



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ESCOLA DE ENGENHARIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA



Jonas Machado

**Otimização da produção de ácido lático em biorreatores por
Lactobacillus plantarum BL011 em hidrolisados de casca de soja**

Dissertação de mestrado

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SULx
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Jonas Machado

**Otimização da produção de ácido láctico em biorreatores por
Lactobacillus plantarum BL011 em hidrolisados de casca de soja**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

Coorientadora: Profa. Dra. Daniele Misturini Rossi

Porto Alegre

2020

Jonas Machado

**Otimização da produção de ácido lático em biorreatores por
Lactobacillus plantarum BL011 em hidrolisados de casca de soja**

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação “Otimização da produção de ácido lático em biorreatores por *Lactobacillus plantarum* BL011 em hidrolisados de casca de soja”, elaborada por Jonas Machado, como requisito parcial para o título de Mestre em Engenharia Química

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Débora Jung Luvizetto Faccin – UFRGS

Profa. Dra. Luciane Ferreira Trierweiler – UFRGS

Profa. Dra. Suse Botelho da Silva – UNISINOS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha família, em especial aos meus pais Carson e Gisele pela educação, amor, apoio, incentivo em todos os momentos da minha vida e por não medirem esforços para me ajudar. Ao meu irmão Lucas, que sempre me apoiou, incentivou e aconselhou. Vocês foram essenciais para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha namorada, Carol, por todo o amor, companheirismo, estímulo e compreensão em toda a nossa trajetória, compartilhando ótimos momentos e sempre me ajudando a superar qualquer desafio

À minha coorientadora, professora Daniele Misturini Rossi, pelos ensinamentos, pelo apoio e por toda ajuda na construção desse trabalho.

Ao meu orientador, professor Marco Antônio Záchia Ayub, pela confiança, apoio, ensinamentos, dedicação e interesse dado ao meu trabalho, além da grande oportunidade dada a mim de trabalhar em um laboratório de excelência e com todos os recursos necessários.

A todos os meus colegas do laboratório BiotecLab no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA), pela parceria, paciência e auxílio. Aos alunos de Iniciação Científica, sempre dispostos a ajudar, em especial ao Lucas e à Estela.

Aos meus amigos, que estão comigo em todos os momentos e que tornaram esses dois anos um período muito mais leve, com sua companhia sempre valorosa e prazerosa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de excelência, em especial ao Departamento de Engenharia Química, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e aos professores que contribuíram para a minha formação.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro e fomento à pesquisa.

A todos os demais que, de alguma maneira, contribuíram para que isso tudo pudesse se concretizar. Só tenho a agradecer.

RESUMO

O desenvolvimento de bioprocessos que utilizam matérias-primas de baixo custo como alternativa à processos já estabelecidos, sejam eles de origem fóssil ou não, são cada vez mais relevantes, dado o seu impacto econômico, social e ambiental. Tendo em vista esses fatores e a busca por processos mais sustentáveis, o objetivo principal deste estudo foi a otimização da produção de ácido láctico por bactérias ácido-láticas utilizando como matéria-prima uma mistura dos hidrolisados provenientes dos tratamentos ácido e enzimático da casca de soja. Os cultivos iniciais foram realizados em Erlenmeyers, incubados em agitador orbital na temperatura de 37 °C e agitação de 120 rpm, utilizando um pH inicial 6,0. Uma série de experimentos foi realizada para avaliar algumas variáveis do processo e selecionar uma linhagem com desempenho satisfatório, que foi a linhagem *Lactobacillus plantarum* BL011. Foi realizado um planejamento de experimentos Plackett-Burman para determinar a influência da temperatura e da suplementação do hidrolisado com extrato bruto de levedura, sulfato de magnésio e sulfato de manganês na produtividade do processo. O melhor resultado obtido após análise do planejamento experimental, foi na temperatura de 30 °C e com suplementação de extrato bruto de levedura e sulfato de magnésio após 48 h de cultivo. Neste experimento foi obtido 39,34 g·L⁻¹ de ácido láctico e produtividade de 0,82 g·(L·h)⁻¹. Nos cultivos realizados em biorreatores de cultivo submerso do tipo batelada, o melhor resultado foi obtido na condição de anaerobiose e com controle de pH em 6,0, produzindo em 24 h de cultivo 35,52 g·L⁻¹ de ácido láctico, com produtividade de 1,48 g·(L·h)⁻¹. Já nos biorreatores do tipo batelada alimentada, o melhor resultado foi obtido no experimento com 12 h de alimentação linear de hidrolisado enzimático contendo 130 g·L⁻¹ de açúcares, no qual foi possível manter a produtividade acima de 1,5 g·(L·h)⁻¹ durante 10 h de alimentação, produzindo um título de ácido láctico de 58,6 g·L⁻¹ após 48 h de fermentação.

Palavras-chave: Ácido láctico; ácido polilático; hidrolisados; casca de soja; biorreatores.

ABSTRACT

The development of bioprocess in which the use of low-cost raw materials as an alternative to established processes are increasing in importance and relevance, given the economic, social, and environmental issues. In view of these factors, and aiming at more sustainable processes, the main purpose of the present work was the optimization of the lactic acid production by lactic-acid bacteria, using acid and enzymatic soybean hull hydrolysates as medium. The preliminary cultivations were performed in Erlenmeyer flasks, in orbital shaker at 37 °C and 120 rpm. The initial pH of these cultures was 6.0. A series of experiments was performed to evaluate a few process variables and select a robust strain, with a satisfactory performance. The selected strain was *Lactobacillus plantarum* BL011. A Plackett-Burman experimental design was performed to determine both temperature and supplementation with crude yeast extract, magnesium sulphate and manganese sulphate would influence in the process productivity. The best result in orbital shaker was obtained after the analysis of the experimental design. Crude yeast extract and magnesium sulphate supplementation, at 30 °C, after 48 h of fermentation were the best conditions, allowing for a production of 39.34 g·L⁻¹ of lactic acid, with a productivity of 0.82 g·(L·h)⁻¹. In the batch bioreactors cultivations of submerged culture, the best result was under anaerobiosis and pH controlled in 6.0, with a lactic acid titer of 35.52 g·L⁻¹ and productivity of 1.48 g·(L·h)⁻¹ after 24 h of fermentation. In fed-batch bioreactors cultivations, the best result was obtained in the 12 h linear ascending strategy, feeding the culture media with 400 mL of supplemented enzymatic hydrolysate with 130 g·L⁻¹ total sugars during this period. In this experiment, it was possible to maintain the process productivity above 1.5 g·(L·h)⁻¹ for 10 h of feeding. Also, in this experiment, it was obtained the highest lactic acid titer, 58.6 g·(L·h)⁻¹, after 48 h of fermentation.

