

AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO, FERMENTAÇÃO E COMPONENTES DO MEIO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO D(-) LÁCTICO MEDIANTE FERMENTAÇÃO POR *Lactobacillus coryniformis* sp. *torquens*

L.Y ACEVEDO JARAMILLO¹, D. SILVEIRA SANTOS¹, L. MELO SANTA ANNA²,
E. R. BORGES¹ e N. PEREIRA Jr¹.

¹ Universidade Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), Escola de Química, Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos LADEBIO

² Centro de Pesquisa (CENPES), Petrobras

E-mail para contato: lizeth_jaramillo@hotmail.com

RESUMO. O ácido láctico é considerado uma "commodity" de ampla aplicação industrial, com 90% da produção mundial resultado de processo fermentativo. A forma isomérica D(-) láctico e suas aplicações têm sido pouco exploradas, embora apresente um grande potencial na produção de biopolímeros. Inicialmente, foram alcançados 5,11 g/L de biomassa celular e 17 g/L de ácido láctico a partir da fermentação do meio comercial MRS pela linhagem *Lactobacillus coryniformis torquens*. No seguinte, buscando a redução da quantidade de componentes do meio sintético, foi desenvolvido um planejamento de *Plackett Burman*, o qual promoveu a produção de biomassa entre os valores de 0,83 g/L e 3,56 g/L. Os componentes que apresentaram maior influência nos ensaios, sendo selecionados para posteriores otimizações, foram os seguintes: extrato de carne, glicose, acetato de sódio, sulfato de magnésio e extrato de levedura. Adicionalmente, foi desenvolvido um planejamento fatorial completo, avaliando a agitação (rpm), o percentual de inóculo (v/v) e a concentração inicial de glicose (g/L). Além da avaliação das condições do processo, os ensaios também indicaram alguns inibidores, tais como, a acidificação do pH, bem como elevados níveis de substrato. Cabe ressaltar que, no segundo planejamento as células foram inoculadas no meio reduzido sem qualquer etapa de aclimação, alcançando 9,45 g/L de ácido D(-) láctico através de processo descontínuo, durante 24 horas à temperatura de 37°C.

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico (ácido 2-hidroxipropiônico) é um ácido orgânico carboxílico de grande importância com aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, têxtil e química, descoberto em 1780 pelo químico Carl Wilhelm Scheele (Abdel *et al.*, 2011). Atualmente, devido às suas características de biodegradação, a sua utilização como intermediário na produção de plásticos biodegradáveis *poly lactic acid* PLA é uma das aplicações que apresentam maior interesse industrial (Nampoothiri *et al.*, 2010), com a demanda estimada entre 130000-150000 toneladas por ano (Li *et al.*, 2010; Sauer *et al.*, 2007).

O ácido láctico ocorre em duas formas isoméricas, ácido L (+) láctico e ácido D (-) láctico e pode ser obtido por síntese química, tendo como produto uma mistura racêmica; como também pode ser obtido pela ação fermentativa de bactérias, fungos e leveduras, onde, dependendo do microrganismo e das condições de operação será gerado um produto opticamente puro L(+) ou D(-) ácido láctico (Narayan *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2010). Os processos fermentativos representam 90% da produção mundial, sendo mais vantajosos, em sua maioria, através da fermentação descontínua (Hofvendahl & Hahn, 2000), devido à possibilidade de utilizar substratos de baixo custo, além da redução da temperatura do processo (Gao *et al.*, 2011). Ressalta-se, porém, que a síntese microbiana de ácido L (+) láctico tem sido extensivamente pesquisada e reportada, inclusive a partir de substratos alternativos, enquanto a produção do ácido D (-) láctico e suas aplicações tem sido pouco explorada (Nakano *et al.*, 2012).

As bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* são muito exigentes quanto às condições de crescimento, tendo necessidade de fontes de nitrogênio, vitaminas e sais minerais, devido à sua habilidade biossintética limitada (Wee *et al.*, 2006). O metabolismo das bactérias lácticas pode apresentar duas rotas principais, a homofermentativa, onde o consumo das hexoses ocorre através da via Embden-Meyerhof, a qual converte 1 mol de hexoses em 2 moles de ácido láctico e 2 moles de ATP; e a heterofermentativa, onde o consumo das hexoses e pentoses ocorre pelas vias fosfogluconato/ fosfocetolase com a formação de quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP (Li *et al.*, 2010; Hofvendahl e Hahn, 2000).

