



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LÍVIA PINHEIRO DE QUEIROZ

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR BIOPROCESSO UTILIZANDO
SORO DE LEITE COMO MATÉRIA-PRIMA**

**FORTALEZA
2021**

LÍVIA PINHEIRO DE QUEIROZ

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR BIOPROCESSO UTILIZANDO
SORO DE LEITE COMO MATÉRIA-PRIMA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientadora: Prof. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Q45e Queiroz, Lívia Pinheiro de.

Estudo da produção de ácido lático por bioprocesso utilizando soro de leite como matéria-prima / Lívia Pinheiro de Queiroz. – 2021.

59 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

1. Ácido lático. 2. Lactobacillus plantarum. 3. Soro de leite. I. Título.

CDD 661

LÍVIA PINHEIRO DE QUEIROZ

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR BIOPROCESSO UTILIZANDO
SORO DE LEITE COMO MATÉRIA-PRIMA

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (DEQ/UFC)

Prof. Dra. Vânia Maria Maciel Melo
Universidade Federal do Ceará (DB/UFC)

Me. José Edvan Marques Júnior
Universidade Federal do Ceará (DEQ/UFC)

À minha mãe, Elisabeth Sales Pinheiro.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, **Elisabeth Sales Pinheiro**, por todo amor, carinho, auxílio e esforço para me proporcionar a melhor educação. Por ser meu suporte e minha fonte de força para enfrentar os desafios da vida.

À **Universidade Federal do Ceará**, pela estrutura e apoio dado a nós, estudantes.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq)**, pelo financiamento da pesquisa.

À **Prof. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha**, pela oportunidade de ser sua aluna e de executar este trabalho. Por todo ensinamento, apoio, atenção e tempo dedicado no desenvolvimento deste trabalho. Por ser uma inspiração de profissional.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para discutir este trabalho.

Ao **Edvan Marques**, por toda a ajuda no processo de desenvolvimento deste trabalho, companheirismo, paciência, dedicação e apoio. Por ser um grande amigo.

Aos meus colegas do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio), **Bruna Pinheiro, Carlos Girão, Layanne Guedes e Natan Câmara**, pela companhia e auxílio quando necessário.

Às minhas queridas tias **Dorotéa e Fátima**, por sempre terem me apoiado e me tratado como filha.

À **Carolina Pinheiro**, pela dedicação e amor que só uma madrinha como você poderia ter. Por ser um exemplo de garra e resiliência para mim.

Aos meus amigos, **Kleyton Pereira, Yana Letícia, Carine Mendes, George Maia e Levi Souza**, por terem feito meus primeiros anos de graduação mais felizes e tranquilos. Obrigada por todos os nossos momentos e pela nossa amizade.

À **Thaís Oliveira** por todos os momentos bons vividos, companhia e apoio. Obrigada por fazer meus dias no laboratório mais prazerosos e por todo o auxílio que me foi dado até aqui.

Ao **Joaquim César** por em diversos momentos ter me acolhido e por ter proporcionado momentos tão únicos durante a graduação.

Aos meus amigos da Enactus UFC, principalmente **Marcelo Henrique e Fernanda Pantuzzi**, por terem me proporcionado momentos inesquecíveis em uma época tão difícil da graduação.

À minha tia **Ruth**, por todo o carinho e apoio.

À minha amiga **Celma**, por sempre me apoiar, aconselhar, acolher e cuidar de mim.

Aos meus tios **Amorim e Nicodemos**, por terem investido em mim e apoiado a minha educação.

À **Grasieli Lustosa**, por todo apoio terapêutico que me foi dado nos últimos anos da graduação.

À minha família de modo geral, por todo carinho e auxílio que foi me dado durante toda a minha vida.

RESUMO

O ácido lático é um composto orgânico que possui grande importância industrial devido as suas diversas aplicações já consolidadas no mercado e é considerado um composto seguro e aprovado pela *American Food and Drug Administration* (FDA). A produção do ácido lático pode ser realizada através da síntese química e por rota biotecnológica, sendo a disponibilidade dos isômeros puros desse composto um fator determinante na escolha da via de obtenção. A via química produz uma mistura racêmica que interfere nas propriedades físicas e químicas do produto final. Já a rota biotecnológica é vista como promissora, tendo em vista que algumas espécies de microrganismos são capazes de gerar isômeros opticamente puros e é possível utilizar fontes renováveis como substrato, no qual é possível reduzir o custo do processo. Uma possível matéria-prima que pode ser utilizada é o soro de leite, um resíduo da indústria de laticínios, abundante, barato e renovável. Na literatura existem poucos relatados da produção de ácido lático por *Lactobacillus plantarum* usando soro de leite como matéria-prima. Neste contexto, o presente estudo avaliou a produção de ácido lático por rota biotecnológica em escala de bancada, utilizando duas cepas da espécie *Lactobacillus plantarum*, em específico LAB07 e LAB14, que foram isoladas de queijo artesanal e molho de pimenta, respectivamente, e soro de leite desproteinado como fonte de carbono. A idade de cultura de inóculo, no qual as cepas foram cultivadas isoladamente (16 h, 20 h e 24 h), temperatura (30 °C, 37 °C e 45 °C) e rotação (100 rpm, 150 rpm e 200 rpm) foram os parâmetros avaliados para conduzir os experimentos em agitador orbital, utilizando uma concentração de inóculo de 10% (v/v). A temperatura foi a condição operacional que mais influenciou o bioprocesso, principalmente quando usou-se a cepa LAB14 a 45 °C, pois a produção do ácido foi muito baixa comparada as outras temperaturas avaliadas. As condições mais favoráveis à produção do ácido de interesse foi uma cultura de inóculo com idade de 16 horas, uma rotação de 100 rpm para ambas as cepas e uma temperatura de 37 °C para LAB07 e 30 °C para LAB14, obtendo uma concentração máxima de ácido de 11,89 g/L e 10,27 g/L, produtividade de ácido lático de 0,41 g/L.h e 0,30 g/L.h e uma produção de biomassa de 1,74 g/L e 1,76 g/L para LAB07 e LAB14, respectivamente. Neste contexto, o soro de leite desproteinado e as cepas avaliadas da espécie *Lactobacillus plantarum* foram favoráveis à produção de ácido lático, ainda que essas tenham apresentando um baixo crescimento celular no meio de cultura selecionado.

Palavras-chave: Ácido lático. *Lactobaicillus plantarum*. Soro de leite.

ABSTRACT

Lactic acid is an organic compound that has great industrial importance due to its various applications already consolidated in the market and it is considered a safe compound and approved by the American Food and Drug Administration (FDA). The production of lactic acid can be carried out through chemical synthesis and by biotechnological route, with the availability of the pure isomers of this compound a determining factor in choosing the way of obtaining it. The chemical route produces a racemic mixture that interferes with the physical and chemical properties of the final product. The biotechnological route is seen as promising, considering that some species of microorganisms are capable of generating optically pure isomers and it is possible to use renewable sources as a substrate, in which it is possible to reduce the cost of the process. A possible raw material that can be used is whey, waste from the dairy industry, abundant, cheap and renewable. There are few reports in the literature on the production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* using whey as a raw material. In this context, the present study evaluated the production of lactic acid by biotechnological route in bench-scale, using two strains of the species *Lactobacillus plantarum*, specifically LAB07 and LAB14, isolated from artisanal cheese and pepper sauce, respectively, and deproteinized whey as carbon source. The age of inoculum culture, in which the strains were grown in isolation (16 h, 20 h and 24 h), temperature (30 °C, 37 °C and 45 °C), and rotation (100 rpm, 150 rpm and 200 rpm) were the parameters evaluated to conduct the experiments in an orbital shaker, using an inoculum concentration of 10% (v/v). The temperature was the operating condition that most influenced the bioprocess, especially when it was carried out using the LAB14 strain at 45 °C, as the acid production was very low compared to the other temperatures evaluated. The most favorable conditions for the production of the acid of interest were an inoculum culture aged 16 hours, a rotation of 100 rpm for both strains and a temperature of 37 °C for LAB07 and 30 °C for LAB14, obtaining a concentration of acid at the end of the fermentation of 11,89 g/L and 10,27 g/L, lactic acid productivity of 0,41 g/L.h and 0,30 g/L.h, and a biomass production of 1,74 g/L and 1,76 g/L for LAB07 and LAB14, respectively. In this context, the deproteinized whey and the evaluated strains of the species *Lactobacillus plantarum* were favorable to the production of lactic acid, even though they have low cell growth in the selected culture medium.

Keywords: Lactic acid. *Lactobaicillus plantarum*. Whey.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Isômeros espaciais do ácido lático..... Figura 2 – Resumo da produção química (A) e produção biotecnológica (B) de ácido lático..... Figura 3 – Anômeros da lactose..... Figura 4 – Resumo das etapas de conversão da lactose em lactato..... Figura 5 – Representação da metodologia de desproteinação do soro de leite..... Figura 6 – Perfil de crescimento da espécie <i>L. plantarum</i> , cepas LAB07 (a) e LAB14 (b), em meio MRS, a 37 °C e 150 rpm..... Figura 7 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) de <i>Lactobacillus plantarum</i> , LAB07 a 37 °C, 150 rpm usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas (a), 20 horas (b) e 24 horas (c)..... Figura 8 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) de <i>Lactobacillus plantarum</i> , LAB14 a 37 °C, 150 rpm usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas (a), 20 horas (b) e 24 horas (c)..... Figura 9 – Avaliação da produção de ácido lático sob influência da idade da cultura de inóculo, para cepa LAB07 (a) e LAB14 (b), baseado no teste de Tukey, com 95% de nível de significância ($p < 0,05$), no qual letras iguais indicam que não houve diferença significativa..... Figura 10 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) de <i>Lactobacillus plantarum</i> LAB07 a 30 °C (a) e 45 °C (b), a 150 rpm usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas..... Figura 11 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) de <i>Lactobacillus plantarum</i> LAB14 a 30 °C (a) e 45 °C (b), a 150 rpm usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas..... 	20 21 25 26 34 38 40 40 43 44 44
--	--

Figura 12 – Avaliação da produção de ácido lático sob influência da temperatura, para cepa LAB07 (a) e LAB14 (b), baseado no teste de <i>Tukey</i> , com 95% de nível de significância ($p < 0,05$), no qual letras iguais indicam que não houve diferença significativa.....	48
Figura 13 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) para <i>Lactobacillus plantarum</i> LAB07 a 37 °C, 100 rpm (a) e 200 rpm (b) usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas.....	49
Figura 14 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) para <i>Lactobacillus plantarum</i> , LAB14 a 30 °C, 100 rpm (a) e 200 rpm (b), usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas.....	49
Figura 15 – Avaliação da produção de ácido lático sob influência da agitação, para cepa LAB07 (a) e LAB14 (b), baseado no teste de <i>Tukey</i> , com 95% de nível de significância ($p < 0,05$), no qual letras iguais indicam que não houve diferença significativa.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição típica do soro de leite	29
Tabela 2 – Influência da idade de cultura do inóculo na produção do ácido lático por <i>L. plantarum</i> , LAB07 e LAB14, a 37 °C, 150 rpm em 72 h de processo, utilizando soro de leite desproteinado como meio de cultura.....	42
Tabela 3 – Influência da temperatura na produção do ácido lático por <i>L. plantarum</i> , LAB07 e LAB14, 150 rpm em 72 h de processo, utilizando soro de leite desproteinado como meio de cultura e uma idade de cultura de inóculo de 16 horas.....	46
Tabela 4 – Influência da agitação na produção do ácido lático por <i>L. plantarum</i> , LAB07 a 37 °C e LAB14 a 30 °C, em 72 h de processo, utilizando soro de leite desproteinado como meio de cultura e uma idade de cultura de inóculo de 16 horas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Ácido lático
BALs	Bactérias do ácido lático
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
D-AL	D-Ácido lático
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L-AL	L-Ácido lático
MRS	Man, Rogosa e Sharpe

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Objetivos.....	18
1.1.1	<i>Objetivo geral.....</i>	18
1.1.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Ácido lático	19
2.2	Produção do ácido lático.....	21
2.3	Microrganismos produtores do ácido lático.....	23
2.3.1	<i>Bactérias produtoras do ácido lático.....</i>	23
2.3.2	<i>Metabolismo de carboidratos.....</i>	24
2.4	Fatores que influenciam a produção biotecnológica do ácido lático	27
2.5	Aproveitamento do soro de leite para a produção de ácido lático.....	28
2.5.1	<i>A indústria de laticínios.....</i>	28
2.5.2	<i>O soro de leite.....</i>	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Material.....	31
3.1.1	<i>Reagentes.....</i>	31
3.1.2	<i>Bactérias do ácido lático.....</i>	31
3.2	Métodos.....	31
3.2.1	<i>Obtenção do inóculo das bactérias produtoras de ácido lático.....</i>	31
3.2.2	<i>Avaliação do crescimento de células.....</i>	32
3.2.2.1	<i>Obtenção do perfil de crescimento microbiano.....</i>	32
3.2.2.2	<i>Obtenção da curva padrão do microrganismo.....</i>	32
3.2.3	<i>Tratamento do soro de leite.....</i>	33
3.2.4	<i>Produção do ácido lático.....</i>	34
3.2.5	<i>Avaliação da influência da idade da cultura de inóculo na produção do ácido lático.....</i>	34
3.2.6	<i>Avaliação da influência da temperatura na produção do ácido lático.....</i>	35
3.2.7	<i>Avaliação da influência da rotação na produção do ácido lático.....</i>	35
3.2.8	<i>Métodos Analíticos.....</i>	35
3.2.8.1	<i>Determinação da concentração de lactose e do ácido lático.....</i>	35

3.2.8.2	<i>Determinação da concentração celular.....</i>	36
3.2.8.3	<i>Cálculo dos rendimentos.....</i>	36
3.2.9	<i>Análises estatísticas.....</i>	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Avaliação do crescimento de células em meio sintético.....	38
4.2	Avaliação da influência da idade de cultura do inóculo na produção de ácido lático.....	39
4.3	Avaliação da influência da temperatura na produção de ácido lático.....	44
4.4	Avaliação da influência da agitação na produção de ácido lático.....	48
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O ácido lático ou ácido 2-hidroxipropiônico é um composto orgânico encontrado em duas formas isoméricas diferentes, L e D, e é um importante produto químico devido às suas amplas aplicações num elevado número de indústrias. Dentro as aplicações deste composto orgânico pode-se citar, por exemplo, a produção de polímeros biodegradáveis, como o ácido poli lático (PLA), que é capaz de substituir polímeros obtidos por derivados do petróleo (TORRE et al., 2019), seu uso como acidulante na indústria de alimentos e na formulação de soluções anti-acne, além de apresentar novos usos na medicina (OLIVEIRA et al., 2018).