Keywords: Lactic acid; polylactic acid; hydrolysates; soybean hull; bioreactors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais componentes presentes na estrutura dos materiais lignocelulósicos.....	9
Figura 2. Rotas metabólicas envolvidas na produção de ácido láctico por bactérias ácido-láticas a partir de diferentes fontes de carbono.....	14
Figura 3. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. plantarum</i> BL011 em mistura de hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja em agitador orbital a 37 °C e 120 rpm...	34
Figura 4. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. casei</i> em mistura de hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja em agitador orbital a 37 °C e 120 rpm.....	35
Figura 5. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. delbrueckii</i> em mistura de hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja em agitador orbital a 37 °C e 120 rpm.....	35
Figura 6. Perfil cinético do pH ao longo dos cultivos no Experimento 3.....	36
Figura 7. Diagrama de Pareto obtido pela análise do Planejamento experimental para a variável Q_P com o software Statistica 12, confiabilidade de 95 % e $R^2=0,86$	41
Figura 8. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. plantarum</i> BL011 em biorreator do tipo batelada, a 30 °C e aeração de 1vvm	43
Figura 9. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. plantarum</i> BL011 em biorreator do tipo batelada, a 30 °C em anaerobiose	44
Figura 10. Perfil cinético do pH ao longo dos cultivos em biorreatores batelada a 30 °C e sem controle de pH	46
Figura 11. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. plantarum</i> BL011 em biorreator do tipo batelada, a 30 °C em anaerobiose e com pH controlado em 6,0.....	47
Figura 12. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. plantarum</i> BL011 em biorreator do tipo batelada alimentada com 12 h de alimentação, a 30 °C em anaerobiose pH controlado em 6,0 e hidrolisado de alimentação contendo 90 g·L ⁻¹ de açúcares.	50
Figura 13. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. plantarum</i> BL011 em biorreator do tipo batelada alimentada com 24 h de alimentação, a 30 °C em anaerobiose pH controlado em 6,0 e hidrolisado de alimentação contendo 90 g·L ⁻¹ de açúcares	51
Figura 14. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem <i>L. plantarum</i> BL011 em biorreator do tipo batelada alimentada com 12 h de alimentação, a 30 °C em anaerobiose pH controlado em 6,0 e hidrolisado de alimentação contendo 130 g·L ⁻¹ de açúcares	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de ácido láctico a partir de diferentes substratos e espécies de LAB (Traduzido e adaptado de Cubas-Cano et al., 2018 e Alves de Oliveira et al., 2019).....	16
Tabela 2. Níveis das variáveis utilizadas na matriz de planejamento.	24
Tabela 3. Composição média dos açúcares analisados nos hidrolisados da casca de soja, em g·L ⁻¹	28
Tabela 4. Consumo de açúcares e título de ácido láctico no Experimento 1, após 48 h de cultivo, utilizando hidrolisado ácido da casca de soja com concentrações de 20 g·L ⁻¹ e 60 g·L ⁻¹ de açúcares.	30
Tabela 5. Consumo de açúcares e título de ácido láctico obtido no Experimento 2, após 48 h de cultivo, em diferentes condições de disponibilidade de oxigênio.	33
Tabela 6. Análise do consumo de açúcares, produção de ácido láctico e produtividade pelas linhagens no Experimento 3.	38
Tabela 7. Matriz do planejamento experimental com níveis codificados, título de ácido láctico e produtividade em 48 h de cultivo.	40
Tabela 8. Consumo de açúcares e produção de ácido láctico por <i>L. plantarum</i> BL011 após 48 h, nos cultivos a 30 °C e 37 °C, com e sem suplementação.....	42
Tabela 9. Produção de ácido láctico e produtividade volumétrica nos experimentos realizados em biorreatores do tipo batelada e batelada alimentada com <i>L. plantarum</i> BL011.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MRS	De Man, Rogosa e Sharpe
HPLC	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
PLA	Ácido Polilático ou Poli-Ácido Lático (<i>Polylactic acid</i>)
LAB	Bactérias ácido-láticas (<i>Lactic Acid Bacteria</i>)
L-LA	L-(+)-Ácido Lático
D-LA	D-(-)-Ácido Lática
PLLA	Poli L-(+)-Ácido Lático
PDLA	Poli D-(-)-Ácido Lático
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> (Geralmente reconhecido como seguro)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Qp	Produtividade Volumétrica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
EMP	Rota metabólicas <u>Embden</u> -Meyerhof-Parnas
PP	Rota metabólica Pentose-Fosfato
PK	Rota metabólica Fosfocetolase

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	1
2.	Revisão Bibliográfica.....	5
2.1.	Ácido Lático.....	5
2.2.	Substratos para a produção de ácido lático	7
2.3.	Hidrólise da biomassa lignocelulósica.....	9
2.4.	Microrganismos produtores de ácido lático e rotas metabólicas	12
2.5.	Condições de processo	17
3.	Materiais e Métodos	21
3.1.	Microrganismos e Inóculo	21
3.2.	Hidrolisados da Casca de Soja	22
3.3.	Ensaio de fermentação em agitador orbital	23
3.4.	Planejamento Plackett-Burman.....	23
3.5.	Experimentos em Biorreatores.....	24
	3.5.1. Batelada	25
	3.5.2. Batelada Alimentada.....	25
3.6.	Métodos Analíticos	26
4.	Resultados e Discussão	28
4.1.	Caracterização dos hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja	28
4.2.	Seleção de microrganismos.....	30
4.3.	Planejamento experimental	39
4.4.	Cultivos em biorreatores batelada.....	43
4.5.	Biorreatores: batelada alimentada	49
5.	Conclusões	55
	REFERÊNCIAS	57

1. Introdução

Diante de uma crescente preocupação mundial com a sustentabilidade em todas as etapas envolvidas em todo o tipo de processo industrial, cada vez mais é importante estudar e desenvolver potenciais tecnologias emergentes que possam trazer benefícios econômicos e redução de impactos ambientais. A demanda mundial por diversos produtos em muitos casos não consegue ser acompanhada pela indústria tradicional, abrindo espaço para que novas tecnologias, que utilizem fontes alternativas, possam ganhar mercado. Isso ocorre por diversos motivos, sendo um deles o alto valor das matérias-primas envolvidas nos processos, sendo muito comum esse tipo de problema na obtenção de produtos por via fermentativa. Entre outros fatores, isso influencia para que o conceito de biorrefinarias de 2ª geração ganhe espaço.

Uma biorrefinaria é uma instalação onde são integrados processos que utilizam diferentes tecnologias para transformar a biomassa desejada em moléculas que podem ser convertidas a produtos de alto valor agregado, como biocombustíveis, intermediários químicos, materiais e energia. Esta integra diversas rotas de conversão com o foco no melhor aproveitamento da biomassa e da energia nela contida e são comumente divididas em 3 categorias: as de 1ª geração, que são aquelas que utilizam culturas alimentares no processo, como açúcar e amido; as de 2ª geração, que processam matérias-primas não-comestível, como resíduos agroindustriais, madeira e culturas energéticas; enquanto que as de 3ª geração são as que utilizam biomassa algal como matéria-prima.

Uma das principais vantagens na aplicação de biorrefinarias de 2ª geração é a utilização de matérias-primas com grande disponibilidade e de baixo custo. Podem ser utilizados diversos tipos de biomassa, dentre elas resíduos agroindustriais como palhas e cascas de cereais, palha e espiga de milho, bagaço de cana-de-açúcar; resíduos industriais, como soro de queijo, resíduos de indústrias de papel e cervejeira; e ainda resíduos sólidos orgânicos. Nesse sentido, o Brasil tem condições de entrar nesse mercado, com o desenvolvimento de bioprocessos que utilizem biomassas abundantes no seu território, como as biomassas da cana-de-açúcar, de cereais e de grãos como a soja, por exemplo.

A utilização de subprodutos agroindustriais lignocelulósicos representa uma alternativa altamente promissora, pois significa a redução de custos com relação à formulação de meios de cultivo, além de auxiliar na diminuição do impacto ambiental provocado por estes resíduos na natureza e agregar valor às potenciais fontes de nutrientes na obtenção de bioprodutos. Nos

últimos anos, diversos estudos relataram a valorização desses materiais através da bioconversão em produtos de alto valor agregado e com aplicações nos mais variados setores.