Neste contexto, no que tange à redução de custos para o processo de produção de ácido D(-) láctico, torna-se evidente a importância de se estabelecer um meio de cultivo reduzido, o qual, junto com a determinação das melhores condições operacionais, permita ter um processo mais eficiente, visando à possibilidade do uso de os materiais lignocelulósicos como matéria prima.

2. MATERIAIS E METODOS

Microrganismo: a linhagem *Lactobacillus coryniformis* sp. *torquens* utilizada neste trabalho foi obtida do banco de amostras ATCC 25600. O inóculo foi ativado em meio MRS comercial (manga-Rogosa-Sharpe) na concentração inicial de 10% (v/v), a 37°C sob agitação de 120 rpm, em condições anaeróbias - mediante injeção de CO₂ e N₂- por 12 horas. Para a conservação, as células foram mantidas em placas de petri (adicionadas de meio líquido MRS-Agar), em ultra-freezer a -80°C (adicionadas de meio líquido MRS/ glicerol 50%) e através de repiques periódicos em meio líquido.

Meios de cultivo e fermentação: O meio MRS empregado para o crescimento constitui-se dos seguintes componentes (g/L): peptona, 10; extrato de carne, 10; extrato de levedura, 5; glicose 20; tween-80, 1; citrato de amônia, 2; acetato de sódio, 5; sulfato de magnésio, 0,1; sulfato de manganês, 0.05 e fostato dipotásico, 2. Posteriormente, foram realizadas modificações na composição do meio para as avaliações experimentais.

Planejamentos experimentais: a ferramenta *Desing- Expert* 9.0.2 foi empregada para estabelecer os planejamentos e desenvolver a análise estatística. A metodologia **Plackett-**

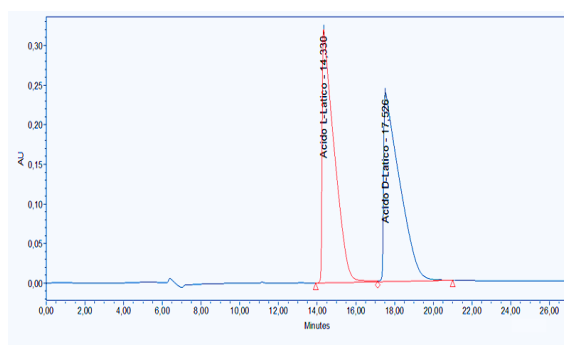
Burman foi utilizada para o *screening* e seleção dos principais componentes do meio MRS, através de variações de tais concentrações. No seguinte, buscando a avaliação das condições de crescimento, fermentação e possíveis inibições do processo, foi desenvolvido um **planejamento fatorial completo 2^3** , onde os parâmetros analisados foram a agitação (rpm), o inoculo % (v/v) e o conteúdo inicial de glicose (g/L). Esse planejamento foi desenvolvido a partir dos componentes resultantes do *Plackett-Burman*, sendo modificado o conteúdo de glicose inicial em três diferentes concentrações, conforme será mostrado na seção de **Resultados & Discussão**. Os ensaios foram conduzidos por processo descontínuo, em frascos agitados com volume de trabalho de 50 mL, sem controle de pH, durante 24 horas à temperatura de 37°C em condições anaeróbias.

Determinações analíticas: as concentrações de substrato e produtos foram quantificadas pelo método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando o sistema cromatográfico (WATERS). A identificação do isômero optico D(-) lático foi feita por cromatografia quiral, através do detector ultra-violeta (UV/VIS) - 254nm e fase móvel CuSO_4 0,001mol/L. A produção de biomassa foi determinada pela técnica do peso seco correlacionada com a medida da absorbância (densidade óptica) em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu a 600 nm.

3. RESULTADOS

As etapas de crescimento e propagação foram desenvolvidas em meio de crescimento comercial MRS (concentração inicial de glicose 20 g/L), o qual é rico em componentes nutricionais. Contudo, uma vez que esse caldo apresenta um elevado valor comercial, tornando o seu uso em escala industrial inviável, o presente estudo buscou pela redução de tais componentes, bem como pela otimização do meio de cultivo e fermentação. Inicialmente, o microrganismo apresentou uma fase de adaptação de três horas, seguida da propagação, alcançando a densidade celular de 4,42 g/L e 5,11 g/L, assim como 17,29 g/L e 16,35 g/L de ácido lático, respectivamente. O perfil de produção do microrganismo *L. coryniformis torquens* corresponde com o associado ao crescimento celular, sendo o ácido D(-) lático o principal produto, identificado mediante cromatografia quiral como se apresenta na figura 1.

a. Cromatograma padrão dos isômeros do ácido lático (coluna quiral)



b. Ácido D(-) lático produzido por *Lactobacillus coryniformis* sp. *torquens* (identificação pela cromatografia quiral)