O mercado de ácido lático está em constante crescimento, pois é fato que os produtos finais são capazes de cumprir as leis ambientais, pois são caracterizados como verdes, renováveis e biodegradáveis, contribuindo para a tendência de crescimento contínuo nos próximos anos (OLIVEIRA et al., 2018).

Este ácido orgânico pode ser produzido por síntese química ou por fermentação microbiana, no qual a produção biotecnológica do ácido lático é a mais utilizada pela indústria, pois é capaz de produzir isômeros puros deste ácido, enquanto a síntese química produz uma mistura racêmica e utiliza uma grande quantidade de energia nos processos de separação (OLIVEIRA et al., 2018; VAN WOUVE et al., 2016; WANG, TASHIRO e SONOMOTO, 2015). A síntese biotecnológica é realizada, principalmente, através das bactérias do ácido lático (BALs), que caracterizam-se por serem Gram-positivas, não formadoras de esporos, existentes na forma de bacilo, anaeróbias, acidófilas e com complexa exigência nutricional (XIMENES et al., 2019). No mais, é possível, através desta via de síntese, a utilização de recursos renováveis como fonte de carbono e nitrogênio (BERNARNDI et al., 2016).

As BALs têm sua capacidade limitada à síntese de vitaminas do complexo B e aminoácidos. Assim, elas requerem a adição de nutrientes no meio de cultura, como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e vitaminas. No entanto, esses meios de cultura são responsáveis por grande parte do custo de produção do ácido lático, pois as matérias-primas, como açúcares refinados e amido, possuem um alto custo, representando um gargalo para esta via de obtenção. Deste modo, o uso de matérias-primas baratas são fundamentais para viabilizar a produção biotecnológica deste composto orgânico na indústria (ABEL-RAHMAN et al., 2011).

Por isso, e tendo em vista que uma das maiores preocupações do mundo, atualmente, é quanto ao gerenciamento de resíduos, principalmente industriais, e como dar um novo destino aos mesmos, é cada vez mais comum e justificável a existência de linhas de

pesquisa onde esses resíduos são utilizados como substituintes das fontes de carbono e nitrogênio, objetivando a redução de custos e, consequentemente, o desenvolvimento de novos produtos e processos (BAI et al., 2016; CIZEIKIENE et al., 2018).

Um dos resíduos gerados pela indústria de alimentos é o soro de leite, que é um subproduto líquido obtido no processo de fabricação de queijos e caseína. Esse resíduo contém de 5 a 8% (m/m) de sólidos, dos quais cerca de 60-80% são lactose e de 10-20% são proteínas (VAMVAKAKI et al., 2010). O soro de leite é um poluente, pois quando descartado sem tratamento prévio, pode causar um impacto ambiental negativo devido a sua alta Demanda Biologia de Oxigênio (DBO), que é de 50.000 mg/L, e Demanda Química de Oxigênio (DQO), que é de 80.000 mg/L (SHIPRAH et al., 2013).

Apesar dos problemas citados, esse subproduto possui diversas aplicações que podem ser utilizadas para diminuir o teor poluente que essa substância possui quando descartada no meio ambiente, dentre elas está sua utilização como fertilizante, produção de enzimas e derivados da lactose com valor agregado, como lactulose, ácido lactobionico e ácido lático (ALBUQUERQUE et al., 2018).

Além dos microrganismos e do meio de cultura utilizados, existem outros fatores que interferem no crescimento celular e no acúmulo de metabólitos em processos microbianos, como pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e grau de aeração (SOUZA et al., 2017). Uma drástica queda de pH combinada à altas concentrações de AL podem romper a membrana celular, devido ao acúmulo intracelular deste ácido que podem causar efeitos inibitórios no metabolismo celular (ABDEL-RAHMAN e SONOMOTO, 2016). A temperatura é outro fator que influencia diretamente neste bioprocesso, pois é sabido que a temperatura considerada ideal para o crescimento das BALs é entre 20 °C e 45 °C a depender da espécie selecionada, afetando os rendimentos e produtividade do ácido lático (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000; SOUZA et al., 2017).

Neste contexto, no presente trabalho investigou-se a produção biotecnológica de ácido lático utilizando o soro de leite pré-tratado sem suplementação de fonte de nitrogênio como matéria-prima, avaliando a influência das condições operacionais, sendo elas a idade das células do inóculo, temperatura e rotação, no processo de produção deste ácido orgânico. Essas condições operacionais foram avaliadas visando obter uma melhor eficiência e produtividade.

1.1 Objetivos

1.1.1 *Objetivo geral*

Estudar a produção biotecnológica de ácido lático por *Lactobacillus plantarum*, cepas LAB07 e LAB14 isoladas de queijo artesanal e molho de pimenta, respectivamente, utilizando soro de leite sem suplementação como matéria-prima.

1.1.2 *Objetivos específicos*

1. Caracterizar e pré-tratar o soro de leite;
2. Avaliar a produção de ácido lático pelas cepas selecionadas, usando soro de leite pré-tratado como meio de cultura;
3. Estudar fatores que influenciam na produção interligadas as características do inóculo, como a concentração inicial e a idade das células do inóculo;
4. Avaliar fatores que influenciam o processo produtivo, como temperatura e agitação;
5. Determinar os parâmetros de produção mais favoráveis à produção de ácido lático nas diferentes condições avaliadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ácido Lático

O ácido lático ou ácido 2-hidroxipropanóico é um ácido hidrocarboxílico de origem natural que foi, pela primeira vez, refinado de leite azedo pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele em 1780 (WANG et al., 2015). Mais tarde, em 1857, Pasteur categorizou este ácido como um metabólito de fermentação gerado por certas espécies de microrganismos. Corroborando com essa descoberta, o cientista Frémy produziu o ácido lático através de processo fermentativo, dando origem à primeira produção industrial de ácido lático nos Estados Unidos em 1881 (GHAFFAR et al., 2014).

Este composto orgânico contém alto valor comercial, pois possui uma ampla gama de aplicações que envolve a indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética e química. Atualmente, aproximadamente 82% do ácido lático produzido mundialmente é utilizado pela indústria de alimentos (IZAGUIRRE et al., 2020) devido ao seu papel crucial na fabricação de iogurtes e queijos (ÉS et al., 2018) e sua atuação como conservante e agente de ajuste de pH (JUODEIKIENE et al., 2015). Outro importante setor industrial que faz uso deste ácido é a indústria farmacêutica bem como a cosmética, atuando na formulação de pomadas, soluções anti-acne, umectantes e drogas de liberação controlada (OLIVEIRA et al., 2018).

O ácido lático é classificado como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) (JUODEIKIENE et al., 2015) e possui diversas aplicações em vários setores industriais. Na natureza, ocorre em dois isômeros ópticos, D-ácido lático (D-AL) e L-ácido lático (L-AL) (WANG et al., 2015). A molécula deste ácido contém um carbono quiral, sendo que a proporção de cada isômero confere diferentes propriedades físicas ao produto final (OLIVEIRA et al., 2018). Propriedades importantes, como a cristalinidade, podem ser controladas usando diferentes concentrações dos enantiômeros (BERNARDO et al., 2016). Isso torna a pureza enantiomérica um fator de extrema importância para a produção industrial de ácido lático, tendo em vista que isômero D- ácido lático em altas doses é considerado prejudicial aos humanos e pode causar acidose ou descalcificação (OLIVEIRA et al., 2018).

Figura 1 – Isômeros espaciais do ácido láctico



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Portanto, o isômero L-ácido láctico é preferido pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas, pois é a única forma que o corpo humano está adaptado para assimilar. Além disso, o L-AL é empregado como aditivo, acidulante, aromatizante e emulsificante, além de inibir a esporulação de bactérias em alimentos processados (OLIVEIRA et al., 2018).

Apesar de a produção do D-AL não ser interessante para as indústrias alimentícias, farmacêuticas e médicas, esse isômero, assim como o L-AL (JIANG et al., 2019), é um precursor interessante para a fabricação de bioplásticos, como o ácido polilático (KLOTZ et al., 2016). Assim, no processo produtivo do ácido polilático, quando os ácidos poliláticos provenientes dos diferentes enantiômeros são misturados, o ponto de fusão do polímero aumenta em 50 °C, resultando em um complexo altamente regular, com altos graus de cristalinidade e estabilidade térmica (BERNARDO et al., 2016).

Na área médica, o ácido láctico pode atuar na regeneração de tecidos, suturas cirúrgicas, fixação de fraturas, implantes e ligamentos, reparos de cartilagem, menisco, substituição óssea e cirurgias orais. É válido ressaltar que esse uso já foi aprovado pela *American Food and Drug Administration* (FDA) (RAMOT et al., 2016; HAMMOUCHE et al., 2012; LANAQ et al., 2013).

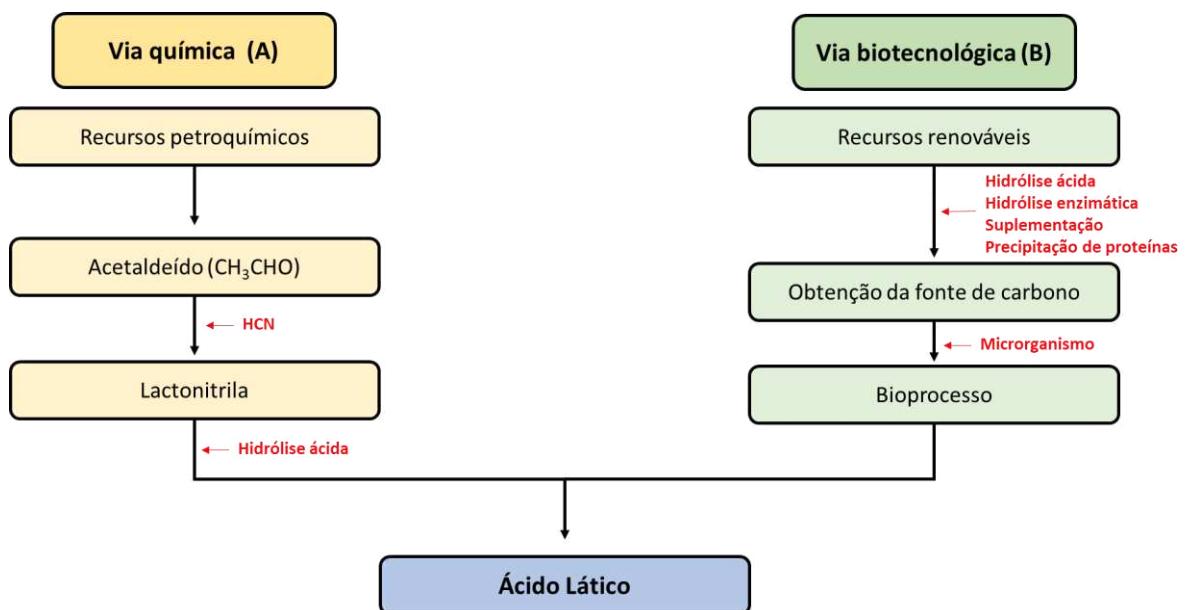
O ácido láctico atua, também, na indústria química, em específico na produção dos solventes “verdes”, como o lactato de etila (JUODEIKIENE et al., 2015) e como um composto químico potencial para a produção de plásticos renováveis e biodegradáveis, como ácido polilático (PLA), através da fermentação do açúcar, podendo substituir embalagens de alimentos e utensílios de plásticos provenientes do petróleo bruto. Este monômero para a produção de PLA proporciona diversas vantagens para este bioplástico, como: biodegradabilidade, biocompatibilidade, elasticidade e perfil de liberação bem controladas em fármacos, alta resistência química e resistência ao calor (OLIVEIRA et al., 2018).

Devido ao grande crescimento comercial dos bioplásticos, como o PLA, estima-se que o mercado atual de ácido lático é avaliado em US \$ 3,82 bilhões (IZAGUIRRE et al., 2020). O mercado global de ácido lático deve crescer a uma taxa composta de crescimento anual de 16,2% de 2019 a 2025 (OLIVEIRA et al., 2018). De acordo com a Grand View Research (GVR), para este mesmo período, há uma previsão de que a demanda geral da indústria de ácido lático seja impulsionada, pois este mercado está apresentando um crescimento significativo na América Latina, principalmente devido ao crescimento da indústria de cosméticos no Brasil e na Argentina (GVR, 2019; OLIVEIRA et al., 2018).

2.2 Produção do ácido lático

O ácido lático pode ser produzido por via química e por via biotecnológica, como demonstrado na Figura 2. A produção biotecnológica é tida como a melhor forma de se obter D-AL ou L-AL puro, quando comparado com o ácido lático produzido por síntese química. Essa última, por sua vez, produz uma mistura racêmica através de processos intensivos em energia (DE LA TORRE et al., 2019).

Figura 2 – Resumo da produção química (A) e produção biotecnológica (B) de ácido lático.



Fonte: Elaborado pela autora (Adaptado de Juodeikiene et al., 2015).

A produção química de ácido lático é realizada utilizando subprodutos da indústria química, como a lactonitrila. Nesse processo, são adicionados cianeto de hidrogênio (HCN) e acetaldeído (CH_3CHO) na fase líquida em um reator e utilizando um catalisador básico sob condições de alta pressão, formando, assim, o lactonitrilo. Posteriormente, o lactonitrilo passa por um processo de destilação para ser purificado e, em seguida, sofre uma hidrólise utilizando ácido clorídrico (HCl) ou ácido sulfúrico (H_2SO_4), momento em que, enfim, essa substância será convertida em ácido lático (NARAYANAN et al., 2004; HOFVENDAHL, HAHN e HÄGERDAL, 2000).