Dos vários produtos de grande interesse comercial e com alto valor agregado, o ácido láctico aparece em destaque, uma vez que a sua produção mundial está encontrando dificuldades de acompanhar à crescente demanda por este produto, devido às suas mais variadas aplicações. O ácido láctico é um ácido orgânico natural que possui características que o fazem ter aplicações em diversas indústrias, como a indústria química, têxtil, farmacêutica e alimentícia, podendo ter usos diversos, como emulsificante, acidulante e conservante, por exemplo. O ácido láctico também é essencial para a obtenção dos monômeros para a produção de ácido polilático (PLA), um polímero biodegradável cuja demanda vem aumentando nos últimos anos, uma vez que pode ser uma alternativa à polímeros de origem fóssil na obtenção de plásticos, além de ter aplicações importantes na medicina e biomedicina devido à sua biocompatibilidade.

Segundo alguns estudos, o mercado mundial de ácido láctico teve uma demanda de 1220 kt em 2016 e foi avaliado em 2,64 bilhões de dólares americanos no ano de 2018, devendo atingir uma demanda de 1920 kt no ano de 2025, que deverá representar um valor de 9,8 bilhões no mercado global (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a). Outras fontes também relataram e projetaram um crescente aumento na demanda por este produto e, conseqüente, do valor de mercado (<http://www.grandviewresearch.com>; <http://www.wtva.com>; YAO; TANG, 2013). Embora o valor em kt ou dólares possa variar nesses estudos, todas as análises apontam projeções positivas tanto no mercado de ácido láctico quanto no de PLA. A produção de ácido láctico por bioprocessos já ocorre a nível industrial a partir de carboidratos simples e é uma boa alternativa à síntese química que ocorre a partir de matérias-primas fósseis. Os substratos mais utilizados na obtenção do ácido láctico são glicose e amido, ambos já processados, o que acaba encarecendo o processo e, por conseqüência, o produto.

Nos próximos anos, a produção industrial de ácido láctico deve enfrentar alguns desafios, devido às dificuldades para atender à crescente demanda por esse produto. Dentre os principais motivos disso é o preço elevado dos substratos utilizados na atual produção desse composto e limitações dos microrganismos utilizados nos processos, dando espaço à utilização de substratos alternativos e microrganismos geneticamente modificados. Dessa forma, se torna interessante o desenvolvimento de bioprocessos de 2ª geração para a produção de ácido láctico.

A soja, que está no escopo do presente estudo, é uma das principais culturas produzidas mundialmente, sendo o Brasil o segundo maior produtor desse grão a nível mundial, com aproximadamente 115 milhões de toneladas produzidos na safra 2018/2019 (EMBRAPA,

2020). No país, o Rio Grande do Sul possui a segunda maior produção, sendo responsável por 16,7 % da produção brasileira no mesmo ano, atrás apenas do estado do Mato Grosso do Sul. Durante o processamento da soja são gerados alguns resíduos de baixo valor comercial, como a casca e a fibra de soja, comumente destinados para a incineração em caldeiras (geração de energia), alimentação animal ou descarte. Com relação à composição, a casca de soja apresenta elevada concentração de celulose (entre 29 % e 51 %), de 10 % a 25,5 % de hemicelulose e baixo teor de lignina, entre 2 % e 12 % (CASSALES et al., 2011; CORTIVO et al., 2018).

A utilização da casca de soja para a obtenção de hidrolisados ricos em açúcares e nutrientes para uso como meio de cultura já foi tema em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, gerando resultados expressivos. No entanto, ainda não há relatos na literatura do uso desse material para a produção de ácido lático. Os hidrolisados da casca de soja representam uma possível fonte alternativa para uso em bioprocessos, uma vez que são meios ricos em açúcares e com baixa concentração de compostos inibidores, uma vez que a casca de soja possui baixa concentração de lignina. Uma das motivações para o estudo e o desenvolvimento de bioprocessos para a produção de ácido lático é o interesse econômico na produção de ácido lático, devido à grande versatilidade desse produto no mercado.

Por outro lado, o uso de hidrolisados de biomassa lignocelulósica como matéria-prima em bioprocessos como esse, apesar de ser de grande interesse, ainda possui diversos desafios. Esses materiais são alternativas renováveis e de baixo custo, mas ainda demandam estudo para que seja possível obter maior rendimento e produtividade nas fermentações, uma vez que os meios de cultura obtidos possuem características que podem dificultar o crescimento e o metabolismo dos microrganismos

Diversos microrganismos já foram reportados na literatura com capacidade para produção de ácido lático através de fermentação, destacando-se as bactérias conhecidas como bactérias ácido-láticas (LAB). Em estudos como esse, existe uma dificuldade de encontrar microrganismos que apresentem robustez no processo, suportando as condições de estresse apresentadas pelo meio de cultura utilizado e pelo próprio processo e produto em si.

No presente estudo, foram empregadas diferentes linhagens de bactérias ácido-láticas para a produção de ácido lático a partir de hexoses e pentoses presentes nos hidrolisados provenientes dos tratamentos ácido e enzimático da casca de soja. Com o objetivo de selecionar apenas um microrganismo para testar variáveis de processo e realizar a otimização do mesmo, foram realizados inicialmente experimentos em agitador orbital. Após selecionado o

microrganismo, foram realizados experimentos em biorreatores de cultivo submerso operando em batelada e batelada alimentada.

De acordo com o que foi explicitado acima, o principal objetivo deste trabalho foi selecionar um microrganismo com capacidade de conversão dos açúcares presentes nos hidrolisados da casca de soja em ácido lático, assim como otimizar este bioprocessos.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- ✓ Selecionar um microrganismo para a produção de ácido lático a partir de hidrolisados da casca de soja;
- ✓ Determinar, com o auxílio de um planejamento experimental, a influência da temperatura e da suplementação do hidrolisado na produção de ácido lático e na produtividade do processo;
- ✓ Avaliar e otimizar as condições de operação em biorreator do tipo de batelada;
- ✓ Avaliar a possível utilização de uma estratégia do tipo batelada alimentada.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Ácido Lático

O ácido lático (nomenclatura IUPAC ácido 2-hidroxiopropanóico) é o ácido carboxílico natural que mais ocorre na natureza (ISIKGOR; BECER, 2015). Esse ácido apresenta isomeria óptica, podendo ser do tipo L-(+)-ácido lático (L-LA) e D-(-)-ácido lático (D-LA). O ácido lático é um composto de alto valor agregado que vem ganhando mercado nos últimos anos, uma vez que possui uma grande gama de aplicações em variados ramos da indústria.

A utilização de ácido lático na indústria de alimentos já é bem consolidada, sendo um importante aditivo que pode ter variadas funções, como acidulante, emulsificante e flavorizante, além de ser um agente antimicrobiano inibindo o crescimento de bactérias em alimentos processados (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; DJUKIĆ-VUKOVIĆ et al., 2019). No entanto, a proporção de cada isômero de ácido lático na mistura racêmica obtida no processo de produção é um fator muito importante, pois confere diferentes propriedades à mistura final. Isso faz com que a pureza enantiomérica do ácido lático seja um fator crucial para a produção industrial desse composto (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; DAS; GOYAL, 2012). O L-LA é preferencialmente utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica, pois ele pode ser completamente assimilado pelo organismo humano. Devido à sua biocompatibilidade, possui também importantes usos na indústria de cosméticos na formulação de pomadas, como soluções antiacne e umectantes, por exemplo (KRISHNA et al., 2018; NAVEENA et al., 2005). No ramo da química verde, ambos os isômeros podem ser utilizados para produzir compostos baseados nessas moléculas, como o propileno glicol, ácido propanoico, ácido acrílico, 2,3-pentadiona e, principalmente, para obter os monômeros para a produção de ácido polilático (PLA) (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a; CUBAS-CANO et al., 2018; CUI; LI; WAN, 2011).

