

# Síntese de ácido láctico a partir de glicose por *Pediococcus acidilactici*: otimização e produção

Marcus Fernando Farias Silva Lima<sup>1</sup>, Fabricio Machado<sup>2</sup>, Sílvia Belém Gonçalves<sup>3</sup>

## Resumo

O processo de produção de ácido láctico por meio do metabolismo fermentativo das bactérias lácticas apresenta um grande potencial para ser utilizado como um importante bloco construtor no setor de materiais. Neste trabalho, o objetivo principal foi determinar os parâmetros ideais para otimizar a produção de ácido láctico através da rota fermentativa. Foram conduzidos experimentos em Falcon de 50 mL, utilizando uma temperatura de 30 °C e uma frequência de agitação de 120 rpm, durante 96 horas. O primeiro parâmetro testado foi a concentração de glicose no meio de cultura, com experimentos realizados em concentrações de 20 g/L, 40 g/L e 100 g/L. A bactéria utilizada foi a *Pediococcus acidilactici*, e seu melhor rendimento foi obtido com uma concentração de glicose de 20 g/L. O segundo parâmetro avaliado foi o pH do meio de fermentação. Por meio de experimentos conduzidos em um reator a 30 °C e 180 rpm, observou-se que o crescimento bacteriano foi considerado ideal em pH igual a 6, o que resultou na produção de 30 g/L de ácido láctico. Por fim, o número de ciclos necessários para aumentar a produção de ácido láctico foi avaliado utilizando um processo batelada alimentada. Verificou-se que, com quatro ciclos de cultivo, foi possível obter 45 g/L de ácido láctico em 86 horas. Dessa forma, por meio das ferramentas experimentais utilizadas, foram estabelecidos os parâmetros ótimos para a produção eficiente de ácido láctico via rota fermentativa utilizando a bactéria *Pediococcus acidilactici*.

**Termos para indexação:** *Pediococcus acidilactici*, ácido láctico, glicose, fermentação.

## Introdução

Diferentes indústrias utilizam o ácido láctico em diversas aplicações. Por exemplo, na indústria alimentícia, ele é empregado como acidulante para evitar o crescimento indesejado de bactérias. Além disso, o ácido láctico é utilizado na produção de bases químicas, solventes orgânicos e também encontra aplicação na indústria farmacêutica, principalmente na formulação de pomadas. Trata-se de um ácido orgânico que pode formar uma mistura racêmica por causa dos seus dois isômeros óticos, L(+) e D(-), quando produzido pela rota química, em razão do seu centro quiral no  $\beta$ -carbono. Sua produção ocorre também por meio da fermentação de glicose por bactérias lácticas (Lopes et al., 2008).

No contexto desta pesquisa, a bactéria utilizada é a *Pediococcus acidilactici*, um coco gram-positivo, homofermentativo, capaz de crescer em uma ampla faixa de pressão osmótica, temperatura e pH. Essa bactéria é anaeróbia facultativa que prospera em meio MRS com pH ótimo entre 5 e 6, e sua viabilidade ocorre em temperaturas de até 65 °C, embora a temperatura ideal para o crescimento esteja em torno de 30 °C (Pereira, 2019).

A eficiência do processo de fermentação láctica é determinada pelo consumo de substrato e pela produtividade. Diversos fatores podem influenciar negativamente a produtividade, incluindo

<sup>1</sup> Engenheiro químico, Universidade de Brasília, marcus.lima@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 Engenharia Química, Embrapa Agroenergia, silvia.belem@embrapa.br

a temperatura do fermentador, variações de pH, inibição da atividade biossintética por causa de altas ou baixas concentrações de substrato, alta concentração celular ou o acúmulo de subprodutos (Boudrant et al., 2005).

A homofermentação é o processo em que o ácido láctico é o único produto final, resultante da conversão do ácido pirúvico em ácido láctico pela ação da enzima desidrogenase (LDH). Esse processo gera um ganho líquido de dois ATP, ou seja, dois lactatos por molécula de glicose fermentada. Além de glicose, a bactéria requer nutrientes como aminoácidos, sais, peptídeos e vitaminas para seu desenvolvimento (Garvie; Mabbitt, 1967).