Este método de produção apresenta diversas desvantagens, pois é um método caro e não é capaz de gerar um produto com pureza enantiomérica, fato esse que impossibilita o controle das propriedades químicas e físicas no produto final (OLIVEIRA et al., 2018) e torna o processo de separação difícil e dispendioso (YÁÑEZ, ALONSO e PARAJÓ, 2005).

A produção biotecnológica é tida como mais eficiente, pois é capaz de produzir isômeros puros de ácidos D-lático e L-lático com alto rendimento utilizando uma ampla-gama de matérias-primas como substrato em condições moderadas de processo (KONG et al., 2019). A produção destes isômeros puros pode ser direcionada através da espécie de microrganismo utilizado. Além disso, existem outros fatores que afetam esta via de síntese, como a fonte de carbono, temperatura, pH e condições de cultivo da biomassa (JUODEIKIENE et al., 2015).

O bioprocesso para a produção do ácido de interesse é realizado, principalmente, através das bactérias do ácido lático (BALs), que convertem carboidratos, como glicose, galactose e lactose em ácido lático (LENCH, 2020). É importante destacar que bactérias do gênero *Bacillus* e *Escherichia*, e leveduras de gênero *Candida*, *Saccharomyces* e *Pichia* foram geneticamente modificadas para produzir o isômero ácido D-lático (OLIVEIRA et al., 2018; ABEL-RHAMAN et al., 2011).

A viabilidade econômica da síntese biotecnológica muitas vezes é afetada pelo custo do meio fermentativo utilizado durante o bioprocesso. Esse meio de cultivo pode representar até 30% do custo de produção do ácido lático (MARQUES et al., 2008). Por isso, vários trabalhos na literatura estudam matérias-primas acessíveis, como a palha de trigo (CIZEIKIENE et al., 2018), bagaço de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2019), resíduo de espiga de milho (KONG et al., 2019), turbéculo de alcachofra (SHI et al., 2012) e caroço de algodão, que têm sido utilizados como substituintes das fontes de carbono e nitrogênio, objetivando reduzir os custos do processo (BAI et al., 2016). Além disso, a utilização de recursos renováveis acarreta em uma menor emissão de dióxido de carbono (CO_2), em contraste com fontes baseadas em petróleo e combustíveis fósseis (BERNARDO et al., 2016).

Apesar dos benefícios da via biotecnológica para a produção do ácido lático, existem alguns gargalos, como baixa produtividade, inibição do produto e variação na padronização de lotes que elevam o custo da produção (ABDEL-RAHMAN e SONOMOTO, 2016; SHI et al., 2012).

2.3 Microrganismos produtores do ácido lático

2.3.1 Bactérias produtoras do ácido lático

O termo bactérias do ácido lático (BALs) é designado a espécies capazes de metabolizar carboidratos em ácido lático. As BALs formam um grupo heterogêneo de microrganismos que pertencem a diversos gêneros, como *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Essas bactérias são encontradas em diversos ambientes e destacam-se por estarem envolvidas em um considerável número de fermentações da área alimentícia, sendo utilizados como culturas principais ou auxiliares, visando acidificação dos alimentos e impactando nas propriedades organolépticas dos mesmos (BUSTUS et al., 2005; ISKANDAR et al., 2019). No mais, na área da saúde atuam na síntese de bacteriocina e do ácido lático (SHARMA et al., 2021).

De modo geral, essas bactérias são caracterizadas como gram-positivas, sem esporulação, acidófilas, capazes de sobreviver em uma ampla diversidade de condições ambientais, apresentam uma complexa exigência nutricional e foi relatado que a produção de ácido lático através destes microrganismos apresenta um alto rendimento e produtividade. Assim, além da fonte de carbono, as BALs requerem uma fonte de nitrogênio e uma ampla gama de vitaminas e minerais para manter o crescimento celular e a produção do ácido lático, pois apresentam uma baixa capacidade de sintetizar aminoácidos para a reprodução celular e o processo evolutivo dessas bactérias lácteas foi associado a meios de cultura ricos nutricionalmente, como o leite e a carne (OLIVEIRA et al., 2018).

É sabido que as BALs crescem em condições anaeróbias e podem ser classificadas como: homofermentativas (capazes de fermentar açúcar em ácido lático como único produto), heterofermentativas (fermentam açúcar em ácido lático, mas produzem, também, outros compostos, como etanol e ácido acético) e heterofermentativas facultativas (produzem somente o ácido lático ou demais subprodutos, dependendo das condições a que foram submetidos) (LENCH, 2020; OLIVEIRA et al., 2018).

No presente trabalho, destaca-se a espécie *Lactobacillus plantarum*. Esta espécie é a BAL mais utilizada na fermentação de sucos e vegetais, pois é capaz de tolerar e metabolizar os componentes presentes nas frutas e vegetais, como maçã, pepinos, azeitonas e repolhos (GARMASHEVA et al., 2019; WANG et al., 2021). Além disso, *Lactobacillus plantarum* é um probiótico considerado seguro e com ampla aplicação na indústria de alimentos e na área da saúde, atuando na melhora da textura, essência e preservação de alimentos, produção de bacteriocinas e de ácido lático (SHARMA et al., 2021; WANG et al., 2021).

No entanto, o grande problema na aplicação da cultura de BALs para a produção do ácido lático é a baixa taxa de reprodução celular devido à inibição pelo produto final (OTHMAN et al., 2017). Além disso, outras barreiras precisam ser enfrentadas, como a utilização de matérias-primas hidrolisadas. Elas são utilizadas visando reduzir os custos de produção do ácido lático, porém apresentam uma mistura de carboidratos, principalmente pentoses, que as cepas homofermentativas não são capazes de metabolizar ou, quando são metabolizados por cepas heterofermentativas, produzem subprodutos indesejados (TORRE et al., 2019). Um desses subprodutos é o furfural produzido pela desidratação da pentose. Este composto é considerado tóxico, pois ele está relacionado à inibição da respiração celular e da fosforilação oxidativa nos microrganismos (BUSTUS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2019).

2.3.2 Metabolismo de carboidratos

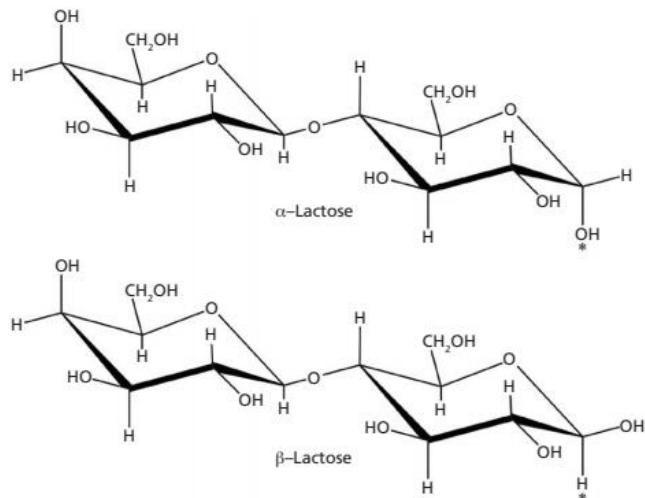
Quanto ao metabolismo de carboidratos, é sabido que as BALs são capazes de metabolizar facilmente hexoses, como glicose e galactose, sendo a metabolização de pentoses, como arabinose, ribose e xilose, restrita a algumas espécies (ABEL-RAHMAN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2018). Estudos afirmam que, na presença de uma mistura de carboidratos, existe uma tendência das BALs em fermentá-los de forma sequencial. De acordo com o que foi relatado, há uma preferência pela metabolização da glicose. Isto pode ser explicado, pois a glicose reprime o consumo dos outros açúcares presentes no meio devido à repressão catabólica pelo carbono (TORRE et al., 2019). Esta utilização sequencial torna o processo de fermentação complexo e pode reduzir o rendimento e a produtividade (ABEL-RAHMAN et al., 2011).

As bactérias lácticas podem gerar ácido lático através da degradação homo ou heterofermentativa de açúcares. A conversão homofermentativa de açúcares é realizada pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), mais conhecida como via glicolítica ou glicólise, em cujas condições ideais, o rendimento de conversão das diferentes fontes de carbono em ácido lático pode ser próximo a 100% (BUSTUS et al., 2008). O uso de pentoses como fonte de carbono é realizado por via heterofermentativa, que, por sua vez, realiza a metabolização destes açúcares

através da via 6-fosfoglutanato/fosfocetolase (6-PG/PK). Porém, sua utilização resulta na produção de subprodutos, como CO₂, etanol, ácido acético ou lactato, em quantidades equimolares, afetando negativamente o custo de purificação do produto de interesse (ABEL-RAHMAN et al., 2011; BUSTUS et al, 2008, OLIVEIRA et al., 2018).

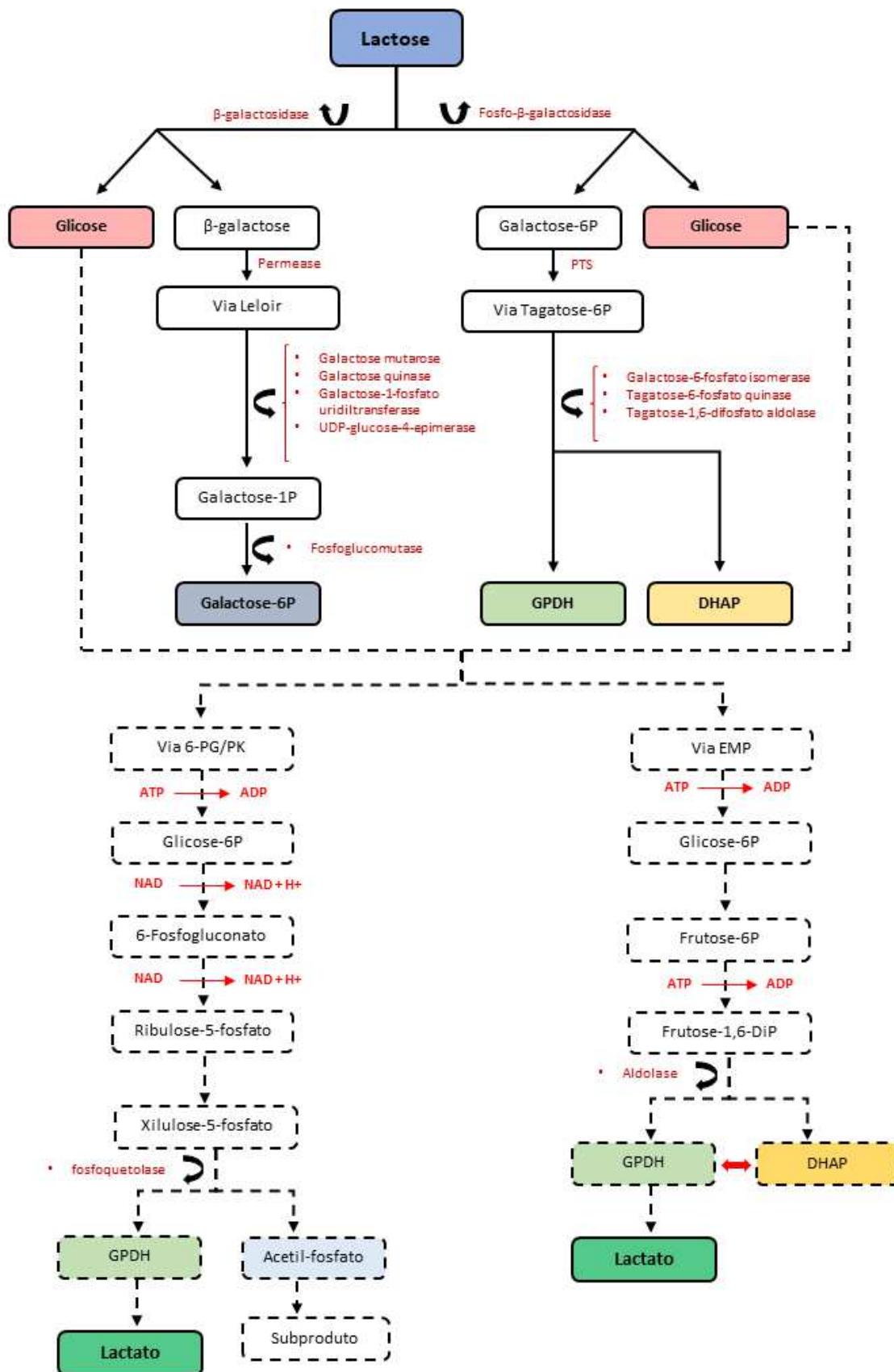
Neste trabalho, foi utilizado o soro de leite como meio de cultura, sendo a lactose, o principal carboidrato metabolizado pelas BALs. A lactose (C₁₂H₂₂O₁₁) é um dissacarídeo formado por uma ligação glicosídica β (1-4) entre o primeiro carbono da D-galactose e o quarto carbono da D-glicose, existindo em duas formas anoméricas em um equilíbrio dinâmico, a α-lactose e a β-lactose, representados na Figura 3 (DURHAM, 2009). A metabolização deste carboidrato está diretamente ligada a processos fermentativos envolvendo bactérias lácticas e é possível através da enzima β-galactosidase que hidrolisa este carboidrato, gerando glicose e β-galactose (ISKANDAR et al., 2019; WU, CHEUNG e SHAH, 2015). Após a célula absorver a lactose, esse composto pode ser metabolizado através de duas vias: A via de Leloir e a via Tagatose-6-Fosfato (ISKANDAR et al., 2019), como pode ser observado na Figura 4.

Figura 3 – Anômeros da lactose.



Fonte: Altamimi et al. (2017).

Figura 4 – Resumo das etapas de conversão da lactose em lactato.



Fonte: Elaborado pela autora (Adaptado de Oliveira et al,2018; Wu, Cheung e Shah, 2015).

Na via de Leloir, após a hidrólise da lactose em glicose e β-galactose, ocorre, primeiramente, a captação da galactose através de uma permease específica. A β-galactose, por sua vez é transportada e convertida em glicose-1P por reações no qual utilizam as enzimas galactose mutarotase, galactose quinase, galactose-1-fosfato uridiltransferase e UDP-glucose-4-epimerase como intermediários. Posteriormente, a glicose-1P é transformada pela enzima fosfoglucomutase em glicose-6P, que é um intermediário da glicólise e da via 6-PG/PK para a produção do lactato, forma ionizada do ácido láctico (ISKANDAR et al., 2019; NEVES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2018; WU, CHEUNG e SHAH, 2015).