O PLA é um polímero biodegradável de alta resistência química que pode ser uma alternativa a plásticos de origem fóssil, sendo esse polímero um material apropriado para a obtenção de fibras, tecidos não tecidos (TNT), e filmes, por exemplo (GREWAL; KHARE, 2018; ZHANG; VADLANI, 2013). Características e propriedades importantes do PLA podem ser controladas utilizando diferentes concentrações dos enantiômeros de ácido lático. O uso desse polímero em embalagens também vem ganhando força nos últimos anos, podendo ser associado à diversas substâncias capazes de conceder propriedades diversas ao produto. Uma

vez que esse polímero apresenta biocompatibilidade, pode também ser utilizado na área médica com aplicações importantes na reconstrução de tecidos, suturas e implantes, por exemplo (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). Ao utilizar misturas racêmicas de ácido láctico para a produção de PLA, o polímero resultante do processo é amorfo e instável. Já com o uso de isômeros puros (L-LA ou D-LA) é possível obter polímeros de alta cristalinidade (PLLA ou PDLA), que possuem um ponto de fusão mais baixo em relação a plásticos convencionais. Por isso, pesquisadores têm trabalhado para aumentar a resistência térmica do PLA por meio de copolimerização com outros comonômeros. Misturando PDLA e PLLA, por exemplo, é possível obter um polímero de maior cristalinidade e alta estabilidade térmica, aumentando o ponto de fusão (BERNARDO et al., 2016). No entanto, o uso industrial desse polímero ainda é limitado, uma vez que é um produto que ainda possui custo bastante elevado quando comparado aos polímeros de origem petroquímica. O elevado custo do PLA ainda se deve principalmente ao custo de produção e purificação do ácido láctico.

Embora o ácido láctico seja uma substância classificada como GRAS (que pode ser aplicado com segurança em alimentos) pela FDA (*American Food and Drug Administration*), o isômero D-LA em altas doses pode ser prejudicial, uma vez que não é metabolizado por animais, podendo causar acidose e descalcificação (KARP et al., 2011).

O processo de separação e purificação do ácido láctico ainda representa uma etapa muito custosa do processo, sendo também foco de estudos recentes. Atualmente, a principal técnica utilizada industrialmente é um processo tradicional, baseada em neutralização com hidróxido de cálcio e hidrólise com ácido sulfúrico, processo que acaba gerando uma quantidade indesejada de resíduos (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a; DJUKIĆ-VUKOVIĆ et al., 2019). Diversos estudos já propuseram novas tecnologias como alternativa, porém a maioria ainda enfrenta um alto custo de operação e de materiais envolvidos no processo (BIDDY; SCARLATA; KINCHIN, 2016).

Um método bastante promissor é o de coluna de destilação reativa, onde é utilizado metanol ou algum outro álcool para esterificação do ácido láctico, seguido de hidrólise do metil lactato formado, resultando em ácido láctico puro na parte inferior da coluna de destilação. Normalmente é utilizado metanol neste processo, uma vez que metil lactato é o éster mais volátil e o metanol é o álcool mais reativo (KUMAR; MAHAJANI, 2007). No entanto, em um estudo recente foi avaliada a utilização de etanol como reagente e os autores consideraram que a abordagem utilizando etanol em um contexto de biorrefinaria integrada (onde há a produção

tanto de etanol quanto de ácido láctico) levaria a bons resultados (GEZAE DAFUL; GÖRGENS, 2017).

2.2. Substratos para a produção de ácido láctico

O ácido láctico pode ser obtido por síntese química a partir de matérias-primas fósseis, ou por processos fermentativos. O processo de síntese química, que é bastante custoso, envolve a produção de lactonitrilo, a partir da reação entre acetaldeído e cianeto de hidrogênio, que deriva de processos petroquímicos (GUHA; BANERJEE; BERA, 2013). Matérias-primas fósseis além de serem finitas, estão sujeitas a flutuações de preço, o que não é bom para um planejamento econômico. O ácido láctico obtido a partir desse tipo de material é uma mistura racêmica, não sendo possível controlar as propriedades físicas e químicas do produto obtido, além de não poder ser aplicado, por exemplo, nas indústrias farmacêutica, alimentícia e médica.

Por outro lado, com a produção de ácido láctico a partir de processos fermentativos é possível obter isômeros com alta pureza, dependendo do microrganismo utilizado e do processo empregado (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a; CUBAS-CANO et al., 2018). A produção de ácido láctico por fermentação apresenta vantagens quando comparada com a síntese química: substratos de baixo custo, temperaturas de processo relativamente mais baixas, menor consumo energético, maior pureza do ácido láctico obtido, entre outras (BADER et al., 2010; KRISHNA et al., 2018). Algumas indústrias exigem que a pureza ótica seja bastante elevada, o que faz com que seja de grande interesse comercial a escolha da produção por via fermentativa.

A produção de ácido láctico por via fermentativa já ocorre a nível industrial em larga escala (cerca de 90 % da produção mundial) e ocorre em sua maioria a partir de carboidratos simples, principalmente matéria-prima amilácea (CUBAS-CANO et al., 2018; WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015). O substrato utilizado para a produção de ácido láctico depende também da localização geográfica em que se encontra a indústria, o que acaba afetando também o preço final do ácido láctico, uma vez que cada indústria vai utilizar os substratos que estão mais acessíveis na região (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a). No entanto, esse tipo de matéria-prima tem um custo elevado, uma vez que já é processada e compete com a indústria alimentícia. Dentre outros diversos fatores, têm se procurado como alternativa bioprocessos que utilizem matérias-primas renováveis não-comestíveis como substrato. Além disso, o custo da matéria-prima é um dos principais fatores a serem levados em consideração para a viabilidade do processo.

Dentro desse escopo, a utilização de biomassa lignocelulósica como substrato em bioprocessos representa uma das alternativas mais promissoras, pois esse tipo de material é o mais abundante no planeta (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a; ISIKGOR; BECER, 2015; ZHOU et al., 2011). Representa a utilização de fontes renováveis de baixo custo e que não competem com a indústria alimentícia e, por consequência, a redução de custos ao processo com relação à formulação de meios para o cultivo dos microrganismos, neste caso, produtores de ácido lático. Além disso, auxilia na diminuição do impacto ambiental provocado por estes resíduos na natureza e agrega valor às potenciais fontes de nutrientes na obtenção de bioprodutos (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013; SALGADO et al., 2009). Essas matérias-primas possuem uma estrutura basicamente composta por: celulose, um polímero linear de glicose; hemicelulose, um polímero ramificado composto por diversos açúcares de 5 e 6 carbonos; e lignina, um polímero amorfo monocristalino formado pelos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico. A estrutura de materiais lignocelulósicos está exemplificada na Figura 1. A celulose e a hemicelulose estão intimamente ligadas à lignina, sendo necessário que seja realizado um processo para liberar os açúcares fermentescíveis, uma vez que a maioria dos microrganismos não possuem as enzimas hidrolíticas necessárias para quebrar esta estrutura (CUBAS-CANO et al., 2018; ISIKGOR; BECER, 2015).

Uma das formas de biomassa lignocelulósica mais comumente utilizados em estudos recentes são todo tipo de resíduos agroindustriais, como os provenientes do processamento de grãos, cereais, milho e cana-de-açúcar. Porém, cada uma dessas biomassas possui características e composição diferente. Por conta disso, o uso de cada tipo deve ser avaliado e o tratamento a ser empregado será diferente. Diversos tipos de biomassa já foram utilizados como matéria-prima para a bioprodução de ácido lático por diversos microrganismos. Dentre os materiais já utilizados se encontram a palha de milho (WANG et al., 2018; XIA et al., 2018), espiga de milho (KONG et al., 2019), soro de queijo (BERNARDO et al., 2016), bagaço de cana-de-açúcar (DE OLIVEIRA; FILHO; ROSSELL, 2016; OONKHANOND et al., 2017), entre outros.

