

Efeito do cálcio na produção de ácido láctico a partir de glicerol por *Lactobacillus plantarum*

Graciane Resende¹, Marcus Fernando Farias Silva Lima², Mônica Caraméz Triches Damaso³, Thaís Fabiana Chan Salum⁴, Sílvia Belém Gonçalves⁵

Resumo

O objetivo principal deste trabalho foi analisar o impacto de dois sais de cálcio, nitrato de cálcio e cloreto de cálcio, na produção de ácido láctico a partir do glicerol, por processo fermentativo utilizando uma cepa de *Lactobacillus plantarum* (BRMCTAA179). Diferentes concentrações dos sais foram avaliadas em experimentos conduzidos em batelada durante 48 horas de cultivo. A condição com melhor desempenho foi selecionada para ensaios posteriores em batelada alimentada com duração de 72 horas, a alimentação foi com meio a 200 g/L e realizada a cada 24 horas. Observou-se que o nitrato de cálcio teve um efeito inibitório significativo na produção de ácido láctico, especialmente em concentrações mais elevadas. Por outro lado, a presença do cloreto de cálcio em uma concentração de 1 g/L mostrou resultados promissores, permitindo uma produção expressiva de ácido láctico a partir do glicerol. A produção de ácido láctico nos ensaios em batelada alimentada também foi expressiva, atingindo um valor de 29,07 g/L, enquanto o glicerol foi quase completamente consumido após 72 horas de cultivo. Consequentemente, a escolha adequada do sal de cálcio revelou-se um fator crucial para a produção eficiente de ácido láctico a partir do glicerol.

Termos para indexação: fermentação, bactéria, biodiesel, ácido láctico, biorrefinaria, sais de cálcio.

Introdução

A produção de ácido láctico tem se destacado como de grande interesse tanto para indústria alimentícia quanto para setores relacionados à saúde e aos materiais renováveis. Esse importante composto tem diversas aplicações, desde a produção de alimentos fermentados até a fabricação de polímeros biodegradáveis. (Hidawati et al., 2023) Dentre os microrganismos utilizados para a obtenção do ácido láctico, a bactéria láctica *Lactobacillus plantarum* surge como um agente fermentativo versátil e promissor. (Fu; Mathews, 1999)

Algumas bactérias são capazes de converter eficientemente substratos como glicose e glicerol em ácido láctico, por meio de uma via metabólica conhecida como fermentação láctica. Além das fontes de carbono, a bactéria necessita de nutrientes para seu desenvolvimento, como aminoácidos, sais, peptídeos e vitaminas. (Hofvendahl; Hahn-Hägerdal, 2000; Evanovich et al., 2019)

Um sal amplamente empregado na rota fermentativa é o carbonato de cálcio. O cálcio desempenha um papel fundamental nesse processo, sendo imprescindível para o funcionamento adequado das enzimas envolvidas na fermentação láctica. Sua presença influencia diretamente a atividade metabólica das bactérias envolvidas. (Pejin et al., 2015) Além disso, o carbonato de cálcio também

¹ Engenheira química, mestra em Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, graciane.resende@colaborador.embrapa.br

² Engenheiro químico, Universidade de Brasília, marcus.lima@colaborador.embrapa.br

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

⁴ Farmacêutica, doutora em Ciências Bioquímica, Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁵ Engenheira química, Doutora em Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

desempenha um papel crucial no controle do pH do meio, que é um fator essencial para o crescimento das bactérias durante a fermentação.

A utilização do carbonato de cálcio como fonte de cálcio no meio de cultivo apresenta alguns desafios. Esse composto apresenta baixa solubilidade em água, o que dificulta sua dissolução e disponibilidade para as bactérias durante o processo de fermentação. Além disso, em razão da insolubilidade, o material tende a precipitar, dificultando o bombeamento do material para reatores maiores e sua utilização em larga escala.