Enquanto isso, na via da Tagatose-6P, a captação da lactose e da galactose ocorre através de um sistema de fosfotransferase (PTS), deste modo a lactose-6P é hidrolisada em glicose e galactose-6P pela enzima fosfo-β-galactosidase. Em seguida, a galactose-6P é convertida através das enzimas galactose-6-fosfato isomerase, tagatose-6-fosfato quinase e tagatose-1,6-difosfato aldolase em duas trioses, o gliceraldeído-3-fosfato (GPDH) e o Di-hidroxiacetona-fosfato (DHAP), que posteriormente, entram nas vias homoláticas ou heteroláticas de produção do lactato (ISKANDAR et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018; WU, CHEUNG e SHAH, 2015).

2.4 Fatores que influenciam a produção biotecnológica de ácido láctico

O crescimento celular e a produção de metabólitos são influenciados por parâmetros, como a composição do meio de cultura e condições operacionais, por exemplo o pH e a temperatura. Neste contexto, o controle desses fatores é fundamental para a otimização de processos biotecnológicos (SOUZA et al., 2017; YANG et al., 2018). Já as bactérias lácticas necessitam de condições específicas de crescimento o que afeta diretamente na produção do ácido láctico.

Durante o bioprocesso de produção do ácido láctico, há uma queda gradual do pH devido à produção deste ácido orgânico, acarretando em um efeito inibitório sobre a atividade metabólica das BALs e, consequentemente, alterando o rendimento de AL. Neste contexto, a utilização de agentes neutralizantes é realizada, visando minimizar a inibição pelo produto. Porém, a neutralização do ácido láctico não é vantajosa do ponto de vista industrial, pois aumenta etapas no processo produtivo e gera resíduos sólidos, o que não é interessante para o meio ambiente (SINGHVI, ZENDO e SONOMOTO, 2020).

A temperatura é outro fator crucial a ser avaliado e controlado durante o processo fermentativo, pois pode haver o crescimento de microrganismo indesejados quando utilizada a temperatura incorreta, no qual esta condição operacional pode afetar consideravelmente as estruturas das culturas microbianas (CHO et al., 2015; MOONGA et al., 2021). Porém, influência da temperatura, assim como a da agitação, são ainda pouco estudados.

Entretanto, é cada vez maior, a quantidade de estudos que abordam a utilização de resíduos alimentares e biomassa lignocelulósica como fonte de carbono para o cultivo de biomassa e conversão dos substratos disponíveis em ácido lático (TORRE et al., 2019). O uso destes recursos renováveis, como o soro de leite que foi usado neste trabalho, não oferece nenhuma contribuição líquida de dióxido de carbono para a atmosfera, ao contrário de fontes baseadas em petróleo e combustíveis fósseis. Porém, quando utilizados compostos hemicelulósicos ocorre a produção de pentoses que são metabolizadas somente por bactérias heteroláticas, gerando subprodutos, como etanol e acetato, que diminuem o rendimento de AL e geram perdas de açúcar (ABEL-RAHMAN e SONOMOTO, 2016; HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000; PARRA-RAMÍRES, MARTINEZ e CARDONA, 2019).

2.5 Aproveitamento do soro de leite para a produção de ácido lático

2.5.1 A indústria de laticínios

Dentre os setores industriais que possuem intensa atividade, destaca-se a indústria alimentícia. O processo de produção de alimentos apresenta uma desvantagem ambiental, pois produz resíduos orgânicos extremamente poluentes, que são despejados no meio ambiente (ALBUQUERQUE et al., 2018), como ocorre na indústria de laticínios. A partir do leite, é possível gerar uma ampla gama de alimentos, como iogurtes, queijos e manteiga. No Brasil, a produção de leite possui grande importância, pois contribui com o desenvolvimento de várias regiões, gerando empregos e renda para a população local (SILVA, BUENO e SÁ, 2017).

A indústria de laticínios é considerada uma das mais poluentes dentre os setores alimentícios, pois essa consome uma grande quantidade de água, além de gerar gases do efeito estufa, como metano (CH_4) e gás carbônico (CO_2), e líquidos, como águas residuais e soro de leite (FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2017). No mais, este tipo de indústria gera efluentes líquidos com elevados teores de matéria-orgânica, como gorduras e nutrientes, que os tornam a principal fonte de poluição da produção de produtos lácteos (SILVA, BUENO e SÁ, 2017).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2020 foram produzidos mais de 25 bilhões de litros de leite cru industrializados. A produção deste

ano foi maior que a produção de leite industrializado em 2018, no qual foram produzidos mais de 24 bilhões de litros de leite (IBGE, 2021), sendo que, neste mesmo ano, foram produzidos uma quantidade superior a 1,6 milhões de toneladas de soro de leite (IBGE, 2019), que é um dos principais resíduos gerados pela indústria alimentícia (ALBUQUERQUE et al., 2018).

2.5.2 O soro de leite

O soro de leite é um resíduo líquido gerado após as etapas de precipitação e remoção da caseína e das gorduras do leite no processo de fabricação de queijos (DERELI et al., 2019). De modo geral, primeiramente o leite cru é pasteurizado, visando reduzir possíveis contaminações, e há, em seguida, a realização do processo de coagulação. Durante esse processo é gerado soro de leite e coalhada que serão separados, no qual a coalhada gerará o queijo e soro de leite adicional (FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2017).

Este subproduto representa em torno de 85-95% do volume do leite e é composto, majoritariamente, por lactose e proteínas, havendo em sua composição a presença de compostos como cálcio, fosfato, lactase, cloreto, lipídios e ácido láctico em quantidades significativamente menores, como pode ser observado na Tabela 1 (ALBUQUERQUE et al., 2018; DERELI et al., 2019; KOSSEVA, 2009).

Tabela 1 – Composição típica do soro de leite

Componentes	Soro de leite doce (g/L)
Sólidos totais	63,0-70,0
Lactose	46,0-52,0
Proteínas	6,0-10,0
Cálcio	0,4-0,6
Fosfato	1,0-3,0
Lactase	2,0
Cloreto	1,1

Fonte: Kosseva, 2009.

Devido a sua alta demanda química e bioquímica de oxigênio (DQO e DBO, respectivamente), este composto é considerado um efluente muito concentrado, sendo o seu descarte sem tratamento prévio proibido pela Resolução nº 430, 13 de maio de 2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Tendo em vista que a água residual do

soro de leite é biodegradável, a alta carga biológica pode ser atribuída à lactose, principalmente (ALBUQUERQUE et al., 2018; DEREKI et al., 2019; LENCH, 2020; SILVA, BUENO e SÁ, 2017). No entanto, esse carboidrato pode ser utilizado como substrato em processos fermentativos para a produção de diversos produtos, como ácido lático, ácido lactobiônico, 2,3-butanodiol, biogás, lactulose e nisina (ALBUQUERQUE et al., 2018; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2017).

O uso deste resíduo na produção de bioquímicos é uma alternativa para diminuir o impacto ambiental negativo que o mesmo causa, pois o soro de leite é considerado uma fonte de carbono de baixo custo, disponível e renovável (FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ et al., 2017). Por exemplo, Albuquerque et al. (2018) utilizou o soro de leite como matéria-prima para produção enzimática de lactulose através da enzima β -galactosidase. Já Alonso, Rendueles e Díaz (2015) e Lench (2020) utilizaram este resíduo industrial na produção biotecnológica de ácido lactobiônico e ácido lático, respectivamente.

Porém, apesar de ser benéfico o uso do soro de leite cru para a produção do ácido lático, existem alguns problemas que devem ser solucionados, como a contaminação microbiológica natural do soro de leite, que pode causar interrupções em biorreatores (LENCH, 2020) e a interferência negativa na atividade da enzima β -galactosidase ocasionada pelas proteínas presentes no soro (LIMA et al., 2013). Essa enzima é responsável pela conversão de lactose-6-fosfato em galactose-6-fosfato e glicose (NEVES, 2005), ou seja, ela afeta a conversão do substrato, lactose, neste caso, em ácido lático pelas bactérias lácticas. Por isso, é importante avaliar a viabilidade do cultivo de microrganismos que apresentem uma boa produção de ácido lático em soro de leite.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea (Ácido fosfórico e ácido lático) e da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Lactose). O soro de leite em pó foi adquirido pela indústria Fortpan (Fortaleza-CE).

3.1.2 Bactérias do ácido lático

Nos experimentos de produção do ácido lático realizados neste trabalho, utilizou-se a BAL da espécie *Lactobacillus plantarum*, em específico as cepas LAB07 e LAB14, isoladas de queijo artesanal e molho de pimenta, respectivamente, do mercado local de Fortaleza (Ceará, Brasil), pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia – LEMBiotech do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As cepas são armazenadas a -80 °C em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com 20% de glicerol (v/v) (XIMENES et al., 2019).

Ambas as cepas, possuem sua sequência de genes depositada no GenBank, podendo ser visualizado através do número de acesso FJ05311 para *L. plantarum* LAB07 e FJ05315 para *L. plantarum* LAB14.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção do inóculo das bactérias produtoras de ácido lático

A obtenção do inóculo foi realizada em Erlenmeyer com volume de 250 mL, gerando privação de oxigênio, preenchido com caldo sintético com formulação baseada na composição do meio MRS. Esse meio sintético é composto de 10 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 10 g/L de extrato de carne, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de acetato de sódio, 2 g/L de fosfato de potássio, 1 g/L de tween 80, 2 g/L de citrato de amônio, 0,05 g/L de sulfato de manganês e 0,1 g/L de sulfato de manganês. Deste modo, foram retiradas colônias das placas de Petri, no qual as cepas LAB07 e LAB14 foram cultivadas, e, em seguida, foram incubadas, em triplicata, utilizando agitador orbital (Tecnal – TE 422, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 37 °C e 150 rpm para a condução dos bioprocessos.

3.2.2 Avaliação do crescimento de células

3.2.2.1 Obtenção do perfil de crescimento microbiano

Para conhecer o perfil de crescimento dos microrganismos utilizados, as cepas foram cultivadas em frasco Erlenmeyer de 250 mL e usando o meio sintético com formulação baseada na composição do meio MRS. As incubações foram conduzidas em agitador orbital a 150 rpm, 37 °C, em triplicata. Amostras foram retiradas em intervalos de 1 hora, totalizando 17 horas de experimento. Foram realizadas análises por espectrofotometria para determinar a densidade óptica, em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22) a um comprimento de onda de 600 nm, utilizando água destilada como valor de referência.

3.2.2.1 Obtenção da curva padrão do microrganismo

A curva padrão foi obtida através da análise da massa seca. Essa curva é um instrumento necessário para determinar a concentração celular presente em determinada suspensão homogênea. Assim, para a espécie utilizada no estudo foi preparado o inóculo das cepas isoladas, em triplicata, usando caldo sintético, em agitador orbital a 150 rpm, 37 °C por 24 horas, objetivando a concentração do microrganismo no meio de cultura.

Após o procedimento de concentração, o meio é transferido assepticamente para tubos e centrifugado a 3500 rpm por 15 minutos, desprezando o sobrenadante ao fim do processo. No precipitado adquirido, é adicionado 20 mL de água destilada e a suspensão é homogeneizada em vortex e centrifugada novamente nas condições citadas. Esse protocolo é repetido por mais duas vezes, porém, na última repetição é adicionado um volume de 25 mL de água destilada e homogeneizado formando a suspensão microbiana concentrada.

Para a obtenção da biomassa seca é necessário a utilização de cápsulas de porcelana que devem ser previamente limpas, secas em estufa bacteriológica (Tecnal TE-397/4, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 90 °C por 24 h, resfriadas em dessecador e pesadas em balança analítica.

Assim, é transferido um volume de 5 mL da suspensão microbiana homogeneizada para as cápsulas de porcelana, em triplicata, que foram secas em estufa a 90 °C por 24h, resfriadas em dessecador e pesadas em balança analítica.

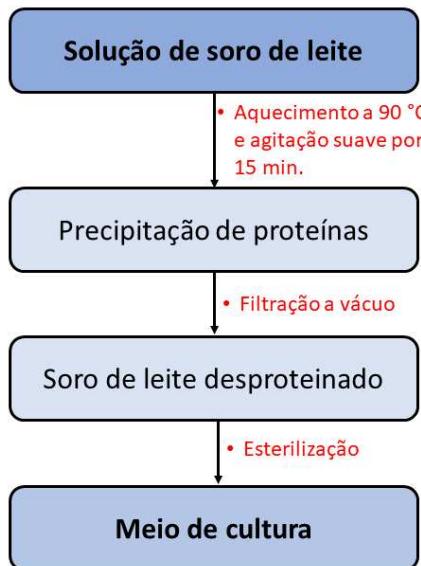
Além da biomassa seca, é realizada a leitura das absorbâncias. Assim, a suspensão microbiana é diluída em balão volumétrico de diferentes volumes (10, 25, 50, 100, 200, 250, 500 e 1000 mL), no qual amostras de 1 mL foram retiradas de cada balão e medida a absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, utilizando água destilada como valor de referência.

A partir dos valores de biomassa seca e absorbância adquiridos é possível realizar uma correlação dos mesmos e obter, enfim, a curva padrão para as cepas de *Lactobacillus plantarum* LAB07 e LAB14.

3.2.3 Tratamento do soro de leite

Para a obtenção do meio de cultura foi utilizada uma solução em água destilada, contendo uma concentração de 50 g/L de soro de leite. Após a preparação da solução, as proteínas do soro de leite foram precipitadas por aquecimento a 90 °C sob suave agitação por 15 minutos, de acordo com a metodologia adaptada de Lima et al. (2013). Após a sedimentação das proteínas, o soro de leite pré-tratado foi filtrado a vácuo e teve seu pH ajustado para 6,0. Então, o soro de leite desproteinado foi utilizado como meio de cultivo e autoclavado a 110 °C por 10 minutos. A Figura 5 apresenta, de forma resumida, o procedimento de precipitação das proteínas do soro de leite.

Figura 5 – Representação da metodologia de desproteinação do soro de leite.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Após a realização da desproteinação do soro de leite, este foi caracterizado quanto à concentração inicial de lactose de acordo com a metodologia descrita no tópico 3.2.8.1 deste trabalho. Deste modo, foi detectado uma concentração inicial de $70,08 \pm 5,15$ g/L de lactose.