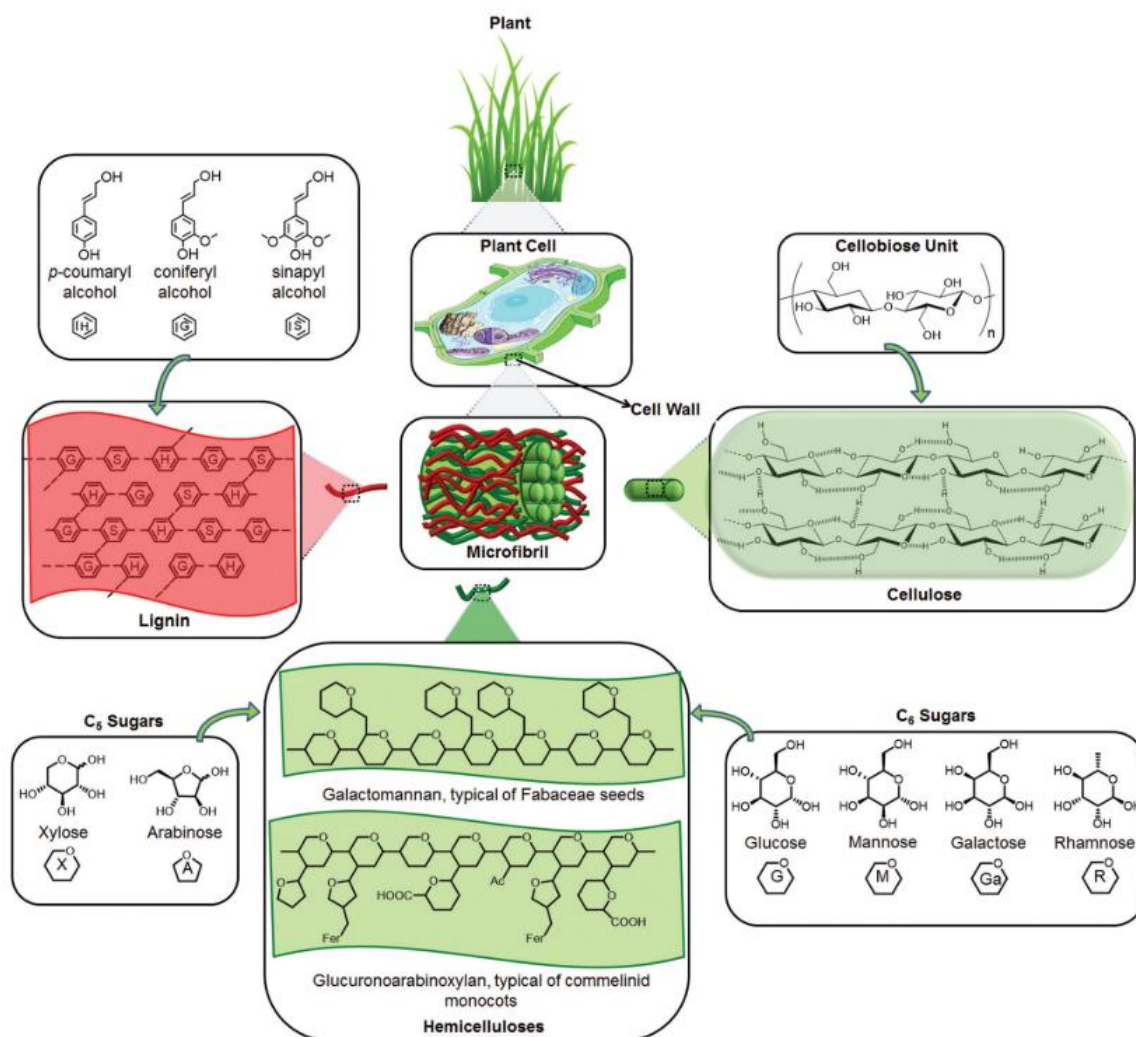


Figura 1. Principais componentes presentes na estrutura dos materiais lignocelulósicos. (Fonte: ISIKGOR; BECER, 2015)

2.3. Hidrólise da biomassa lignocelulósica

Para que possa ser utilizada em processos de fermentação, a biomassa lignocelulósica precisa passar por etapas de pré-tratamentos e/ou hidrólises, através de métodos mecânicos, químicos, físico-químicos, biológicos e/ou uma combinação destes (BARAKAT; DE VRIES; ROUAU, 2013). Esses processos precisam ser otimizados para que se obtenha a maior eficiência de hidrólise possível, ou seja, que se consiga converter os polímeros em açúcares fermentescíveis presentes na sua estrutura polimérica (ISIKGOR; BECER, 2015). O objetivo dessas etapas é aumentar a porosidade do material, separar seus compostos e reduzir a cristalinidade da celulose sem destruir os açúcares constituintes, além da solubilizar as frações de hemicelulose e lignina (LEE, 1997; MARGEOT et al., 2009).

Devem ser avaliadas as condições de hidrólise, de modo a obter um hidrolisado rico em açúcares e com baixa concentração de compostos inibitórios (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Submetendo a biomassa a condições muito severas, o hidrolisado resultante muito provavelmente terá uma alta concentração de compostos tóxicos, provenientes da degradação dos açúcares e da lignina. Algumas potenciais alternativas aos tratamentos de hidrólise tradicionais apareceram nos últimos anos, como a cavitação hidrodinâmica, explosão à vapor e a utilização de líquidos iônicos (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013; SASAKI et al., 2012; TERÁN HILARES et al., 2016). É interessante, em alguns casos, avaliar o potencial de uma etapa de detoxificação da biomassa a ser utilizada, da biomassa pré-tratada ou até mesmo dos caldos resultantes dos processos de pré-tratamento e hidrólise (JÖNSSON; MARTÍN, 2016; LAOPAIBOON et al., 2010).

Existem diversos tratamentos químicos e físicos que podem ser aplicados como técnicas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Esses processos são aplicados com o objetivo de aumentar a acessibilidade da área superficial, reduzir a cristalinidade da celulose, despolimerizar parcialmente a celulose e solubilizar as frações de hemicelulose e lignina (MARGEOT et al., 2009). Cada uma dessas técnicas apresenta vantagens e desvantagens, de forma que a escolha do pré-tratamento será de acordo com a finalidade que o caldo hidrolisado será utilizado. O pré-tratamento é uma etapa muito importante do processo, uma vez que aumenta a acessibilidade à hemicelulose e à celulose para a etapa enzimática, além de contribuir para a eficiência e diminuição dos custos do processo (BARAKAT; DE VRIES; ROUAU, 2013; ISIKGOR; BECER, 2015).

Os tratamentos químicos geralmente são subdivididos de acordo com seu catalisador, que pode ser ácido ou alcalino. Durante o tratamento ácido, a camada de hemiceluloses é hidrolisada. Já no tratamento alcalino, parte da lignina é removida e a hemicelulose deve ser hidrolisada posteriormente em um processo enzimático (OGEDA; PETRI, 2010).

Dentre os tratamentos químicos, destaca-se o realizado com ácido diluído e temperatura intermediária (60-160 °C), considerado um dos mais eficientes em relação à liberação dos açúcares, em especial os presentes na fração de hemicelulose (SIVAKUMAR et al., 2010). Esse tipo de tratamento pode alcançar elevados rendimentos de conversão da hemicelulose em açúcares, além de gerar uma menor concentração de compostos inibidores do crescimento celular, que provém da degradação dos açúcares liberados e da lignina (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Após a etapa de pré-tratamento, pode ser empregada uma etapa de sacarificação, com o

uso de microrganismos ou de enzimas comerciais, uma vez que a celulose será acessada mais facilmente pelas enzimas produzidas ou empregadas no processo.