Diante dessa dificuldade, o nitrato de cálcio e o cloreto de cálcio surgem como alternativas para suprir a demanda de cálcio no meio de cultivo de *Lactobacillus plantarum*. Esses sais de cálcio apresentam boa solubilidade em água e têm sido investigados pelo nosso grupo como potenciais substitutos do carbonato de cálcio, oferecendo uma solução para melhorar a produção de ácido láctico.

Nesse contexto, este estudo tem como objetivo avaliar a influência do nitrato e do cloreto de cálcio na produção de ácido láctico por uma cepa de *Lactobacillus plantarum*. Serão investigadas diferentes concentrações desses sais em ensaios realizados em batelada e batelada alimentada, visando determinar a melhor condição de cultivo para a produção eficiente de ácido láctico.

Materiais e métodos

A bactéria *Lactobacillus plantarum* (BRMCTAA179), preservada em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados à Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio), da Embrapa Agroenergia, foi inoculada em placas de Petri com diâmetro de 90 mm, em meio MRS-ágar por 48 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para o preparo do pré-inóculo, foi utilizado Erlenmeyer contendo MRS-caldo. O meio preparado foi submetido à autoclavagem. O pré-inóculo foi mantido em agitação constante em agitador orbital a 150 rpm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas.

Para o inóculo foi preparado um meio com 3 g/L de triptona, 6 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de acetato de sódio, 0,2 g/L de sulfato de magnésio, 0,005 g/L de sulfato de manganês, 1,5 g/L de fosfato de potássio, 2 g/L de Tween 80, 20 g/L de glicerol. Concentrações de 1 g/L, 4 g/L, 7 g/L e 10 g/L de nitrato de cálcio e o cloreto de cálcio foram avaliadas. O inóculo foi mantido em agitador orbital a 180 rpm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a análise da concentração dos sais de cálcio, os experimentos em batelada foram conduzidos em tubos de fundo cônico de 50 mL por 48 horas, densidade ótica inicial a 600 nm (DO600 nm) de 10 e agitação de 180 rpm. A concentração na qual foi possível observar a maior produtividade foi selecionada e avaliada em ensaios realizados em batelada alimentada em frascos redondos de fundo chato de 65 mL por um período de 72 horas de cultivo, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e DO inicial de 5. Nessa condição, adicionalmente, a cada 24 horas, o experimento foi alimentado utilizando um meio 200 g/L de forma que o volume alimentado correspondesse ao necessário para que a concentração de glicerol fosse de 20 g/L. Durante ambos os ensaios, o pH do meio foi monitorado a cada 24 horas e corrigido para pH 7,5, utilizando-se uma solução de hidróxido de potássio 2 mol/L. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As amostras coletadas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), e foram injetadas na coluna Aminex HPX-87H a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ com fase móvel de 0,005 mol/L H_2SO_4 a 0,6 mL/min de vazão.

Resultados e discussão

Avaliação de diferentes concentrações de sais de cálcio na produção de ácido láctico por *L. plantarum*

Os ensaios foram realizados com diferentes concentrações de nitrato de cálcio em batelada. A Figura 1 mostra a concentração de glicerol (A) e a produção de ácido láctico (B) ao longo do tempo de cultivo em diferentes concentrações de nitrato de cálcio. Após 48 horas, para a concentração de 1 g/L de nitrato de cálcio, a produção de ácido láctico atingiu uma concentração de $11,34 \pm 0,45$ g/L. Ao aumentar a concentração de nitrato de cálcio para 4 g/L, observou-se uma redução na produção de ácido láctico para $6,68 \pm 2,69$ g/L. Isso sugere que o aumento da concentração do sal pode ter um efeito inibitório ou limitante sobre a bactéria no processo de produção do ácido láctico. Essa tendência de diminuição na produção se manteve para concentrações ainda maiores de nitrato de cálcio, como na concentração de 7 g/L, na qual a bactéria produziu apenas $0,94 \pm 1,16$ g/L de ácido láctico, e em 10 g/L do sal, em que não foi detectada produção do ácido.