O ácido láctico possui fórmula molecular  $C_3H_6O_3$ , ponto de fusão de  $53\text{ }^\circ\text{C}$  e massa molar de  $90,08\text{ g/mol}$ . Ele pode formar sais com vários metais, sendo os mais solúveis em água aqueles formados pelo DL ácido láctico em mistura racêmica. Em muitos casos, diferentes espécies de bactérias produzem apenas um tipo de ácido láctico, L(+) ou D(-), com o isômero D sendo mais prevalente na fase estacionária e o isômero L predominando na fase inicial da fermentação (Garvie; Mabbitt, 1967).

O objetivo deste trabalho é avaliar a produção de ácido láctico por meio da fermentação de glicose, utilizando a bactéria *Pediococcus acidilactici* como microrganismo em diferentes condições operacionais.

## Materiais e métodos

A bactéria foi inicialmente retirada do ultrafreezer ( $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ) e, em seguida, foi estriada e cultivada em placas de Petri com ágar MRS, previamente preparadas, permitindo o crescimento das colônias isoladas. Para o pré-inóculo, foi preparado meio MRS comercial em frascos Erlenmeyer, que foram autoclavados por 15 minutos para esterilização e armazenados em geladeira.

Também foi preparado meio MRS para o inóculo, sem fonte de carbono, pois a concentração de glicose variava em cada experimento, e havia risco de caramelização do meio durante a esterilização na autoclave.

As colônias de bactérias foram transferidas das placas de Petri para os frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio do pré-inóculo cada, preparado previamente, utilizando uma alça de Drigalski estéril. Em seguida, os frascos foram colocados em um *shaker* a 120 rpm, a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , por um tempo definido para cada experimento.

Quando os experimentos foram conduzidos em frasco tipo Falcon de 50 mL, após três dias, o pré-inóculo foi centrifugado, e a densidade óptica (OD) do concentrado foi medida. O concentrado foi distribuído em volumes iguais para os frascos tipo Falcon de 50 mL, que continham 30 mL do meio MRS previamente preparado em cada um. Cada concentração foi replicada em triplicata, variando para cada experimento. Os frascos tipo Falcon foram, então, colocados em um *shaker* a 120 rpm, a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , por até 96 horas. Durante o experimento, foram coletadas amostras no primeiro dia em 0 hora, 4 horas e 12 horas, e nos dias seguintes, uma amostra de 1 mL foi retirada a cada 24 horas. Ao final do experimento, as amostras coletadas foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), na coluna Aminex HPX-87H a uma temperatura de  $40\text{ }^\circ\text{C}$ , utilizando-se uma fase móvel de  $0,005\text{ mol/L}$  de  $H_2SO_4$ , com uma vazão de  $0,6\text{ mL/min}$ .

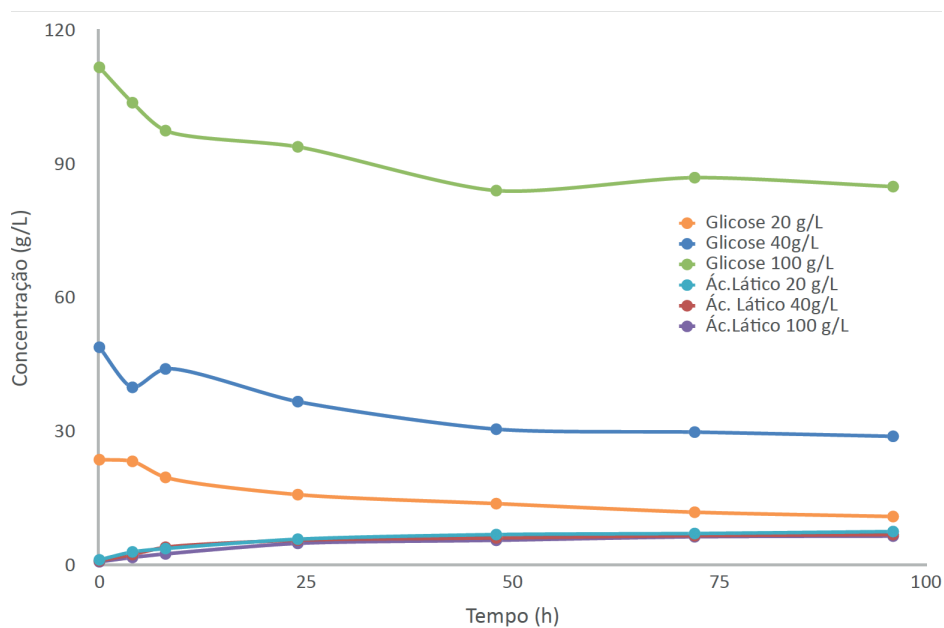
No caso dos experimentos realizados em reator, após o tempo determinado para cada experimento, o pré-inóculo foi centrifugado, e a OD do concentrado foi medida. O concentrado foi distribuído em volume, de acordo com a concentração inicial calculada para cada reator. Os reatores foram preparados previamente, e os sensores de pH foram calibrados com soluções padrão do laboratório. O volume de meio necessário para cada experimento foi adicionado a cada reator

e, em seguida, foi autoclavado. Após o resfriamento, a solução de glicose foi adicionada ao reator, preparando-o para receber o inóculo.