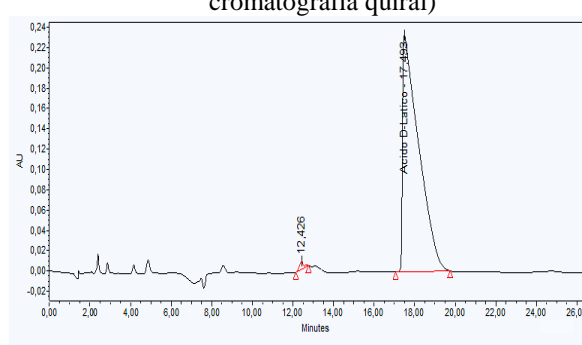


Figura 1 – Identificação do isômero D(-) lático por cromatografia quiral

3.1. Efeitos dos componentes do meio na produção do ácido láctico

A tabela 1 apresenta os resultados de crescimento celular de acordo com o planejamento desenvolvido para avaliação do efeito dos 10 componentes do meio sintético, através de um nível de confiança de 95 %. O extrato de carne, a glicose, o acetato de sódio e o sulfato de magnésio foram considerados os mais significativos de acordo com os resultados estatísticos apresentados na tabela 2, que mostra o efeito e a porcentagem de contribuição de cada componente.

Tabela 1- Planejamento Plackett-Burman para avaliação dos componentes do meio

Experimento	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	D1	Densidade celular (g/L)
1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1,75
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	2,30
3	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	2,34
4	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	2,43
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0,83
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,61
7	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2,33
8	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	3,56
9	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1,95
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,32
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1,21
12	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	2,73
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,01
14	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1,23
15	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	0,92

Nota: os valores apresentados correspondem ao tempo 24 hr para todos os experimentos

Tabela 2- Resultados estatísticos para metodologia Plackett Burman

Fatores avaliados (g/L)	Níveis reais			Resultados Estatísticos		
	-1	0	1	Efeito Stdized	Suma de quadrados	% de contribuição
F1 Peptona	1,000	5,500	10,000	-0,30	0,26	3,41
F2 Extrato de carne	1,000	5,500	10,000	0,80	1,90	24,60
F3 Extrato de levedura	0,500	2,750	5,000	0,050	7,500E-0003	0,097
F4 Glicose	10,000	25,000	40,000	0,78	1,84	23,78
F5 Polisorbato	0,100	0,550	1,000	-0,027	2,133E-003	0,028
F6 Citrato de amônia	0,200	1,100	2,000	-0,25	0,18	2,36
F7 Acetato de sódio	0,500	2,750	5,000	0,97	2,84	36,72
F8 Sulfato de magnésio	0,010	0,055	0,010	0,24	0,17	2,17
F9 Sulfato de manganês	0,025	0,038	0,050	-0,033	3,333E-003	0,043
F10 Fosfato dipotássico	0,200	1,100	2,000	0,11	0,036	0,47

O extrato de carne, um dos fatores que apresentou significância estatística, é uma fonte de nitrogênio complexa com custo econômico considerável, mas contribui na redução do tempo de produção (Chauhan *et al.*, 2007), favorecendo a produtividade do processo, além de conter vitaminas B que suprem os requerimentos nutricionais. Uma vez que as baterias do

gênero *Lactobacillus* têm necessidades nutricionais complexas por sua habilidade biossintética limitada (Wee *et al.*, 2006). Uma vez que as bactérias do gênero *Lactobacillus* têm necessidades nutricionais complexas por sua habilidade biossintética limitada (Wee *et al.*, 2006). O extrato de levedura foi incluso na seleção de componentes por ser fonte de vitaminas, aminoácidos e fonte de nitrogênio adicional ao extrato de carne, mesmo não tendo sido indicado pelo planejamento. Neste trabalho, a peptona não se mostrou significativa para a produção de ácido láctico utilizando o microrganismo em estudo, diferente do que foi reportado por Chauhan *et al.* (2007) para as linhagens *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 e *Lactobacillus sp.* KCP01, o que poderia favorecer economicamente o processo de produção de ácido láctico.

A falta de controle do pH reduz a produção do ácido láctico por *Lactobacillus coryniformis torquens*, portanto, é necessária a manutenção do mesmo em torno de 5,0-7,0 (Hofvendahl e Hahn, 2000). Desta forma, como os ensaios foram desenvolvidos sem o controle deste fator, o processo foi iniciado com o pH neutro e finalizado em torno de 3, valor fortemente ácido e inibindo o metabolismo celular (Hofvendahl e Hahn, 2000 e Abdel *et al.*, 2011). Ademais, os valores de crescimento celular foram reduzidos em comparação ao meio comercial, o que aponta para sensibilidade do microrganismo à variação das concentrações dos nutrientes; sendo necessárias posteriores etapas de adaptação ao meio reduzido com o fim de aumentar o crescimento celular e, conseqüentemente, a produção do ácido D(-) láctico.