A etapa de sacarificação (hidrólise enzimática) da biomassa lignocelulósica pode ser realizada por microrganismos com capacidade hidrolítica ou por enzimas comerciais. O emprego de enzimas comerciais é atualmente o método de sacarificação mais empregado, pois apresenta benefícios como baixa formação de metabólitos secundários e condições operacionais relativamente mais brandas. Normalmente são utilizadas celulasas, uma classe de enzimas que atuam em conjunto, sendo predominantemente da classe de hidrolases, capazes de romper as ligações glicosídicas (HARNPICHARNCHAI et al., 2009). Esses complexos enzimáticos são constituídos por endo-1,4- β -D-glucanases (endoglucanases), exo-1,4- β -D-glucanases (exoglucanases) e 1,4- β -D-glucosidades (β -glucosidases). As endoglucanases agem de forma aleatória, quebrando as ligações glicosídicas da celulose, preferencialmente em regiões amorfas. As exoglucanases, ou celobio-hidrolases, atuam nos terminais da cadeia da celulose, em regiões cristalinas, liberando maior quantidade de celobiose como produto. E as β -glucosidases, mesmo não atuando diretamente na cadeia celulolítica, são essenciais pois catalisam a clivagem das celobioses em glicose, disponibilizando os açúcares fermentescíveis (ANDERSEN, 2007; OGEDA; PETRI, 2010).

O uso de hidrolisados de biomassa lignocelulósica como matéria-prima em bioprocessos, no entanto, ainda apresentam algumas desvantagens. Apesar de serem alternativas renováveis e de baixo custo, poucos microrganismos são capazes de metabolizar as pentoses (provenientes da hemicelulose) presentes nesses hidrolisados uma vez que os meios de cultura podem possuir características que podem dificultar o crescimento e o metabolismo dos microrganismos. Uma característica comum de muitos desses hidrolisados é a alta pressão osmótica, causada pela alta concentração de açúcares e composição complexa desses meios (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018b; CORTIVO et al., 2018).

Outro desafio muito comum ao utilizar essa biomassa é a repressão catabólica causada pela glicose frente às pentoses disponíveis no meio (CUBAS-CANO et al., 2018). Além disso, devido ao metabolismo das pentoses, é comum haver a formação de subprodutos durante a fermentação láctica. Devido a esses e a outros diversos fatores, esses bioprocessos ainda demandam muito estudo para que se possa obter microrganismos mais robustos e capazes de alcançar maiores rendimento e produtividade nas fermentações (CUBAS-CANO et al., 2018; GAO et al., 2018). Por conta disso, a viabilidade desse processo está atrelada à otimização deste bioprocessos, sendo a purificação do ácido láctico do meio de cultura outra etapa crítica.

A natureza e a concentração dos compostos inibitórios que podem estar presentes nos hidrolisados provenientes dos tratamentos da biomassa lignocelulósica dependem diretamente do tipo de biomassa que está sendo utilizada, do tipo de pré-tratamento empregado e das condições utilizadas no mesmo (JÖNSSON; MARTÍN, 2016). Os principais compostos inibitórios formados durante o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica são furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos. Os furanos mais comumente formados são furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), formados a partir da degradação de pentoses e hexoses, respectivamente. A presença desses furanos nos hidrolisados normalmente resultam em uma fase *lag* mais prolongada (PENG et al., 2013; VAN DER POL et al., 2016). Os ácidos acético e fórmico são liberados no meio pela degradação dos grupos acetil e da degradação de furfural e HMF, respectivamente. Esses ácidos podem dificultar o crescimento celular, sendo o ácido fórmico um dos principais compostos inibitórios (ALMEIDA et al., 2007). Estudos recentes apontaram que a presença de compostos fenólicos como o ácido cumárico e ácido ferúlico podem inibir severamente o crescimento celular em concentrações superiores a $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (VAN DER POL et al., 2016).

Estudos recentes realizados no nosso grupo de pesquisa realizaram a caracterização e a utilização dos hidrolisados da casca de soja para produzir, por exemplo, etanol e 2,3-butanodiol (CASSALES et al., 2011; CORTIVO et al., 2018, 2019; HICKERT et al., 2014). Esses hidrolisados são considerados possíveis substratos alternativos para bioprocessos uma vez que possuem uma concentração elevada de açúcares e uma baixa concentração de compostos inibitórios.

2.4. Microrganismos produtores de ácido láctico e rotas metabólicas

Diversos microrganismos são capazes de produzir ácido láctico através de fermentação, destacando-se as bactérias conhecidas como bactérias ácido-láticas (LAB). Nos últimos anos, alguns autores também relataram a produção de ácido láctico por microrganismos geneticamente modificados, em especial por linhagens de *Escherichia coli*. No entanto, quando se trata da produção de ácido láctico, 90 % dos estudos são com o uso de LAB (WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015).

Bactérias ácido-láticas geralmente são classificadas como gram-positivas, anaeróbias aerotolerantes, não formadores de esporos e capazes de produzir o ácido láctico como maior ou único produto da fermentação, além de possuírem potencial probiótico (VOHRA;

SATYANARAYANA, 2012). Esses microrganismos são adaptáveis e sabe-se que possuem diversidade metabólica. Exemplos de bactérias ácido-láticas são espécies encontradas nos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, entre outras (CUBAS-CANO et al., 2018; JUTURU; WU, 2016). Esses microrganismos, em sua maioria, são capazes de tolerar condições ácidas e amplas faixas de temperatura, porém necessitam de fontes ricas em nitrogênio (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a).

As rotas metabólicas envolvidas na produção de ácido lático por LAB são: a rota Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), também conhecida como rota glicolítica; a rota pentose-fosfato (PP); e a rota fosfoacetolase (PK). Muitas bactérias ácido-láticas vão ter uma ou mais dessas rotas envolvidas na produção de ácido lático e o rendimento vai variar de acordo com o microrganismo e as condições de cultivo. Podem ser classificadas como homoláticas ou heteroláticas, de acordo com a rota utilizada na fermentação (CUBAS-CANO et al., 2018). A Figura 2 representa as vias metabólicas para a produção de ácido lático por LAB a partir de fontes de carbono comumente presentes em hidrolisados de materiais lignocelulósicos.

LAB homoláticas, como *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus acidophilus*, por exemplo, convertem hexoses a piruvato pela rota EMP e então a lactato utilizando a enzima lactato desidrogenase (LDH) (ABDEL-RAHMAN; SONOMOTO, 2016). Uma molécula de glicose pode render até duas moléculas de ácido lático, gerando 2 ATP. Em algumas linhagens, a glicose é metabolizada parcialmente pela rota PP. A maioria dessas LAB utilizam hexoses como fonte de carbono, mas não são capazes de metabolizar as pentoses presentes na hemicelulose, por exemplo (ZHANG et al., 2016).

Bactérias ácido-láticas heteroláticas podem ser de dois tipos: obrigatoriamente heteroláticas e heteroláticas facultativas. As obrigatoriamente heteroláticas, como por exemplo as linhagens *Lactobacillus bif fermentus*, *Leuconostoc lactis* e *Lactobacillus brevis*, metabolizam hexoses e pentoses exclusivamente pela rota PK (PRÜCKLER et al., 2015). Já as heteroláticas facultativas, como *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus plantarum*, apresentam ambas as rotas em seu metabolismo. Esses microrganismos metabolizam hexoses via rota EMP e pentoses via rota PK. Dessa forma, não produzem ácido acético até que toda a glicose tenha sido consumida, mudando o metabolismo de homo para heterofermentativo.