Ao final do experimento, as amostras coletadas foram analisadas no HPLC. O restante dos experimentos foi feito em reator. O pré-inóculo ficou por apenas 8 horas no *shaker*, e foi inoculado no mesmo dia. Foram preparados três reatores com 600 mL de meio MRS tamponado com 20 g/L de glicose como substrato, em cada. Foram colocados 16,6 mL de inóculo em cada reator no início do experimento, a OD inicial foi de 7,8 e o pH estava em 6,5, com duração de 86 horas. O reator foi alimentado quatro vezes com uma solução de glicose de 200 g/L.

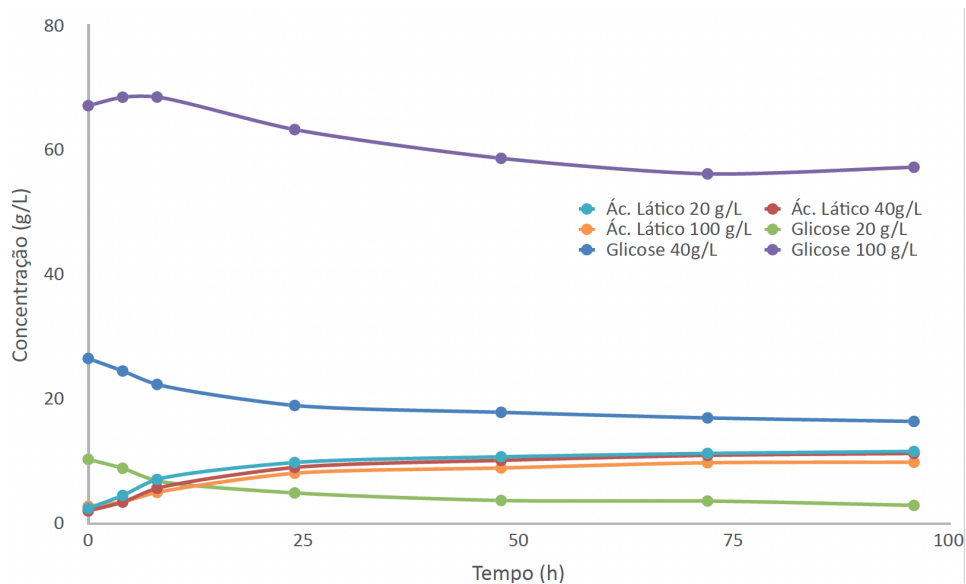
## Resultados e discussão

A Figura 1 mostra que a concentração de 20 g/L obteve o maior rendimento na produção de ácido láctico em comparação às outras concentrações, chegando à concentração final de 7,66 g/L. Uma explicação para esse resultado pode ser o pH do meio, que mesmo para o experimento com a concentração de 100 g/L obtinha-se 6,65 g/L de ácido láctico. O pH correto para favorecer a levedura e inibir o desenvolvimento de muitos tipos de bactérias está entre 4,0 e 5,0 (Menezes, 1980). Para manter o pH estável foi utilizado um meio tamponado, fazendo com que a produção de ácido láctico melhorasse um pouco também, principalmente para a concentração de 20 g/L. Isso pode ser observado na Figura 2.