3.2. Condições de crescimento e fermentação

Os resultados do planejamento fatorial para avaliação das condições de crescimento, fermentação e possível inibição pelo substrato se apresentam na tabela 3. O melhor resultado corresponde ao experimento 5 (glicose inicial de 20 g/L, sem agitação e inóculo de 10% v/v), alcançando a densidade celular de 2,13 (g/L) e produção de ácido D(-) láctico de 9,45 (g/L). A menor produção ocorreu no experimento 4 (glicose inicial de 70 g/L, agitação de 200 rpm e inóculo de 5% v/v).

Tabela 3- Crescimento celular e produção de ácido D(-) em processo descontínuo

Experimento	Glicose inicial (g/L)	Agitação rpm	Inóculo % (v/v)	Densidade celular (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido láctico predito (g/L)
1	20	0	5	1,97	9,10	8,96
2	70	0	5	1,84	7,38	7,42
3	20	200	5	2,12	6,98	7,20
4	70	200	5	1,94	6,76	6,64
5	20	0	10	2,13	9,45	9,59
6	70	0	10	1,87	8,08	8,04
7	20	200	10	1,93	8,04	7,82
8	70	200	10	1,93	7,15	7,27
9	45	100	7,5	2,03	7,88	7,71
10	45	100	7,5	1,96	7,47	7,71
11	45	100	7,5	1,91	7,77	7,71

Nota: os valores apresentados correspondem ao tempo 24 hr para todos os experimentos

Tendo como resposta a produção do ácido D(-) láctico, a análise estatística mediante a ferramenta *Desing- Expert 9.0.2*, mostra que os três fatores avaliados -glicose inicial do processo, agitação e percentual de inoculo- têm influência significativa, assim como a interação glicose-inoculo, mostrando que os fatores não trabalham de forma totalmente independente (tabela 4).

Tabela 4- Resultados estatísticos para planejamento fatorial

Fonte	Efeito Stdized	Suma de quadrados	% de contribuição
A- Glicose	-1.05	2.21	31.45
B- Agitação	-1.27	3.23	46.01
C-Inoculo	0.63	0.78	11.14
A-B	0.50	0.49	6.99
A-C	-0.080	0.013	0.18
B-C	0.10	0.020	0.29
A-B-C	-0.26	0.13	1.85
Curvatura	-0.17	0.056	0.80
Lack of Fit	-1.05	0.000	0.000
Erro puro	-1.27	0.090	1.28

A análise de variância (ANOVA) tendo em conta os fatores A, B, C e a interação A-B (glicose, agitação, inoculo e glicose-agitação, respectivamente) foi desenvolvido para descrever a relação entre as variáveis e suas respostas na produção de ácido láctico, nas faixas avaliadas. Os resultados na tabela 5 mostram que o modelo, assim como os fatores, são significativos, pois apresentaram “Prob > F” menor de 0,005; os pontos centrais estão inclusos no modelo, tendo o valor de *Fisher* para *Lack of Fit* de 1,22, sem significância em relação ao erro puro; a curvatura não apresentou significância, não sendo incluída no modelo.

Tabela 5. Resultados do ANOVA para produção de ácido D(-) láctico

Fonte	Suma de quadrados	df	Quadrado médio	Valor F	Valor P Prob > F
Model	6.70	4	1.68	32.50	0.0003
A-Glicose	2.21	1	2.21	42.77	0.0006
B-Agitação	3.23	1	3.23	62.57	0.0002
C-Inoculo	0.78	1	0.78	15.15	0.0081
AB	0.49	1	0.49	9.50	0.0216
Residual	0.31	6	0.052	-	-
Lack of Fit	0.22	4	0.055	1.22	0.4975
Erro puro	0.090	2	0.045	-	-
Cor Total	7.01	10	-	-	-

O modelo de regressão gerado para produção de ácido láctico (**equação 1**) apresentou 0,9559 de R^2 ; 0,9265 de R^2 ajustado; assim como R^2 Predito de 0,8255, indicando bom comportamento para predição nas faixas avaliadas como se indica nos valores preditos apresentados na tabela 3.

$$\text{Acido Lático} = 8.91 - 0,03 A - 0,01 B + 0,13 C + 9,90E-005 AB \quad (1)$$

