14
	Sacarose e glicose	13,05 ± 0,57	0,75	0,19
<i>L. lactis</i>	Lactose e glicose	10,58 ± 2,09	0,41	0,33
	Sacarose e glicose	12,57 ± 2,34	0,44	0,44
<i>E. durans</i>	Lactose e glicose	18,44 ± 0,62	0,92	0,29
	Sacarose e glicose	11,55 ± 0,72	0,91	0,18

A Figura 3 indica os perfis de consumo de substrato e a produção de ácido láctico por *L. lactis*.



**Figura 3.** Fermentação com *L. lactis* utilizando glicose e sacarose ou lactose como fontes de carbono para produção de ácido láctico e crescimento celular.

Pelo gráfico obtido, percebe-se que o consumo das fontes suplementares foi pouco expressivo. Mesmo com 96 horas de experimento, a bactéria não metabolizou as fontes suplementares.

Cock e Stouvenel (2006) obtiveram uma produção de ácido láctico de 13,7 g/L utilizando 60 g/L de glicose sem controle de pH. Resultados próximos foram alcançados neste experimento, utilizando menos substrato. Souza et al. (2017) também utilizaram a bactéria *L. lactis* e obtiveram concentrações de ácido láctico semelhantes às apresentadas neste trabalho. Aproximadamente 13 g/L de ácido láctico foram produzidas, utilizando-se 20 g/L de glicose como fonte de carbono em 24 horas de fermentação em biorreator sem o controle de pH, não sendo capaz de exaurir a glicose.

## Avaliação da produção de ácido láctico e consumo de substrato por *E. durans*

A melhor condição para *E. durans* foi a fermentação com lactose e glicose como fontes de carbono. A Tabela 1 mostra os parâmetros de produção de ácido láctico, os valores de rendimento, a concentração final e a produtividade para cada conjunto de fontes de carbono.

A Figura 4 mostra os perfis de consumo de ácido láctico e o consumo de substrato. A melhor condição para a *E. durans* foi com lactose como fonte de carbono suplementar, sendo capaz de exaurir os açúcares antes de 96 horas de fermentação.

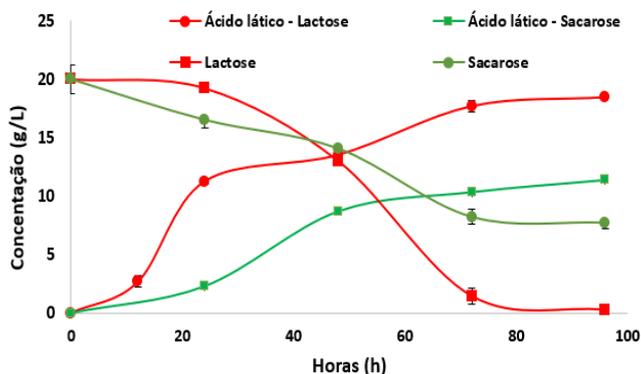


Figura 4. Fermentação com *L. lactis* utilizando glicose e sacarose ou lactose como fontes de carbono para produção de ácido láctico e crescimento celular.

Os resultados obtidos na fermentação com lactose são semelhantes aos relatados por Pessione et al. (2014), que utilizaram a bactéria *E. faecium* LLAA-1 em fermentações com glicose, produzindo aproximadamente 18 g/L de ácido láctico, com conversão de aproximadamente 90%.

### Avaliação do enantiômero de ácido láctico produzido por via fermentativa

Constatou-se por HPLC que as bactérias analisadas produziram o enantiômero (L)-ácido láctico com pureza óptica, cenário que possibilita utilizá-lo como monômero para produção de polímeros à base de ácido láctico. (López-Gómez et al., 2020).

## Conclusão

A avaliação de quatro diferentes espécies de bactérias para produção de ácido láctico com estratégia de cultivo associando glicose com sacarose ou lactose mostrou que o melhor resultado foi obtido por *E. durans*, após 96 horas de cultivo, utilizando lactose e glicose. Sendo assim, esta bactéria foi selecionada como cepa-elite, e a estratégia de suplementar lactose ao meio com glicose será mantida para estudo de outros parâmetros visando a otimizar a produção de ácido láctico em maiores escalas. As demais cepas produziram entre 10 g/L e 13 g/L de ácido láctico com as duas condições, sendo que a *P. acidilactici* alcançou o maior rendimento (0,94 g/g).