Para a produção de ácido lático em bioprocessos envolvendo a utilização de hidrolisados de biomassa lignocelulósica ou de resíduos em geral é necessário que se utilize microrganismos de metabolismo robusto e versátil, capazes de assimilar diferentes fontes de carbono e suportem

as condições do meio de cultura que será empregado (ABDEL-RAHMAN; SONOMOTO, 2016). Para que se torne viável o conceito de biorrefinaria de 2ª geração, por exemplo, os microrganismos empregados nos processos devem ser de alta robustez, uma vez que deverão ser submetidos a diversos tipos de bioprocessos, com diferentes tipos de caldos fermentativos.

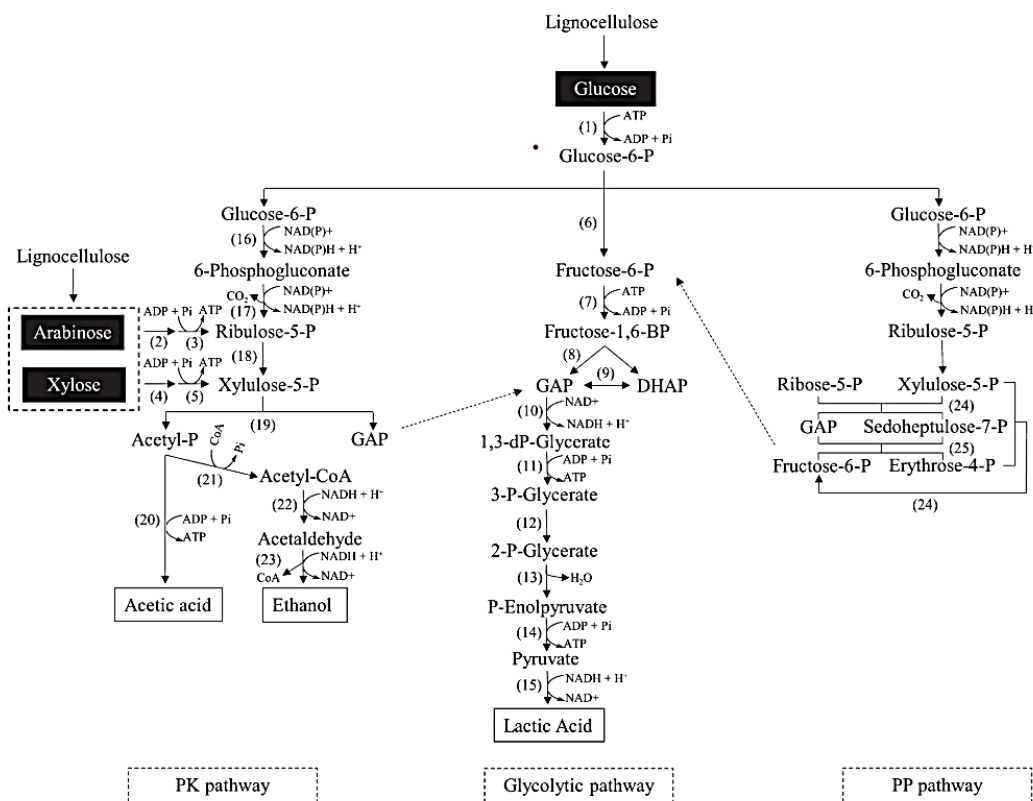


Figura 2. Rotas metabólicas envolvidas na produção de ácido láctico por bactérias ácido-láticas a partir de diferentes fontes de carbono (Fonte: CUBAS-CANO et al., 2018). (1) hexoquinase, (2) arabinose isomerase, (3) ribulocinase, (4) xilose isomerase, (5) xylulocinase, (6) glicose-6-P isomerase, (7) 6- fosfofructoquinase, (8) frutose-bifosfato aldolase, (9) triose-fosfato isomerase, (10) gliceraldeído-3-P desidrogenase, (11) fosfoglicerato cinase, (12) fosfoiglicérida mutase (13) enolase, (14) piruvato quinase, (15) lactato desidrogenase, (16) glicose-6-fosfato desidrogenase, (17) 6-fosfogluconato desidrogenase, (18) ribulose-5-fosfato-3-epimerase, (19) fosfoketolase, (20) acetato quinase, (21) fosfotransacetilase, (22) aldeído desidrogenase, (23) álcool desidrogenase, (24) transcetolase, (25) transaldolase.

O isolamento de bactérias ácido-láticas de ambientes extremos é também uma alternativa, uma vez que são microrganismos capazes de crescer em condições extremas, resistindo a condições de estresse e com alta produtividade (PAPADIMITRIOU et al., 2016). Para o uso de um microrganismo em um processo industrial é interessante que ele seja capaz de suportar diferentes condições de estresse (ABDEL-RAHMAN; SONOMOTO, 2016; ISIKGOR; BECER, 2015; REDDY et al., 2016).

Na Tabela 1 são listados alguns estudos nos quais os autores empregaram diferentes espécies de LAB, utilizando diferentes técnicas e tipos de biomassa para a produção de ácido láctico. É importante ressaltar que os resultados obtidos em cada estudo são diretamente influenciados pela escolha do microrganismo, substrato, técnica de hidrólise e tipo de processo empregado. Estudos em que são empregados meios de cultura mais complexos, como hidrolisados de materiais lignocelulósicos, tendem a render resultados inferiores quando comparados a estudos que utilizem meios de cultura contendo carboidratos simples. Isso pode ser devido a diversos fatores, como a presença de compostos inibitórios, alta pressão osmótica, baixa concentração de nitrogênio, entre outros fatores.

O uso de microrganismos isolados em processos biotecnológicos tem sido exaustivamente estudado e recomendado, pois permite uma avaliação do processo, além de reduzir os riscos de contaminação e garantir a qualidade do produto. No entanto, o uso de coculturas pode ser uma alternativa interessante, principalmente quando se trata de substratos complexos (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a; BADER et al., 2010; CUBAS-CANO et al., 2018; JUTURU; WU, 2016). Um exemplo disso é a utilização de microrganismos hidrolíticos juntamente com LAB em processos de sacarificação e fermentação simultânea. Outro exemplo é a utilização de coculturas com linhagens de LAB heterofermentativas e homofermentativas, podendo dessa forma consumir todas as hexoses e pentoses do meio. Um exemplo disso é um cocultivo realizado em um estudo recente com hidrolisado de palha de milho, no qual *L. rhamnosus* produziu ácido láctico a partir da glicose presente no meio via rota EMP, enquanto *L. brevis* foi responsável pelo consumo de xilose via rota PK para produção dos ácidos láctico e acético (CUI; LI; WAN, 2011). O rendimento final foi de aproximadamente 19 % e 30 % superiores aos cultivos separados de *L. rhamnosus* e *L. brevis*, respectivamente.