Esta concentração de lactose presente no meio fermentescível foi superior a concentração de soro de leite presente na solução preparada para a obtenção do meio de cultura. Isto pode ser explicado, devido à alta temperatura no qual a solução de soro de leite foi

submetida na etapa da precipitação de proteínas, podendo ter acarretado na evaporação da água presente na solução em questão e, consequentemente, no aumento da concentração inicial de lactose presente no meio de cultura.

3.2.4 Produção do ácido lático

Para a produção de ácido lático, foram avaliados três parâmetros distintos: a idade da cultura de inóculo, a temperatura e a rotação durante o bioprocesso. As células foram inoculadas para alcançar a concentração de biomassa utilizada para cada ensaio e o soro de leite foi utilizado como meio de cultura. O processo foi conduzido em agitador orbital com Erlenmeyer de capacidade de 250 mL contendo 90 mL de soro de leite desproteinado e 10 mL do inóculo (10 % v/v).

3.2.5 Avaliação da influência da idade da cultura de inóculo na produção do ácido lático

Neste estudo, foram avaliadas três idades de inóculo distintas, no qual as cepas LAB07 e LAB14 foram cultivadas isoladamente em caldo sintético, em triplicata, a 37 °C e 150 rpm em agitador orbital nos tempos de 16 h, 20 h e 24 h. O bioprocesso para a avaliação da influência destes tempos de inóculo na produção do ácido lático foi conduzido nas mesmas condições operacionais de obtenção do inóculo (37 °C e 150 rpm), tendo duração de 72 horas. É importante ressaltar que durante o bioprocesso foram retiradas amostras para a determinação da concentração de células, que foi determinada por densidade óptica, e concentração de lactose e ácido lático, que foi obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3.2.6 Avaliação da influência da temperatura na produção do ácido lático

Após a avaliação da idade da cultura de inóculo, foram avaliadas a influência das temperaturas 30 °C, 37 °C e 45 °C na produção de ácido lático. As cepas LAB07 e LAB14 foram cultivadas isoladamente em meio sintético durante o tempo selecionado na etapa anterior deste estudo para, em seguida, serem inoculadas ao meio do bioprocesso, soro de leite desproteinado. Esse experimento foi realizado em triplicata, em agitador orbital a 150 rpm por 72 horas, nas diferentes temperaturas. Durante a avaliação desta influência foram retiradas amostras para a determinação da concentração de células, que foi determinada por densidade óptica, e concentração de lactose e ácido lático, que foi obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3.2.7 Avaliação da influência da rotação na produção do ácido lático

Depois de avaliar a idade da cultura do inóculo e a temperatura para ambas as cepas, foi avaliado, também, a influência da rotação no bioprocesso. Os experimentos foram conduzidos em agitador orbital nas rotações de 100 rpm, 150 rpm ou 200 rpm por 72 horas e na temperatura que apresentou melhor desempenho na produção do ácido lático, bem como no tempo de inóculo previamente determinado. Durante a avaliação desta influência, foram retiradas amostras para a determinação da concentração de células, que foi determinada por densidade óptica, e concentração de lactose e ácido lático, que foi obtida através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3.2.8 Métodos analíticos

3.2.8.1 Determinação da concentração de lactose e do ácido lático

As amostras coletadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo *Thermo Finnigan Surveyor* (HPLC System, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, EUA), com detector de índice de refração e coluna Supelco 610 H, em relação à concentração de lactose e ácido lático, que possuem tempos de retenção de 10 minutos e 17 minutos, respectivamente. O eluente utilizado foi solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,1% (v/v) em água MiliQ (Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA), com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. As análises foram realizadas a 30 °C e o volume de injeção de amostras foram de 20 µL.

3.2.8.2 Determinação da concentração celular

A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Biochrom Libra S22), utilizando um comprimento de onda equivalente a 600 nm e água destilada como valor de referência. Então, a concentração celular foi calculada utilizando a curva de calibração correlacionando-se a densidade óptica observada (absorbância) com a massa celular seca obtida do cultivo das cepas em meio sintético com formulação baseada na composição do MRS.

3.2.8.3 Cálculo dos rendimentos

Para o cálculo dos rendimentos do processo de produção do ácido lático, foram utilizados os dados obtidos experimentalmente (concentração de substrato e produto). As produtividades de ácido lático foi calculada pelas Equação 2:

$$P^{AL} = \frac{P_f - P_0}{t} \quad (2)$$

sendo:

P^{AL} = Produtividade de ácido lático (g/L.h)

P_f = Concentração final de ácido lático (g/L)

P_0 = Concentração inicial de ácido lático (g/L)

t = Tempo de processo (h)

O rendimento global de produto baseado no consumo de substrato foi determinado usando a Equação 4:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \quad (4)$$

sendo:

$Y_{P/S}$ = Fator de conversão de substrato em produto (g/g)

P_f = Concentração final de ácido lático (g/L)

P_0 = Concentração inicial de ácido lático (g/L)

S_f = Concentração final de lactose (g/L)

S_0 = Concentração inicial de lactose (g/L)

A máxima concentração de biomassa ($X_{máx}$) e produto ($P_{máx}$) foi definida como a maior concentração obtida durante o processo fermentativo.

3.2.9 Análises estatísticas

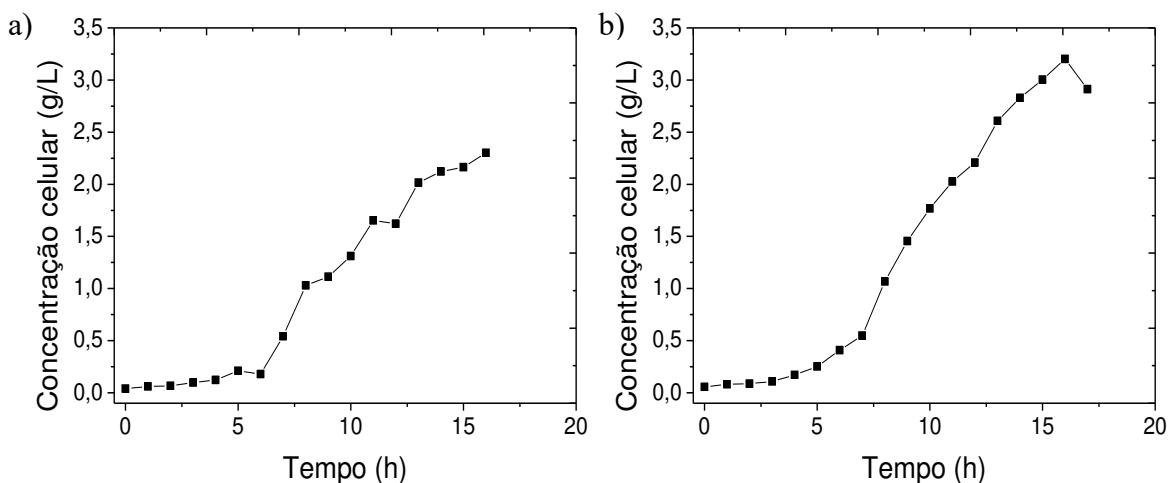
Os resultados foram analisados estatisticamente usando o software Minitab® 19, no qual utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95% e uma probabilidade de 5% ($p < 0,05$). Além disso, utilizou-se o Teste de Tukey para avaliar as diferenças significativas entre os parâmetros analisados (tempo de inóculo, temperatura e a rotação).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do crescimento de células em meio sintético

Os perfis da concentração celular para *L. plantarum* LAB07 e LAB14 em meio sintético de formulação baseada na composição do MRS, estão representados nas Figuras 6a e 6b.

Figura 6 – Perfil de crescimento da espécie *L. plantarum*, cepas LAB07 (a) e LAB14 (b), em meio MRS.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Observando a Figura 6a e Figura 6b, é notório que as duas cepas avaliadas apresentam uma fase lag semelhante, iniciando suas fases de intensa multiplicação, fase log, a partir de 4 horas, e que há uma desaceleração do crescimento a partir de 16 horas de experimento para a cepa LAB07. Porém, a cepa LAB14 apresenta um maior crescimento no meio formulado baseado na composição do meio MRS, com uma maior fase exponencial.

A partir dos perfis obtidos, foi selecionado a idade de 16 horas como o tempo mínimo de cultivo do inóculo para a avaliação da influência da idade da cultura de inóculo na concentração do produto de interesse no bioprocesso. Assim, foram avaliadas as idades de 16 h, 20 h e 24 h, tendo em vista que o ácido lático é produto final do metabolismo celular das BALs (ABDEL-RAHMAN, TASHIRO e SONOMOTO, 2013) e que a fase estacionária do crescimento celular é conhecida pela intensa produção de metabólitos (KUMAR et al., 2021; SHARMA et al., 2021).

Ao correlacionar biomassa seca e densidade óptica, foi possível obter as curvas

padrão para as cepas LAB07 e LAB14, representadas pelas Equação 5 e Equação 6, respectivamente.

$$\text{Concentração LAB07 } \left(\frac{g}{L}\right) = ABS_{LAB07} \times 0,3208 \quad (5)$$

Em que, ABS_{LAB07} : absorbância obtida em determinado tempo de processo da cepa LAB07

$$\text{Concentração LAB14 } \left(\frac{g}{L}\right) = ABS_{LAB14} \times 0,316 \quad (6)$$

Em que, ABS_{LAB14} : absorbância obtida em determinado tempo de processo da cepa LAB14

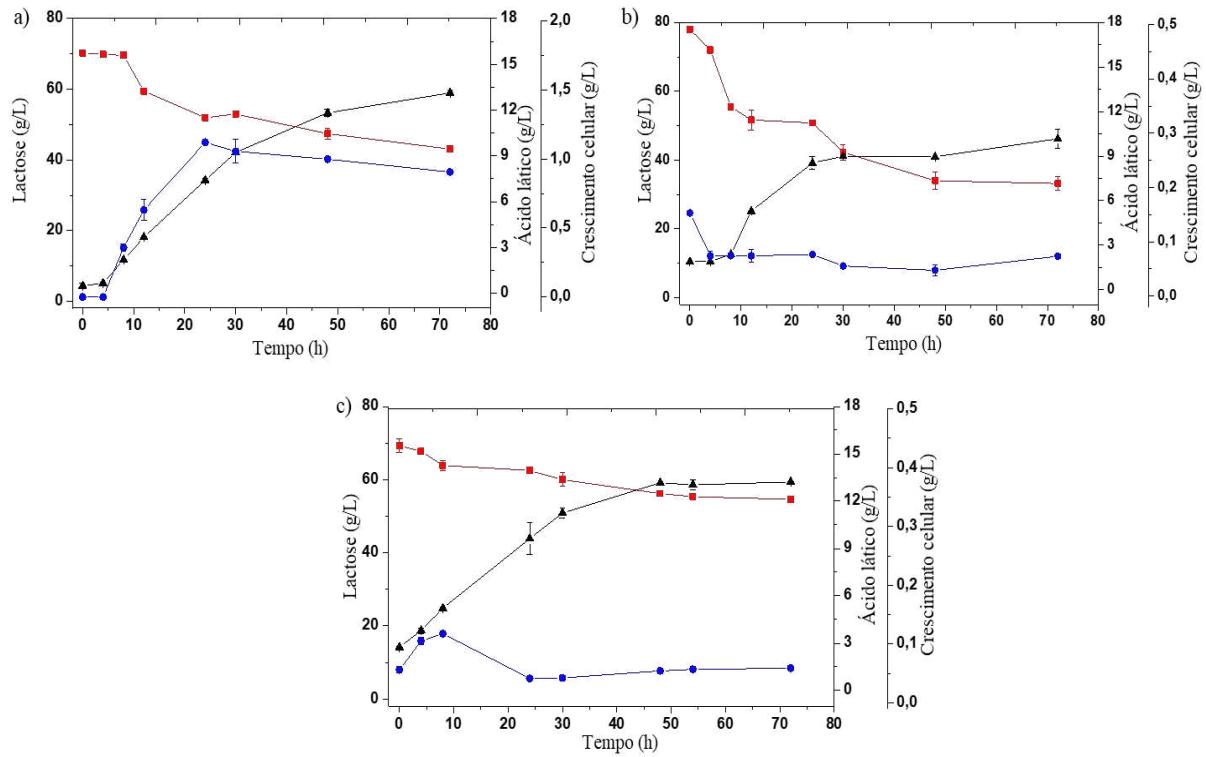
A partir dessas equações, foi possível converter os valores de absorbância obtidos durante o bioprocesso de produção do ácido lático em concentração celular (g/L) e avaliar a viabilidade do soro de leite como meio de cultura para a produção de biomassa.

4.2 Avaliação da influência da idade de cultura do inóculo na produção de ácido lático

Um dos parâmetros avaliados no processo de produção do ácido lático foi a idade de cultura do inóculo. Neste estudo, as cepas LAB07 e LAB14 foram cultivadas em meio MRS por períodos de 16 h, 20 h e 24 h para, em seguida, serem inoculadas ao soro de leite desproteinado.