## Referências bibliográficas

- COCK, L. S.; DE STOUVENEL, A. R. Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 40-45, 2006.
- ESMAEILI, N.; JAHANDIDEH, A.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; AKESSON, D.; SKRIFVARS, M. Synthesis and characterization of methacrylated star-shaped poly (lactic acid) employing core molecules with different hydroxyl groups. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 39, 2017. 45341.
- GEORGE, F.; DANIEL, C.; THOMAS, M.; SINGER, E.; GUILBAUD, A.; TESSIER, F. J.; REVOL-JUNELLES, A.-M.; BORGES, F.; FOLIGNÉ, B. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: a multifaceted functional health perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. 2899.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 87-107, 2000.
- JAMSHIDIAN, M.; TEHRANY, E. A.; IMRAN, M.; JACQUOT, M.; DESOBRY, S. Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 5, 552-571, 2010.

- JUODEIKIENE, G.; KLUPSAITE, D.; ZADEIKE, D.; CIZEIKIENE, D.; VIDZIUNAITE, I.; BARTKIENE, E.; CERNAUSKAS, D. Bioconversion of agro-industrial by-products to lactic acid using *Lactobacillus sakei* and two *Pediococcus* spp. strains. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 12, p. 2682-2691, 2016.
- KOMESU, A.; OLIVEIRA, J. A. R. de; MARTINS, L. H. da S.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL FILHO, R. M. Lactic acid manufacture. **BioResources**, v. 12, n. 2, p. 4364-4383, 2017.
- KULEY, E.; OZYURT, G.; OXOGUL, I.; BOGA, M.; AYOL, I.; ROCHA, J. M.; OZOGUL, F. The role of selected lactic acid bacteria on organic acid accumulation during wet and spray-dried fish-based silages. Contributions to the winning combination of microbial food safety and environmental sustainability. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 2020. 172.
- LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. In: SINGH, O.; HARVEU, S. (Ed.). **Sustainable biotechnology: sources of renewable energy**. Dordrecht, Netherlands: Springer, 2010. p. 211-228.
- LÓPEZ-GÓMEZ, J. P.; ALEXANDRI, M.; SCHNEIDER, R.; LATORRE-SÁNCHEZ, M.; COLL LOZANO, C.; VENUS, J. Organic fraction of municipal solid waste for the production of L-lactic acid with high optical purity. **Journal of Cleaner Production**, v. 247, 2020. Article 119165.
- MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017. 1255.
- NAGARAJAN, D.; OKTARINA, N.; CHEN, P.-T.; CHEN, C.-Y.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Fermentative lactic acid production from seaweed hydrolysate using *Lactobacillus* sp. and *Weissella* sp. **Bioresource Technology**, v. 344, pt. A, 2022. Article 126166.
- OUYANG, J.; MA, R.; ZHENG, Z.; CAI, C.; ZHANG, M.; JIANG, T. Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 475-480, 2013.
- PESSIONE, A.; ZAPPONI, M.; MANDILI, G.; FATTORI, P.; MANGIAPANE, E.; MAZZOLI, R.; PESSIONE, E. Enantioselective lactic acid production by an *Enterococcus faecium* strain showing potential in agro-industrial waste bioconversion: physiological and proteomic studies. **Journal Biotechnology**, v. 173, p. 31-40, 2014.
- SOUZA, E. C.; AZEVEDO, P. O. de S. de; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. de S. Influencia de la temperatura y pH en la producción de biosurfactantes, bacteriocinas y ácido láctico por *Lactococcus lactis* CECT-4434. **CyTA: Journal of Food**, v. 15, n. 4, p. 525-530, 2017.
- ZHANG, Z.; TSAPEKOS, P.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. Bio-augmentation to improve lactic acid production from source-sorted organic household waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 279, 2021. Article 123714.