Os resultados da tabela 3 mostram que, para a faixa avaliada de glicose inicial, o microrganismo *Lactobacillus coryniformis sp. torquens* apresentou uma queda na produção do ácido D(-) lático, bem como da densidade celular para as concentrações mais elevadas de glicose, em 70 g/L. Quando comparadas à performance do microrganismo em menores valores desse açúcar, em 20 g/L, sob as mesmas condições de agitação e adição de inóculo, houve uma redução de 9.45g/L para 8.08g/L na produção do ácido lático, simultaneamente ao aumento da concentração de glicose do menor nível para o maior nível do planejamento. Este comportamento pode ser atribuído a uma possível inibição pelo substrato, conforme já foi relatado na literatura por Abdel *et al.*, 2011.

Os motivos pelos quais houve uma redução na produção de ácido D(-) lático podem estar relacionados à falta de controle de pH, assim como à elevada necessidade nutricional requerida pelo microrganismo em questão, conforme descrito nos resultados do planejamento *Plackett-Burman*. Neste contexto, a acidificação do meio prejudicou a produção de biomassa devido à inibição pelos produtos formados, os quais afetam severamente o metabolismo celular. Adicionalmente, os ensaios foram realizados a partir de um meio de fermentação reduzido, cuja composição e concentração (g/L) dos nutrientes apresentam-se a seguir: extrato de carne, 10; extrato de levedura, 5; acetato de sódio, 5; sulfato de magnésio, 0,1; com concentração inicial de glicose na faixa avaliada entre 20 e 70, sem qualquer adaptação às novas concentrações nutricionais sendo afeita a capacidade de crescimento e produção do microrganismo.

Futuramente, os componentes selecionados serão otimizados mediante planejamentos fatoriais fracionados ou rotacionais com pontos centrais, tendo assim um meio que atenda às necessidades nutricionais do microrganismo e permita a redução de custos na produção industrial. Junto com a redução e otimização dos componentes do meio, é necessária a utilização de substratos alternativos como fontes de carbono onde a produção de ácido lático vai depender do tipo de açúcar, microrganismo e tipo de processo (Hofvendahl e Hahn, 2000), para o caso do *Lactobacillus coryniformis sp. torquens*, a produção do ácido D(-) lático segue a rota homofermentativa sendo o açúcar fermentável, a glicose. Tendo esta referência, os materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana, cuja fração de celulose ocorre torno de 36%, se apresentam como alternativa para produção de ácido lático de segunda geração.

4. CONCLUSÕES

O controle do pH mostrou-se essencial para aumentar a produção do ácido lático, pois a produção associada ao crescimento é fortemente inibida pela redução do mesmo, consequência da formação do produto, sendo necessária a adição de uma solução com o pH básico, no intuito de manter a viabilidade celular, elevando assim, a produtividade volumétrica do processo.

A exigente necessidade nutricional do microrganismo em estudo se reflexa em baixas produções de ácido lático em meios reduzidos, sendo necessários novos planejamentos para aperfeiçoar as concentrações dos componentes do meio - extrato de carne, glicose, acetato de sódio, sulfato de magnésio e extrato de levedura- resultantes da metodologia *Plackett-Burman*. Simultaneamente, são necessárias etapas de aclimação no intuito de promover melhor adaptação da linhagem ao novo meio, promovendo maiores concentrações de biomassa e de produto.

O fato da bactéria *Lactobacillus coryniformis* sp. *torquens* ter apresentado crescimento significativo com a ausência de agitação orbital é uma vantagem para o processo de produção industrial, sendo possível a redução de custos na etapa de ativação e propagação; no entanto, a agitação moderada durante o processo fermentação é necessária para reduzir a formação de gradientes de concentração.

5. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M; TASHIRO, Y; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology* 156 (2011) 286-301. 2011

CHAUHAN, K; TRIVEDI, U; PATEL, K. Statistical screening of médium componentes by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp, KCP01 using date juice. *Bioresource Technology* 98 (2007) 98-103. 2007.

GAO, C.; MA, C.; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances* v. 29, p. 930-939, 2011.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, p. 87-107, 2000.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. *Sustainable Biotechnology*. doi: 10.1007/978-90-481-3295-9_11, 2010.

NAMPOOTHIRI, K; NAIR, N; PAPPY R. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology* 101 (2010) 8493-8501, 2010

SAUER, M; PORRO, D; MATTANOVICH, D; BRANDUARDI, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Cell Press, Trends in Biotechnology* Vol 26- No 2, p. 100-108, 2007