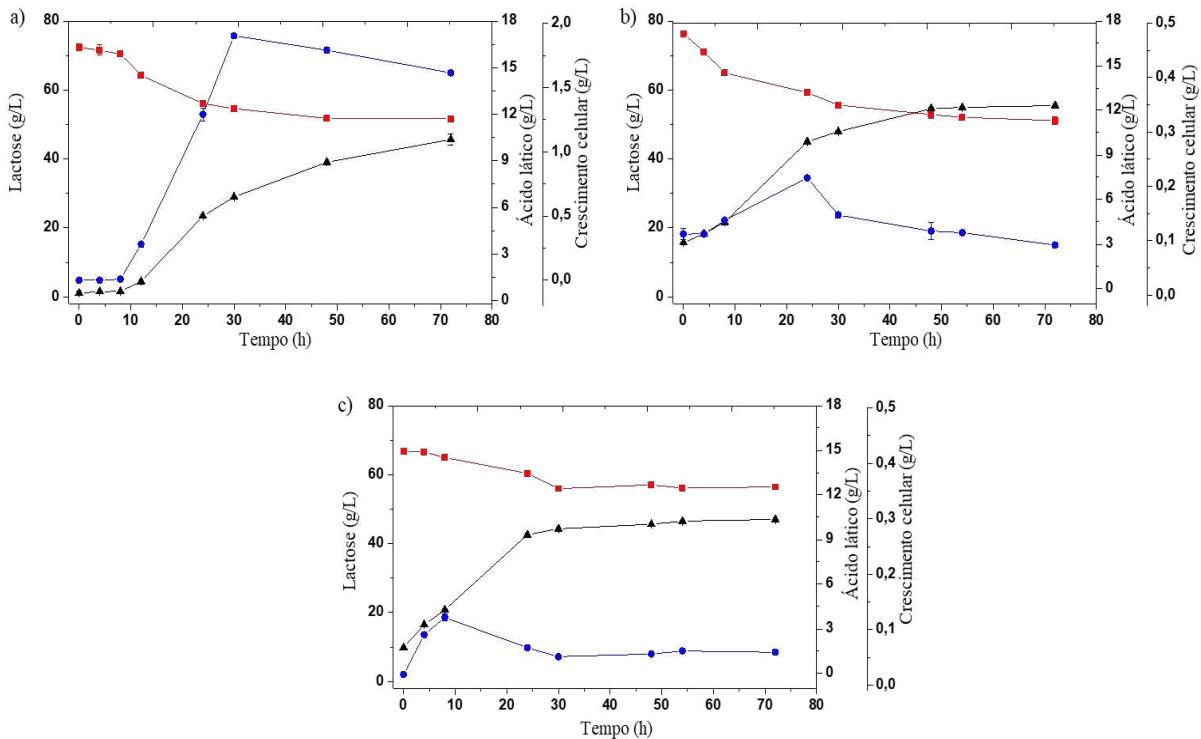
Os perfis de produção de AL, consumo de lactose e crescimento celular para cada idade do inóculo estão apresentados nas Figuras 7 e Figura 8.

Figura 7 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido láctico (▲) e crescimento celular (●) de *Lactobacillus plantarum*, LAB07 a 37 °C, 150 rpm usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas (a), 20 horas (b) e 24 horas (c).



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Figura 8 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido láctico (▲) e crescimento celular (●) de *Lactobacillus plantarum*, LAB14 a 37 °C, 150 rpm usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas (a), 20 horas (b) e 24 horas (c).



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

A partir dos perfis expostos é possível constatar que as cepas da bactéria *L. plantarum* produziram ácido láctico a partir de 8 horas de experimento. Porém, é notório que ambas as cepas apresentaram um baixo crescimento celular utilizando o soro de leite como meio de cultura, pois, nos bioprocessos em que se utilizou culturas de inóculo com idade de 20 horas e 24 horas, a concentração de células foi inferior a 0,5 g/L (Figura 7b e 7c e Figura 8b e 8c).

Neste estudo, as bactérias *Lactobacillus plantarum* LAB07 e LAB14 foram cultivadas a 37 °C e 150 rpm utilizando caldo MRS como meio de cultura e obtiveram um $X_{\text{máx}}$ de 2,30 g/L para LAB07, e 3,20 g/L para LAB14, indicando que o soro de leite não cumpre com as exigências nutricionais requeridas por esta espécie.

Foi relatado na literatura que o soro de leite, apesar de benéfico para a produção de ácido láctico, não possui composição nutricional suficiente para o cultivo das BALs (LENCH, 2020), necessitando, deste modo, que haja a suplementação deste meio de cultura com vitaminas, aminoácidos e peptídeos (SHI et al., 2012).

Além da complexidade nutricional exigida pela espécie, alguns outros fatores podem ser considerados interferentes da reprodução do microrganismo utilizado, como a acidez excessiva (inibição pelo produto) ou a presença de oxigênio no ambiente do bioprocesso, tendo em vista que estes microrganismos se caracterizam por serem acidófilos e anaeróbios (XIMENES et al., 2019). Outro fator que pode estar afetando negativamente a reprodução das cepas é a alta concentração de lactose presente na composição do soro de leite, causando inibição pelo substrato. Essa inibição caracteriza-se por prolongar a fase lag de crescimento, gerar estresse osmótico e lise celular, reduzindo a utilização do substrato (ABDEL-RAHMAN e SONOMOTO, 2016).

Na Tabela 2 é possível visualizar as diferenças de rendimentos, $P_{\text{máx}}$ e $X_{\text{máx}}$, ocasionados pela influência da idade de cultura do inóculo, para as cepas LAB07 e LAB14.

Tabela 2 – Influência da idade de cultura do inóculo na produção do ácido lático por *L. plantarum*, LAB07 e LAB14, a 37 °C, 150 rpm em 72 h de processo, utilizando soro de leite desproteinado como meio de cultura.

Cepas	LAB07			LAB14		
Parâmetros						
Tempo de inóculo (h)	16	20	24	16	20	24
P _{máx} (g/L)	13,12 ± 0,16	8,54 ± 0,43 ⁱⁱ	11,24 ± 0,30 ⁱⁱⁱ	10,37 ± 0,36	10,56 ± 0,05 ⁱⁱⁱ	9,33 ⁱⁱ
Produtividade de P _{máx} (g/L.h)	0,17	0,27	0,28	0,13	0,24	0,31
X _{máx} (g/L)	1,11 ⁱⁱ	0,07	0,11 ⁱ	1,90 ⁱⁱⁱ	0,21 ⁱⁱ	0,12 ⁱ
Y _{P/S} (g/g)	0,59	0,13	0,79	0,41	0,35	1,32

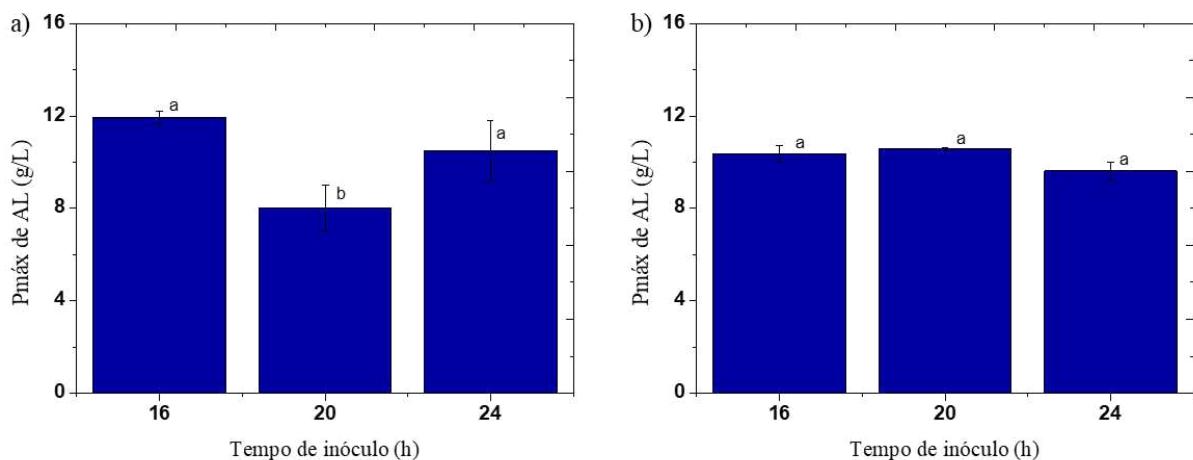
(i): Produção máxima obtida em 8 h; (ii) Produção máxima obtida em 24 h; (iii) Produção máxima obtida em 30 h; (iiii) Produção máxima obtida em 48 h; (ij) Produção máxima obtida em 54 h.

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Analisando a Tabela 2, é perceptível que ambas as cepas apresentaram desempenho semelhante de produção do ácido lático, independentemente da idade da cultura de inóculo utilizada, o que não ocorre com o crescimento da biomassa durante o bioprocesso, que, por sua vez, sofreu interferência desta condição. Esta semelhança pode ser correlacionada com a possível fase de crescimento em que as cepas se encontravam, fim da fase log e início da fase estacionária para a idade de 16 h e fase estacionária para as idades de 20 h e 24 h, tendo em vista que foram avaliados os mesmos tempos de cultivo.

Visando selecionar a condição que obteve uma melhor produção de ácido lático, realizou-se a análise estatística, no qual o desvio padrão combinado foi usado e os resultados estão apresentados na Figura 9a e 9b.

Figura 9 – Avaliação da produção de ácido lático sob influência da idade de cultura de inóculo, para cepa LAB07 (a) e LAB14 (b), baseado no teste de *Tukey*, com 95% de nível de significância ($p < 0,05$), no qual letras iguais indicam que não houve diferença significativa.



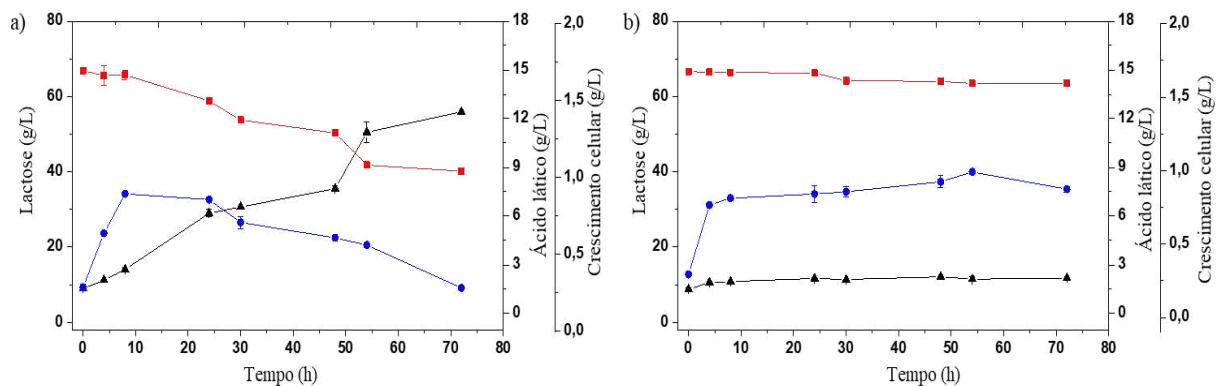
Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Para a cepa LAB07 não houve diferença significativa para os tempos de 16 h e 24 h, bem como as concentrações máximas de ácido lático obtidas nesses tempos de inóculos foram maiores comparadas ao tempo de 20 h. Enquanto isso, para a cepa LAB14, a $P_{\text{máx}}$ de ácido lático não apresentou diferença significativa entre as idades de inóculo avaliadas. Assim, para ambas as cepas foi selecionada idade de cultura de inóculo equivalente a 16 horas, objetivando reduzir o tempo de processo e o consumo de energia. Deste modo, os experimentos posteriores que visavam produzir ácido lático foram todos realizados utilizando esta idade de cultura de inóculo.

4.3 Avaliação da influência da temperatura na produção de ácido lático

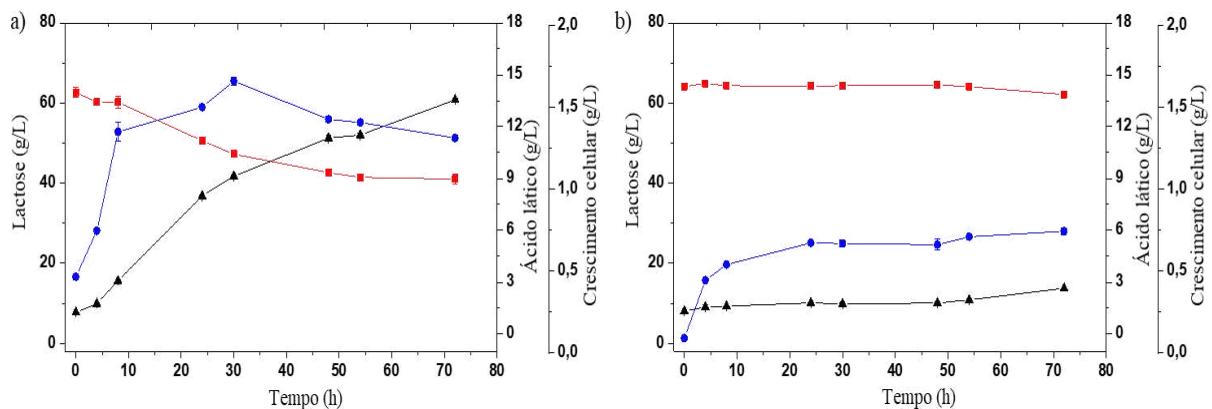
Neste estudo, foi avaliado a influência das temperaturas de 30 °C, 37 °C e 45 °C na produção do ácido lático por via biotecnológica, tendo em vista que a faixa de temperatura considerada ótima para o cultivo de BALs é de 20 °C a 45 °C (SOUZA et al., 2017). Os perfis de consumo de substrato, produção de ácido lático e crescimento celular estão apresentados na Figura 7a, Figura 8a, Figura 10 e Figura 11.

Figura 10 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) de *Lactobacillus plantarum*, LAB07 a 30 °C (a) e 45 °C (b), a 150 rpm usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Figura 11 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) de *Lactobacillus plantarum*, LAB14 a 30 °C (a) e 45 °C (b), 150 rpm usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

É notória a influência da temperatura nos rendimentos de produção do ácido lático. A produção biotecnológica conduzida em temperaturas mais brandas, 30 °C e 37 °C, obteve maiores concentrações de ácido lático e biomassa, quando comparada condução do bioprocesso a 45 °C. Isto pode ter ocorrido, pois a temperatura é um fator que pode interferir na síntese e na atividade enzimática (KIZZIE-HAYFORD et al., 2021), podendo influenciar negativamente nas enzimas que atuam nas vias metabólicas de conversão do substrato em ácido lático.

De acordo com os perfis adquiridos, as cepas LAB07 e LAB14 foram capazes de se reproduzir em todas as temperaturas testadas. Porém, quando o processo foi conduzido a 45 °C, houve o crescimento de biomassa, apesar de o consumo de lactose, que é a principal fonte de carbono presente no soro de leite, ter sido muito inferior comparado as outras temperaturas. Isto pode indicar que há a interferência de outra fonte de carbono presente no soro de leite que não foi detectada pelo método de caracterização utilizado. Deste modo, é necessário que haja uma caracterização mais aprofundada da composição do soro de leite desproteinado.