Com isso, é possível observar que, em altas concentrações de nitrato de cálcio, há uma redução significativa na produção de ácido láctico. Isso pode indicar que o aumento da concentração de nitrato de cálcio pode inibir o metabolismo das células e, conseqüentemente, a síntese de ácido láctico. Esse efeito pode acontecer porque altas concentrações de nitrato de cálcio podem favorecer outras vias metabólicas ou levar a alterações no ambiente celular que afetam negativamente a produção de ácido láctico. Observa-se que, mesmo em concentrações menores de nitrato de cálcio, ainda há produção de ácido láctico, mas os valores são relativamente baixos quando comparados com resultados obtidos pelo grupo usando carbonato de cálcio. Como foi observado anteriormente pelo grupo, foram obtidos aproximadamente 20 g/L de ácido láctico a partir de cerca de 21 g/L de glicerol com rendimento de 96% e produtividade de 0,47 g/L/h (dados não publicados). Mazumdar et al. (2010) também produziram 32 g/L de ácido láctico a partir de 40 g/L de glicerol com rendimento de 85% utilizando o carbonato de cálcio como fonte de cálcio do meio.

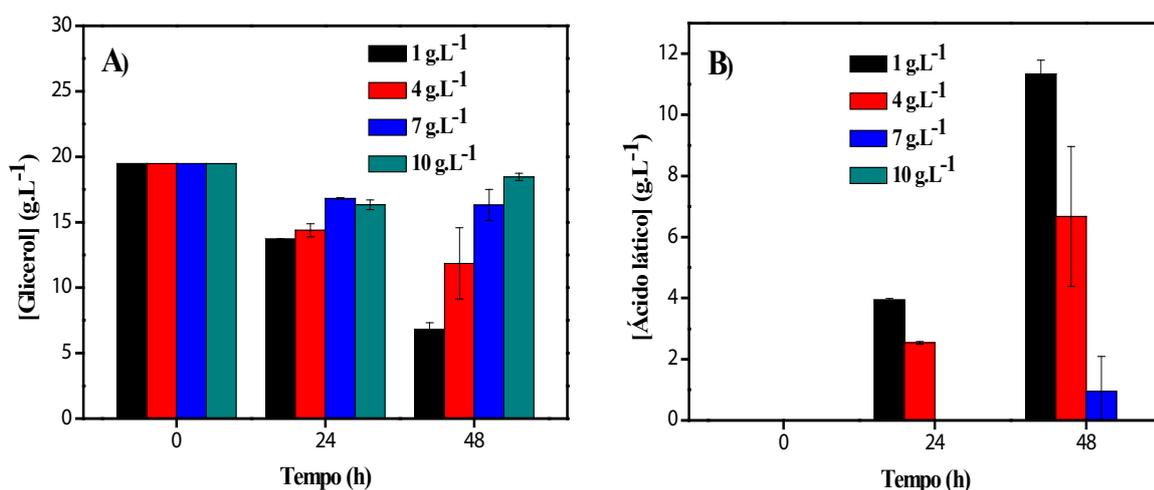


Figura 1. Glicerol remanescente (A) e produção de ácido láctico (B) ao longo do tempo em diferentes concentrações de nitrato de cálcio no cultivo de *Lactobacillus plantarum* para produção de ácido láctico a partir de glicerol.

O cloreto de cálcio também foi testado na fermentação em batelada e sua influência na produção de ácido láctico a partir do glicerol foi investigada, conforme mostrado na Figura 2. O gráfico A da Figura 2 revela que, ao longo de 48 horas, o glicerol foi quase completamente consumido em todas as concentrações de cloreto de cálcio estudadas. Esse resultado sugere que a presença do

cloreto de cálcio não inibiu a utilização do glicerol, independentemente da concentração do sal. No gráfico **B**, pode-se notar que concentração mais baixa de cloreto de cálcio resultou em uma maior produção de ácido láctico em comparação com as concentrações mais elevadas. Ao final das 48 horas, as concentrações de ácido láctico foram de $17,92 \pm 2,41$ g/L, $14,86 \pm 1,49$ g/L, $15,65 \pm 0,41$ g/L e $12,42 \pm 0,64$ g/L para as concentrações de 1 g/L, 4 g/L, 7 g/L e 10 g/L de cloreto de cálcio, respectivamente.