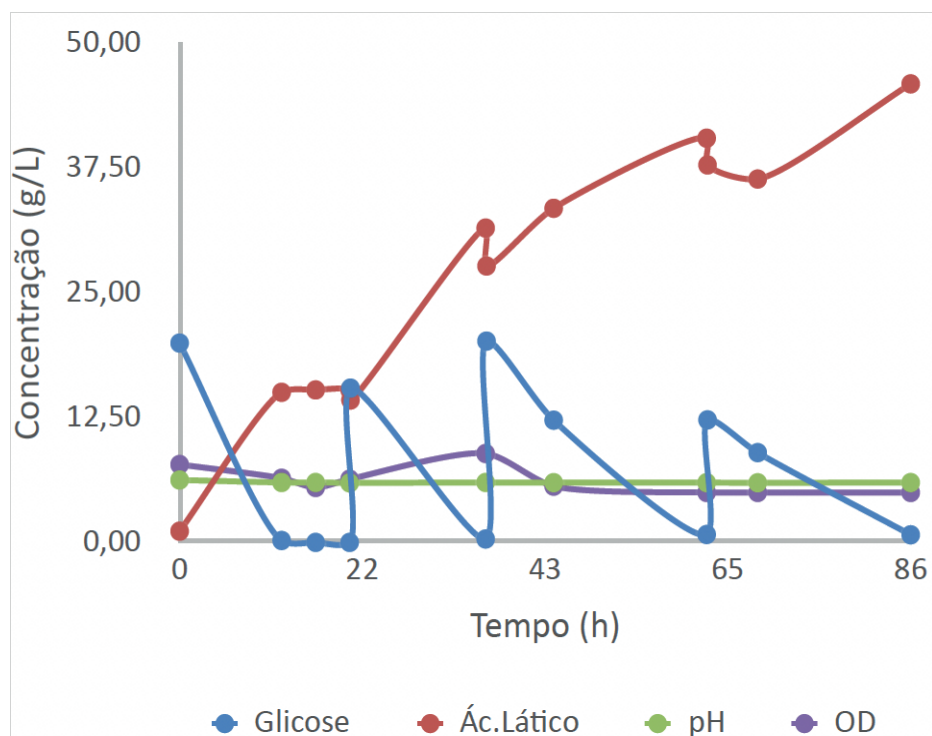


**Figura 1.** Estudo da influência da concentração de glicose na produção de ácido láctico.

Contudo, como se pode observar na Figura 2, mesmo com o ajuste de pH por meio de tampão, nos experimentos conduzidos, em que as quantidades de substrato inicial eram maiores, não foi possível obter uma boa produção, o que indica que a bactéria pode estar sofrendo inibição pelo substrato. Isso acontece porque quando o substrato é adicionado de uma vez só no início da fermentação ocorrem efeitos de inibição, repressão ou o metabolismo celular é desviado para formação de produtos que não interessam (Carvalho; Sato, 2001). Os resultados podem ser observados na Figura 3.



**Figura 2.** Estudo da influência da concentração de glicose para a produção de ácido láctico com meio tamponado.



**Figura 3.** Produção de ácido láctico a partir de glicose em sistema de batelada alimentada.

Observa-se que ao final da última alimentação as células já começaram a apresentar morte celular. Neste experimento, foi obtida uma produção de ácido láctico de 45,9 g/L, com o rendimento de 79% e uma produtividade de 62%.

## Conclusão

Utilizando-se diferentes concentrações de glicose (20 g/L, 40 g/L e 100 g/L), constatou-se que a concentração de 20 g/L apresentou os melhores resultados, indicando sua maior efetividade para a aplicação estudada.

A bactéria escolhida, *Pediococcus acidilactici*, mostrou um desempenho satisfatório ao longo dos experimentos. A temperatura ideal de 30 °C e a agitação a 180 rpm favoreceram seu crescimento, enquanto o pH 6 proporcionou as melhores condições para sua proliferação. Além disso, a concentração ótima de glicose foi determinada como 20 g/L, resultando na máxima concentração de ácido lático de 45 g/L após 86 horas de experimento.

Dessa forma, por meio do controle desses parâmetros e da seleção da bactéria adequada, foi possível alcançar uma produção eficiente de ácido lático, contribuindo para o avanço do conhecimento nessa área de pesquisa.

## Referências bibliográficas

- BOUDRANT, J.; MENSUTINA, N. V.; SKOROHODOV, A. V.; GUSEVA, E. V.; FICK, M. Mathematical modelling of cell suspension in high cell density conditions: application to L-lactic acid fermentation using *Lactobacillus casei* in membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1641-1647, 2005.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 193-204.
- GARVIE, E. I.; MABBITT, L. A. Stimulation of the growth of *Leuconostoc oenos* by tomato juice. **Archives of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 398-407, 1967.
- LOPES, A. R. **Produção de ácido lático por lactobacilos em diferentes meios de cultivo**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.
- MENEZES, T. J. B. de. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. p. 141-178.
- PEREIRA, N. T. **Produção de ácido lático com resíduos agroindustriais: uma revisão da literatura**. 2019. Monografia (Graduação em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.