Na Figura 10a, podemos ver que, apesar da baixa temperatura, houve um decaimento na produção de biomassa da cepa LAB07. Isso pode indicar que, devido à maior produção de AL, houve uma excessiva acidificação do meio impedindo o crescimento desta cepa, pois apesar de ser considerado um microrganismo acidófilo, as BALs, de forma geral, são incapazes de se reproduzirem quando o pH é inferior a 4,5 (YANG et al., 2018), afetando, assim os rendimentos do produto de interesse. A Tabela 3 apresenta a influência da temperatura nos parâmetros de produção.

Tabela 3 – Influência da temperatura na produção do ácido lático por *L. plantarum* LAB07 e LAB14, a 150 rpm por 72 h, utilizando soro de leite desproteinado como meio de cultura e uma idade de cultura de 16 horas.

Cepas	LAB07			LAB14		
Parâmetros						
Temperatura (°C)	30	37	45	30	37	45
P _{máx} (g/L)	11,17 ± 0,64 ⁱⁱⁱⁱ	13,12 ± 0,16	1,91 ± 0,06	11,34 ± 0,13 ⁱⁱⁱ	10,37 ± 0,36	1,55 ± 0,10
Produtivida de P _{máx} (g/L.h)	0,17	0,17	0,10	0,23	0,13	0,05
X _{máx} (g/L)	0,89 ⁱ	1,11 ⁱⁱ	0,99 ^{ij}	1,66 ⁱⁱⁱ	1,90 ⁱⁱⁱ	0,74
Y _{P/S} (g/g)	0,22	0,59	0,57	0,57	0,41	0,22

(i): Produção máxima obtida em 8 h; (ii) Produção máxima obtida em 24 h; (iii) Produção máxima obtida em 30 h; (iiii) Produção máxima obtida em 48 h; (ij) Produção máxima obtida em 54 h.

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Um desempenho semelhante da cepa LAB07 e LAB14 é observado quando o bioprocesso é conduzido com temperaturas mais brandas (Tabela 3). Porém, ao conduzir a produção de ácido lático a 45 °C, ocorre uma redução de 85,45% na concentração final deste ácido ao comparar com a concentração máxima ($P_{máx}$) obtida a 37 °C e uma redução de 82,91% em relação ao processo conduzido a 30 °C, para a cepa LAB07.

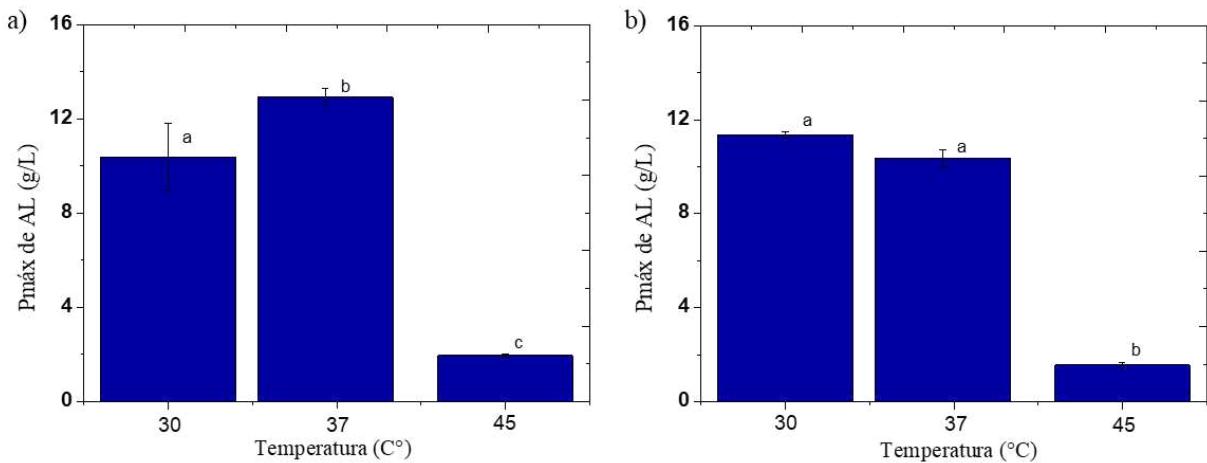
Enquanto isso, ao conduzir o bioprocesso utilizando a cepa LAB14 a 45 °C, houve uma redução de 86,33% e 85,05% na concentração máxima de AL ao comparar os resultados obtidos nas temperaturas de 37 °C e 30 °C, respectivamente. Deste modo, os valores de produtividade de ambas as cepas e o fator de conversão de substrato em produto para LAB14 foram negativamente impactados.

As cepas LAB 07 e LAB14 apresentaram um bom desempenho quanto a produção de AL ao comparar com outros estudos existentes na literatura, como Cizekiene et al. (2018), que utilizou hidrolisado enzimático de palha de trigo como meio de cultura e obteve 4,94 g/L de ácido lático pela espécie *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, sendo o processo conduzido a 42 °C e 2,85 g/L de ácido lático foi produzido por *L. sanfranciscenses* MRV29 com o processo conduzido a 25 °C, ambos processos com duração de 72 h.

Porém, apesar das concentrações de ácido lático obtidas por ambas as cepas avaliadas serem maiores comparadas com outros estudos, os valores de produtividade ainda são menores. Chen et al. (2020) avaliaram o uso de uma cultura mista de duas espécies, em específico *Bacillus coagulans* e *Lactobacillus rhamnosus* para produzir ácido lático a 50 e 42 °C por sacariação simultânea e co-fermentação e utilizando bagaço de mandioca como meio de cultura para a produção do ácido lático, obtendo, uma produtividade de 2,74 g/L.h, em 41 horas de fermentação. Quando utilizado somente a espécie *Bacillus coagulans* em bioprocesso a 50 °C, obteve-se uma produtividade de 1,29 g/L.h em 41 horas de processo biotecnológico.

Através da análise estatística, foi possível selecionar a temperatura que foi capaz de otimizar o processo de produção de ácido lático para cada cepa estudada de *Lactobacillus plantarum*, com os resultados apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Avaliação da produção de ácido lático sob influência da temperatura, para cepa LAB07 (a) e LAB14 (b), baseado no teste de Tukey, com 95% de nível de significância ($p < 0,05$), no qual letras iguais indicam que não houve diferença significativa.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

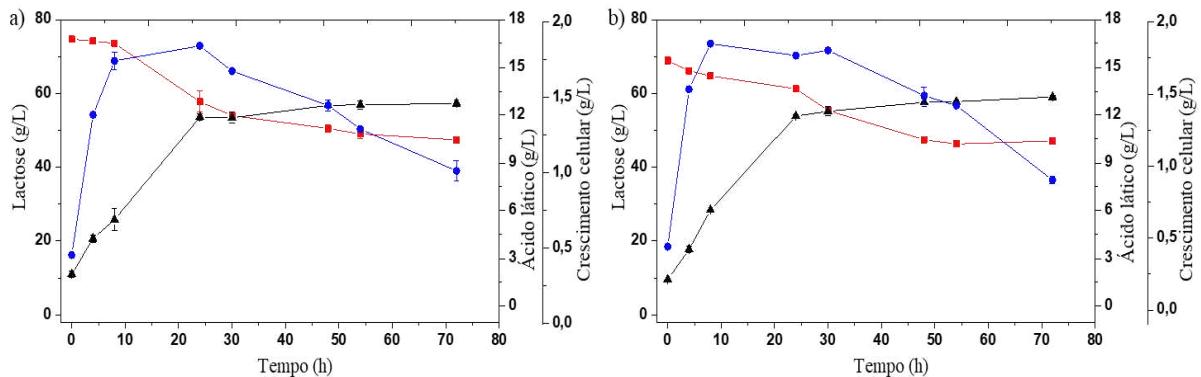
Deste modo, foi possível detectar que houve diferença significativa nos resultados obtidos a partir das diferentes temperaturas. A temperatura que apresentou melhores resultados para LAB07 foi 37 °C. Enquanto que para a cepa LAB14, foi selecionada a temperatura de 30 °C, objetivando um menor gasto enegético, tendo em vista que essa condição não apresentou diferença significativa comparada à temperatura de 37 °C. Por isso, levando em consideração o estudo realizado com a idade de cultura de inóculo e a temperatura, os processos fermentativos seguintes, no qual será estudado a influência da rotação na produção de ácido lático, foram conduzidos a 37 °C e utilizando um inóculo com idade de 16 horas, para a cepa LAB07, e 30 °C utilizando inóculo com mesma idade para a cepa LAB14.

4.4 Avaliação da influência da agitação na produção de ácido lático

Neste trabalho, o último estudo realizado foi sobre a influência da agitação no processo produtivo de ácido lático e de biomassa para *L. plantarum*, LAB07 e LAB14. A agitação é um importante parâmetro, pois impede a precipitação de células. Porém, quando utilizada maiores quantidades de rotações por minuto pode ocasionar em uma maior aeração do ambiente. Isto pode afetar negativamente a produção de AL, tendo em vista que os microrganismos utilizados são anaeróbios (XIMENES et al., 2019). Portanto, para avaliar este parâmetro, o bioprocesso foi conduzido sob três rotações diferentes, sendo elas 100 rpm, 150 rpm e 200 rpm, no qual foi possível obter os perfis de consumo de substrato, produção do ácido

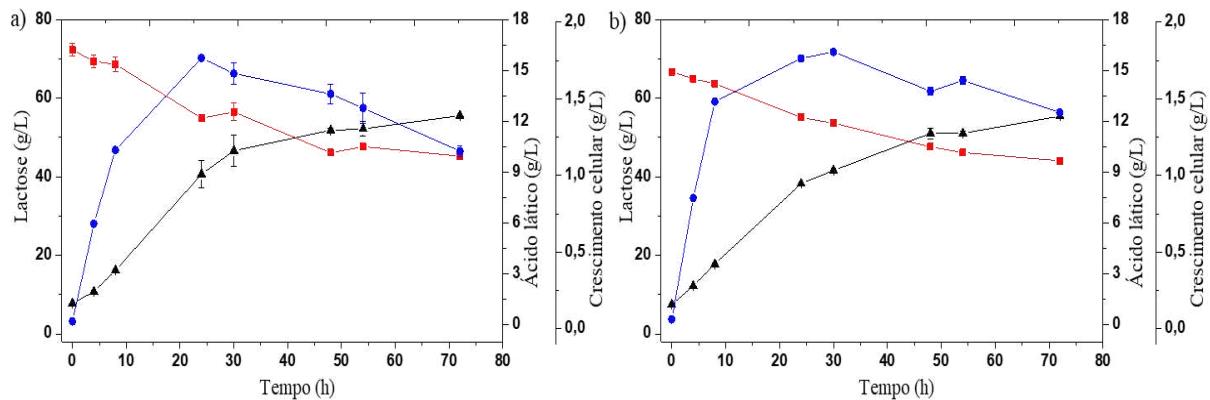
de interesse e crescimento celular, apresentados nas Figuras 13, Figura 7a, Figura 8a e Figura 14.

Figura 13 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) para *Lactobacillus plantarum*, LAB07 a 37 °C, 100 rpm (a) e 200 rpm (b), usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 14 – Perfil de consumo de lactose (■), produção de ácido lático (▲) e crescimento celular (●) para *Lactobacillus plantarum*, LAB14 a 30 °C, 100 rpm (a) e 200 rpm (b), usando soro de leite desproteinado como meio de cultura e inóculo cultivado por 16 horas.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

É possível observar através da Figura 13, Figura 7a, Figura 8a e Figura 14 que ambas as cepas apresentaram comportamento semelhante de produção de ácido lático e biomassa em todas as rotações avaliadas. Por isso, a análise dos rendimentos e produtividade de ácido lático serão importantes para promover uma melhor discussão, cujos resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4 – Influência da agitação na produção do ácido láctico por *L. plantarum*, LAB07 a 37 °C e LAB14 a 30 °C, por 72 h e utilizando soro de leite desproteinado como meio de cultura e uma idade de cultura de inóculo de 16 horas.

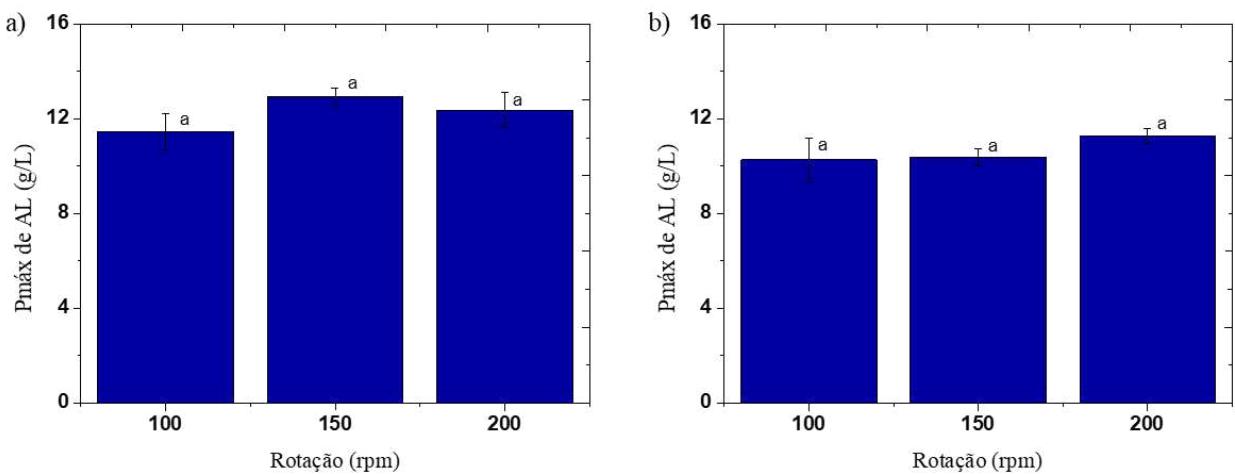
Cepas	LAB07			LAB14		
Parâmetros						
Temperatura (°C)	100	150	200	100	150	200
P _{máx} (g/L)	11,89 ± 0,19 ⁱⁱ	13,12 ± 0,16	11,94 ± 0,09 ⁱⁱ	10,27 ± 0,91 ⁱⁱⁱ	11,34 ± 0,13 ⁱⁱⁱ	11,28 ± 0,32 ⁱⁱⁱⁱ
Produtividade de P _{máx} (g/L.h)	0,41	0,17	0,42	0,30	0,23	0,21
X _{máx} (g/L)	1,74 ⁱ	1,11 ⁱⁱ	1,84 ⁱ	1,76 ⁱⁱ	0,99 ^{ij}	1,80 ⁱⁱⁱ
Y _{P/S} (g/g)	0,29	0,59	0,52	0,40	0,57	0,49

(i): Produção máxima obtida em 8 h; (ii) Produção máxima obtida em 24 h; (iii) Produção máxima obtida em 30 h; (iiii) Produção máxima obtida em 48 h; (ij) Produção máxima obtida em 54 h.