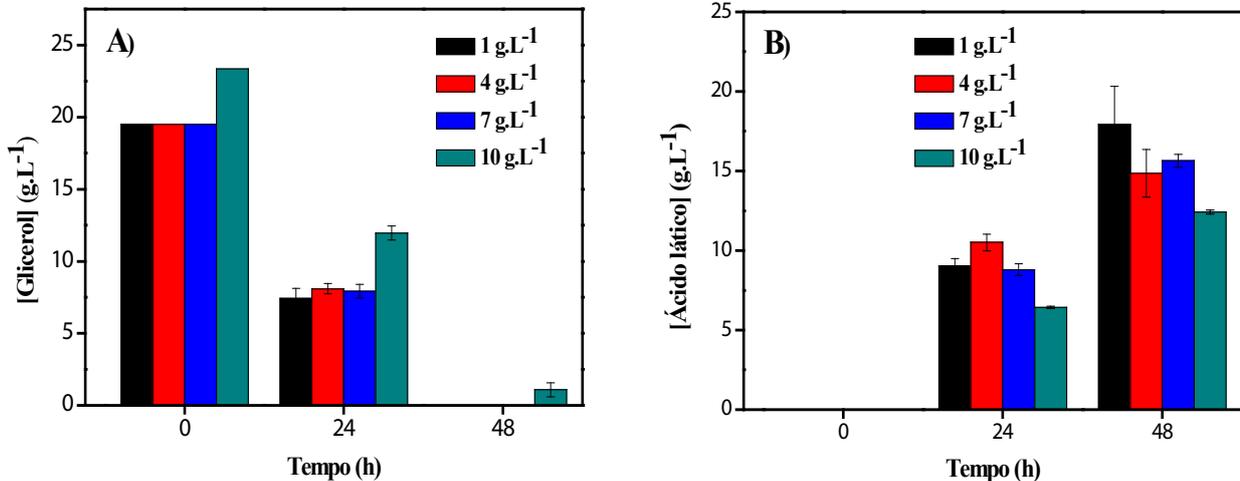


Figura 2. Glicerol remanescente (A) e produção de ácido láctico (B) ao longo do tempo em diferentes concentrações de cloreto de cálcio no cultivo de *Lactobacillus plantarum* para produção de ácido láctico a partir de glicerol.

O resultado obtido para a concentração de 1 g/L de cloreto de cálcio foi bastante promissor, com rendimento de 92% e produtividade de 0,37 g/L/h, motivando os ensaios em batelada alimentada, que estão apresentados na Figura 3.

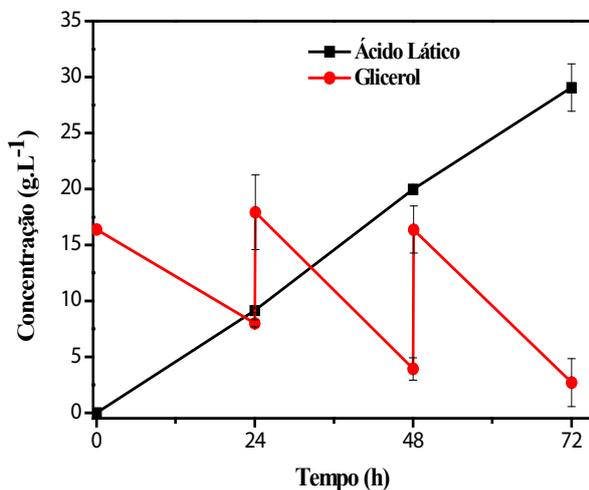


Figura 3. Perfil cinético de consumo de glicerol e produção de ácido láctico na concentração de 1 g/L de cloreto de cálcio com batelada alimentada.