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Tendo em vista que os desempenhos adquiridos nesta avaliação foram aproximados, foi realizado a análise estatística, objetivando estabelecer as melhores condições de produção do ácido lático por *L. plantarum* LAB07 e LAB14. Os dados obtidos nesta análise podem ser visualizados na Figura 15.

Figura 15 – Avaliação da produção de ácido lático sob influência da agitação, para cepa LAB07 (a) e LAB14 (b), baseado no teste de Tukey, com 95% de nível de significância ($p < 0,05$), no qual letras iguais indicam que não houve diferença significativa.



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Como é possível visualizar na Figura 15, não houve diferença significativa entre as agitações avaliadas para ambas as cepas. Isso, pode ter ocorrido, pois foi utilizado uma faixa de rotação muito estreita, ou seja, os valores de agitação selecionados para o estudo desta influência foram muito próximos. Assim, se fossem selecionadas rotações com maiores faixas, possivelmente haveria influência deste parâmetro na produção do ácido lático.

Deste modo, foi estabelecido as melhores condições operacionais, objetivando uma produção eficiente de ácido lático, no qual, para a cepa LAB07 foi cultura de inóculo com 16 horas de idade, 37 °C e 100 rpm, e para LAB14 foi inóculo produzido em 16 horas, 30 °C e 100 rpm. Através dessas condições, foi possível obter uma concentração de 11,89 g/L e 10,27 g/L de ácido lático, pelas cepas LAB07 e LAB14, respectivamente.

Lench (2020) relatou produzir 18 g/L e 3,1 g/L de ácido lático, em 24 h e 52,2 h de processo, utilizando soro de leite desproteinado como meio de cultura e a espécie *L. rhamnosus*. Já Senedese et al. (2015), através da espécie *L. rhamnosus* ATCC 10863 produziram 16,5 g/L de AL a 43,4 °C e 200 rpm, utilizando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e

Ximenes et al. (2019) produziu 100 g/L de ácido lático em 48 horas de bioprocesso através da espécie *L. plantarum*, utilizando o resíduo da cabeça de camarão como meio de cultura.

Neste contexto, foi possível observar o potencial positivo que ambas as cepas da espécie *L. plantarum* possuem para a produção deste composto de grande importância industrial e alto valor agregado através de um resíduo industrial poluente, o soro de leite. No mais, essa espécie pode ser caracterizada como homofermentativa, pois produziu somente ácido lático em todos os bioprocessos realizados.

5 CONCLUSÃO

As duas cepas avaliadas neste estudo, *L. plantarum* LAB07 e *L. plantarum* LAB14, apresentam potencial para a produção do ácido lático em soro de leite desproteinado, quando cultivada em condições mais brandas de temperatura e utilizando uma idade de cultura de inóculo na fase exponencial de reprodução celular. Apesar da baixa produção de biomassa, indicando que provavelmente o soro de leite não apresenta a complexidade nutricional requerida pelas bactérias, este resíduo da indústria alimentícia é viável para a produção do ácido lático, pois foram obtidas concentrações iguais ou superiores a outros estudos reportados na literatura. O descarte indevido desse resíduo gerará um impacto ambiental e seu aproveitamento pode diminuir este impacto, tendo em vista sua aplicação como matéria-prima na produção de um bioproduto de grande relevância industrial, bem como, pode diminuir os custos envolvidos com a produção do ácido lático.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, M. A.; SONOMOTO, K. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 176–192, 2016.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 877–902, 2013.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 4, p. 286–301, 2011.
- ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 314–323, 2015.
- ALTAMIMI, M. J., WOLFF, K., MARTIN, G. P., ROYALL, P. G. An Investigation of the Anomeric Stability of Lactose Powder Stored Under High Stress Conditions. **Pharmaceutical Technology**, p. 3, 2017.
- ALVES DE OLIVEIRA, R. et al. Polymer grade L-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*. **Bioresource Technology Reports**, v. 6, n. October 2018, p. 26–31, 2019.
- ALVES, R. et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design — From economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 219–239, 2018.
- BERNARDO, M. P. et al. L-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 640–646, 2016.

BROCK, S.; KUENZ, A.; PRÜSSE, U. Impact of Hydrolysis Methods on the Utilization of Agricultural Residues as Nutrient Source for D-lactic Acid Production by Sporolactobacillus inulinus. **Fermentation**, v. 5, n. 1, p. 12, 23 jan. 2019.

BUSTOS, G. et al. Influence of the metabolism pathway on lactic acid production from hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates using Lactobacillus pentosus. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 793–798, 2005.

BUSTOS, G. et al. Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by Lactobacillus pentosus. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 15, p. 2105–2112, 2004.

CHENG, Y. et al. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: A review. **Frontiers of Chemistry in China**, v. 4, n. 3, p. 259–264, 2009.

CIZEIKIENE, D.; JUODEIKIENE, G.; DAMASIUS, J. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Use of wheat straw biomass in production of L-lactic acid applying biocatalysis and combined lactic acid bacteria strains belonging to the genus Lactobacillus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, n. June, p. 185–191, 2018.

CHO, H. U. et al. Influence of temperature on volatile fatty acid production and microbial community structure during anaerobic fermentation of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 475–480, 2015.

DE ALBUQUERQUE, T. L. et al. Immobilization of β -galactosidase in glutaraldehyde-chitosan and its application to the synthesis of lactulose using cheese whey as feedstock. **Process Biochemistry**, v. 73, n. August, p. 65–73, 2018.

DE FREITAS, M. DE F. M. et al. Simultaneous hydrolysis of cheese whey and lactulose production catalyzed by β -galactosidase from Kluyveromyces lactis NRRL Y1564. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 4, p. 711–722, 2020.

DE LA TORRE, I. et al. On the use of resting L. delbrueckii spp. delbrueckii cells for D-lactic acid production from orange peel wastes hydrolysates. **Biochemical Engineering Journal**, p. 162–169, 15 maio 2019.

DERELI, R. K. et al. Treatment of cheese whey by a cross-flow anaerobic membrane bioreactor: Biological and filtration performance. **Environmental Research**, v. 168, n. September 2018, p. 109–117, 2019.

DIVAKARA SHETTY, S.; SHETTY, N. Investigation of mechanical properties and applications of polylactic acids - A review. **Materials Research Express**, v. 6, n. 11, 2019. E\$, I. et al. Recent advancements in lactic acid production - a review. **Food Research International**, v. 107, n. January, p. 763–770, 2018.

DURHAM, R. J. **Dairy-Derived Ingredients:** Modern approaches to lactose production, 1. ed. Woodhead Publishing, 2009.

FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, D. et al. Biovalorization of saccharides derived from industrial wastes such as whey: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 147–174, 2017.

GARMASHEVA, I. NEW APPROACH FOR FAST SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA FOR VEGETABLE FERMENTATION. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 8, n. 4, p. 1066, 15 fev. 2019.

GHAFFAR, T. et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 222–229, 2014.

GVR – GRAND VIEW RESEARCH. Tamanho do Mercado de ácido lático, relatório de análise de participação e tendência por matéria-prima (milho, cana-de-açúcar), por aplicação (industrial, alimentos e bebidas, ácido polilático), por região e segmento. Previsões para 2019–2025. 2019. Disponível em:

<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market>. Acesso em: 25 mar. 2021.

HOFVENDAHL, K. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources 1. v. 26, p. 87–107, 2000.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Trimestral do Leite. 2020. Disponível em:
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html>. Acesso em: 20 mar. 2021.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Industrial Anual – Produto. 2019. Disponível em:
<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/industria/9044-pesquisa-industrial-anual-produto.html>. Acesso em: 20 mar. 2021.

ISKANDAR, C. F. et al. Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, n. February, p. 121–132, 2019.

IZAGUIRRE, J. K. et al. Protein hydrolysate from organic fraction of municipal solid waste compost as nitrogen source to produce lactic acid by *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 and *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826. **Process Biochemistry**, v. 88, n. July 2019, p. 15–21, 2020.

JAMBUNATHAN, P.; ZHANG, K. Engineered biosynthesis of biodegradable polymers. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 8, p. 1037–1058, 2016.

JIANG, S.; XU, P.; TAO, F. L-Lactic acid production by *Bacillus coagulans* through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic corncob residue. **Bioresource Technology Reports**, v. 6, n. February, p. 131–137, 2019.

JUODEIKIENE, G. et al. Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starchy biomass vs chemical synthesis. **Catalysis Today**, v. 239, p. 11–16, 2015.

KIZZIE-HAYFORD, N. et al. Storage temperature of tiger nuts (*Cyperus esculentus L*) affects enzyme activity , proximate composition and properties of lactic acid fermented tiger nut milk derived thereof. **LWT**, v. 137, n. October 2020, p. 110417, 2021.

KIM, J. WON et al. Lactic Acid Production from a Whole Slurry of Acid-Pretreated Spent Coffee Grounds by Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 1, p. 206–216, 2019.

KLOTZ, S. et al. Biotechnological production of enantiomerically pure d-lactic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9423–9437, 2016.

KONG, X. et al. Efficient L-lactic acid production from corncob residue using metabolically engineered thermo-tolerant yeast. **Bioresource Technology**, v. 273, n. November 2018, p. 220–230, 2019.

KOSSEVA, M. R. **Chapter 3 - Processing of Food Wastes**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2009. 57-136. 58p.

KUMAR, V. et al. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. **Bioresource Technology**, v. 323, n. October 2020, p. 124566, 2021.

LECH, M. Optimisation of protein-free waste whey supplementation used for the industrial microbiological production of lactic acid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 157, n. February, p. 107531, 2020.

LIMA, A. F.; CAVALCANTE, K. F.; FREITAS, M. F. M; RODRIGUES, T. H. S; ROCHA, M. V. P.; GONÇALVES, L. R. B. Comparative biochemical characterization of soluble and chitosan immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* NRRL Y1564. **Process Biochemistry** (1991), v. 48, p. 443- 452, 2013.

MACWAN, S. R. et al. Whey and its Utilization. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 8, p. 134–155, 2016.

MARQUES, S. et al. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 3, p. 210–216, 2008.

MENEZES, A. G. T. et al. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, n. March, p. 187–197, 2018.

MOONGA, H. B. et al. Influence of fermentation temperature on microbial community composition and physicochemical properties of mabisi, a traditionally fermented milk. **Lwt**, v. 136, n. P2, p. 110350, 2021.

NEVES, A. R. et al. Overview on sugar metabolism and its control in *Lactococcus lactis* - The input from in vivo NMR. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 3 SPEC. ISS., p. 531–554, 2005.

NICOLÁS, P.; FERREIRA, M. L.; LASSALLE, V. A review of magnetic separation of whey proteins and potential application to whey proteins recovery, isolation and utilization. **Journal of Food Engineering**, v. 246, n. October 2018, p. 7–15, 2019.

OTHMAN, M. et al. Extractive fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–7, 2017.

SCAFFARO, R.; MAIO, A.; NOSTRO, A. Poly(lactic acid)/carvacrol-based materials: preparation, physicochemical properties, and antimicrobial activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1823–1835, 2020.

SHARMA, N. et al. Phytase producing lactic acid bacteria: Cell factories for enhancing micronutrient bioavailability of phytate rich foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 96, n. November 2019, p. 1–12, 2020.

SHARMA, A. et al. Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. **Lwt**, v. 139, n. November 2020, p. 110744, 2021.

SHI, Z. et al. Efficient production of l-lactic acid from hydrolysate of Jerusalem artichoke with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 5, p. 263–268, 2012.

SHIPRAH, V. H.; SAHU, S.; THAKUR, A. R.; CHAUDHURI, S. R. Screening of bacteria for lactic acid production from whey water. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 9, p. 118-123, 2013.

SILVA, R. DE O. P.; BUENO, C. R. F.; SÁ, P. B. Z. R. Aspectos relativos à produção de soro de leite no brasil, 2007-2016. **Informações Econômicas, SP**, v. 47, p. 2007–2016, 2017.

SINGHVI, M.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 5911–5924, 2018.

SOUZA, E. C. et al. 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.

TRAKARNPAIBOON, S. et al. L-Lactic acid production from liquefied cassava starch by thermotolerant *Rhizopus microsporus*: Characterization and optimization. **Process Biochemistry**, v. 63, n. August, p. 26–34, 2017.

VAMVAKAKI, A. N.; KANDARAKIS, I.; KAMINARIDES, S.; KOMAITIS, M.; PAPANIKOLAOU, S. Cheese whey as a renewable substrate for microbial lipid and biomass production by Zygomycetes. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, p. 348- 360, 2010

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 1, p. 10–18, 2015.

WANG, G. et al. Specific bile salt hydrolase genes in *Lactobacillus plantarum* AR113 and relationship with bile salt resistance. **Lwt**, v. 145, n. March, p. 111208, 2021.

WANG, H. et al. Application of ultrasonication at different microbial growth stages during apple juice fermentation by *Lactobacillus plantarum*: Investigation on the metabolic response. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 73, p. 105486, 2021.

WU, Q.; CHEUNG, C. K. W.; SHAH, N. P. Towards galactose accumulation in dairy foods fermented by conventional starter cultures: Challenges and strategies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 24–36, 2015.

XIMENES, J. C. M. et al. Sustainable recovery of protein-rich liquor from shrimp farming waste by lactic acid fermentation for application in tilapia feed. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 195–203, 23 jan. 2019.

YÁÑEZ, R.; ALONSO, J. L.; PARAJÓ, J. C. D-Lactic acid production from waste cardboard. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 76–84, 2005.

YÁÑEZ, R. et al. Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 14, p. 1161–1164, 2003.

YANG, E. et al. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. **AMB Express**, v. 8, n. 1, 2018.