Os dados apresentados na Figura 3 revelam resultados promissores sobre a produção de ácido láctico e o consumo de glicerol durante um período de 72 horas de cultivo. Observou-se que a produção de ácido láctico atingiu 29,07 g/L, enquanto o nível de glicerol quase zerou nesse mesmo intervalo de tempo. É importante destacar que a presença de cloreto não exerceu um efeito negativo sobre o metabolismo da bactéria, evidenciando sua capacidade de converter 36,05 g/L de glicerol em ácido láctico, com um rendimento de 87% e uma produtividade de 0,4 g/L/h. Além disso, é importante notar que o glicerol que não foi convertido em ácido láctico foi utilizado para o crescimento celular.

Comparativamente, em relação aos dados obtidos pelo grupo anteriormente em experimento com as mesmas condições, foi possível produzir 36,63 g/L de ácido láctico a partir de 46,24 g/L de glicerol na presença de carbonato de cálcio no meio, alcançando um rendimento de 79% e uma produtividade de 0,51 g/L/h (dados não publicados). Mazumdar et al. (2013) alcançaram a produção de 50 g/L de ácido láctico a partir de 56 g/L de glicerol com um rendimento de 93%, ao utilizar o carbonato de cálcio como fonte de cálcio no meio de fermentação. Esses resultados indicam que as condições empregadas com o cloreto de cálcio se aproximam significativamente dos resultados obtidos com carbonato de cálcio, e com a vantagem de não formar o precipitado presente quando este último sal é utilizado. Com isso, planeja-se explorar outras estratégias de fermentação para buscar resultados similares aos obtidos com o carbonato de cálcio. Essas novas abordagens visam a aperfeiçoar o processo de produção de ácido láctico, buscando alternativas mais eficientes ou economicamente viáveis e que possibilitem o escalonamento do processo de produção do ácido láctico a partir do glicerol.

Conclusão

Foram investigados os efeitos dos sais de cálcio na produção de ácido láctico a partir do glicerol. Notou-se que o nitrato de cálcio teve uma influência negativa na produção de ácido láctico, especialmente em concentrações mais altas. Por outro lado, o cloreto de cálcio mostrou-se promissor em uma concentração de 1 g/L, possibilitando uma alta produção de ácido láctico a partir do glicerol consumido, com rendimento de 91%, e mantendo o metabolismo celular eficiente durante o processo. Esse resultado expressivo também foi observado nos ensaios em batelada alimentada, em que a produção de ácido láctico alcançou um valor de 29,07 g/L, e o glicerol foi praticamente todo consumido, após 72 horas de cultivo. Assim, a escolha do tipo de sal de cálcio revelou ser um fator crucial na produção de ácido láctico a partir do glicerol. O cloreto de cálcio, quando utilizado em concentrações adequadas, demonstrou ser benéfico para a produção do composto desejado, proporcionando resultados promissores.

Referências bibliográficas

- EVANOVICH, E.; DE SOUZA MENDONÇA MATTOS, P. J.; GUERREIRO, J. F. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus plantarum*: an overview. **International Journal of Genomics**, 2019. Article 4973214.
- FU, W.; MATHEWS, A. P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of Ph, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3, n. 3, p. 163-170, 1999.
- HIDAWATI; SARASWATY, V.; MARGANINGRUM, D.; NISSA, R. C.; ABDULLAH, A. H. D.; HANDAYANI, S. The carrageenan fermentation process for (l)-lactic acid production using *Lactobacillus plantarum*: effect of fermentation time. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 1201, n. 1, 2023. 12096.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 87-107, 2000.
- MAZUMDAR, S.; BLANKSCHEN, M. D.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. B. Efficient synthesis of l-lactic acid from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2013.
- MAZUMDAR, S.; CLOMBURG, J. M.; GONZALEZ, R. *Escherichia coli* strains engineered for homofermentative production of d-lactic acid from glycerol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, 4327-4336, 2010.
- PEJIN, J.; RADOSAVLJEVIĆ, M.; MOJOVIĆ, L.; KOCIĆ-TANACKOV, S.; DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A. The influence of calcium-carbonate and yeast extract addition on lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate. **Food Research International**, v. 73, p. 31-37, 2015.