Tabela 1. Produção de ácido láctico a partir de diferentes substratos e espécies de LAB (Traduzido e adaptado de Cubas-Cano et al., 2018 e Alves de Oliveira et al., 2019)

Microorganismo	Substrato	Produto	Técnica	Ácido Láctico [g·L ⁻¹]	Qp [g·(L·h ⁻¹)]	Y _{p/s} [g·g ⁻¹]	Referência
<i>L. pentosus</i> ATCC 8041	Palha de milho	Ácido Láctico	Bat. alimentada	74,80	0,7	0,65	(ZHU; LEE; ELANDER, 2007)
<i>L. rhamnosus</i> B103	Lactose de soro	L-(+)-Ácido Láctico	Batelada	57,00	1,18	-	(BERNARDO et al., 2016)
<i>L. rhamnosus</i> B103	Lactose de soro	L-(+)-Ácido Láctico	Bat. alimentada	67,00	1,77	-	(BERNARDO et al., 2016)
<i>L. rhamnosus</i> B103	Lactose de soro	L-(+)-Ácido Láctico	Bat. pH stat ^a	143,7	1,17	-	(BERNARDO et al., 2016)
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	Polpa de madeira	D(-)-Ácido Láctico	Batelada	102,30	2,29	0,88	(HAMA et al., 2015)
<i>L. plantarum</i>	Melaço de cana-de-açúcar	Ácido Láctico	Agitador orbital	76,08	3,17	0,88	(DE OLIVEIRA; FILHO; ROSSELL, 2016)
<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826	Palha de milho	D(-)-Ácido Láctico	Agitador orbital	29,4	0,82	0,73	(ZHANG et al., 2016)
<i>L. pentosus</i> FL0421	Palha de milho	Ácido Láctico	Bat. alimentada	92,30	1,92	0,66	(HU et al., 2016)
<i>L. casei</i> TISTR 390	Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido Láctico	Batelada	21,3	0,18	-	(OONKHANOND et al., 2017)
<i>L. paracasei</i>	Vinhaça de bioetanol	Ácido Láctico	Agitador orbital	79,02	0,82	-	(MLADENOVIĆ et al., 2018)
<i>L. casei</i> G-02	Alcachofra de Jerusalém	L-(+)-Ácido Láctico	Agitador orbital	141,50	4,70	0,96	(GANDOLFI et al., 2015)
<i>Lactobacillus</i> sp. G-02 e <i>Aspergillus niger</i> SL-09	Alcachofra de Jerusalém	L-(+)-Ácido Láctico	Cocultura SSF ^b	120,60	3,35	0,95	(GE; QIAN; ZHANG, 2009)

^aTécnica de batelada com alimentação de substrato baseada na variação de pH

^bSacarificação e fermentação simultânea

A utilização de biologia molecular é uma forma de alterar a genética dos microrganismos para, por exemplo, suportarem situações de estresse. Uma das opções é a troca de genes chave do metabolismo dessas bactérias, fazendo uma linhagem heterofermentativa se tornar homofermentativa, por exemplo (OKANO et al., 2009). Um estudo recente fez essa modificação do genoma de uma linhagem de *L. rhamnosus* atingindo com a linhagem geneticamente modificada uma produção de ácido láctico 34 % superior em comparação com a linhagem nativa (GUO et al., 2014). Outras estratégias interessantes seriam modificar genes responsáveis pela seletividade de enzimas envolvidas na produção de estereoisômeros puros, ou ainda modificar genes responsáveis pelo consumo de pentoses, de forma a aumentar a capacidade de consumo desses açúcares pelos microrganismos e esgotar todos os açúcares disponíveis no meio (YOSHIDA et al., 2011). Alternativamente, podem ser utilizados também microrganismos que não são LAB para produzir ácido láctico, modificando o seu genoma (ASO et al., 2019; PARRA-RAMÍREZ; MARTINEZ; CARDONA, 2019; WANG et al., 2013).

2.5. Condições de processo

Industrialmente, o ácido láctico é produzido através do método de fermentação em batelada. No entanto, a produção de ácido láctico vem sendo estudada também nas técnicas de batelada alimentada e fermentação contínua. Os cultivos podem ser realizados de diferentes formas: hidrólise (sacarificação) seguida de cultivo (SHF) e sacarificação e fermentação simultânea (SSF) ou sacarificação e co-fermentação simultânea (SSCF) (CUBAS-CANO et al., 2018). No processo de SSCF, a hidrólise e o processo fermentativo ocorrem simultaneamente no mesmo vaso, o que implica a necessidade de microrganismos que realizem a hidrólise da biomassa e a produção de ácido láctico no mesmo processo (GE; QIAN; ZHANG, 2009). Este tipo de fermentação é utilizado com o objetivo de reduzir os custos envolvidos no processo. No entanto, a principal desvantagem é a dificuldade em encontrar condições de processo ideais para que ambas as etapas sejam realizadas simultaneamente de forma eficiente (BADER et al., 2010; OLOFSSON; BERTILSSON; LIDÉN, 2008).

A forma mais comum de produção de ácido láctico é por cultivo submerso em batelada (BERNARDO et al., 2016). O rendimento de produção de ácido láctico nesse caso pode chegar a 90-95 % (m/m) em relação aos açúcares no início do processo (GHAFAR et al., 2014). Durante a fermentação láctica, os principais parâmetros que devem ser levados em consideração são: pH, temperatura, concentração inicial de substratos e concentração de nitrogênio. Esses

parâmetros influenciam diretamente na eficiência e produtividade do processo (ABDEL-RAHMAN; SONOMOTO, 2016; ZHOU et al., 2003).

A maioria das bactérias ácido-láticas são capazes de tolerar pH ácido e conseguem continuar crescendo com o acúmulo de ácido lático no meio de cultura. No entanto, a exposição prolongada à forma protonada do ácido lático pode modificar sua fisiologia e seu metabolismo. Uma vez que a concentração de ácido lático intracelular aumenta, a membrana celular se rompe, resultando em morte celular (ABDEL-RAHMAN; SONOMOTO, 2016; NAKANO; UGWU; TOKIWA, 2012). Uma forma de contornar esse problema é encontrar um pH ótimo de cultivo e controlar o mesmo com agentes neutralizantes ou diminuindo a quantidade de ácido lático solúvel. Na literatura são relatados como agentes neutralizantes mais comuns em fermentações láticas o hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de amônio (NH₄OH) e o hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂). Segundo apontam alguns estudos, o tipo de solução alcalina utilizada pode influenciar diretamente na produção de ácido lático e na produtividade do processo (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018b). Altas concentrações de NaOH no meio podem contribuir para um aumento da pressão osmótica do meio de cultura, podendo gerar uma condição de estresse e afetar negativamente o processo (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018b; OUYANG et al., 2013; TIAN et al., 2014). Já utilizando hidróxido de cálcio, por exemplo, o meio será neutralizado formando lactato de cálcio, que é pouco solúvel no meio, não impactando na pressão osmótica, o que pode contribuir para um aumento da produção de ácido lático (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018b; NAKANO; UGWU; TOKIWA, 2012; VAN DER POL; EGGINK; WEUSTHUIS, 2016; YE et al., 2013). Porém, não é possível obter soluções concentradas de Ca(OH)₂ devido à baixa solubilidade desse reagente, o que faz com que seja necessário um volume maior desse agente neutralizante. Além disso, uma vez que o lactato de cálcio é pouco solúvel, isso dificulta na análise deste composto por metodologias convencionais.

Devido ao fato de que a maioria dos processos de produção de ácido lático serem empregadas bactérias ácido-láticas, a temperatura utilizada no processo varia bastante. Diferentes linhagens podem ter a sua produção ótima de ácido lático em temperaturas bastante diferentes, podendo variar de 5 °C a 45 °C (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a; CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Bactérias ácido-láticas geralmente tem preferência pelo consumo de glicose, o que faz com que normalmente ocorra consumo sequencial dos açúcares presentes no meio (ABDEL-RAHMAN et al., 2015). Em hidrolisados contendo hexoses e pentose, os outros açúcares

normalmente não serão consumidos enquanto a concentração de glicose não tiver diminuído consideravelmente (ABDEL-RAHMAN; SONOMOTO, 2016; CUBAS-CANO et al., 2018). Essa repressão catabólica é causada pela ativação da via glicolítica, inibindo a expressão de genes envolvidos no metabolismo de outros açúcares.

A composição do meio de cultura é também um fator crucial para a produção de ácido láctico. Altas concentrações de açúcares podem causar inibição pelo substrato, reprimindo o crescimento celular devido à alta pressão osmótica, o que reduz a atividade de água, provocando lise celular. Por conta disso, a concentração dos açúcares disponíveis no meio para produção de ácido láctico acaba sendo uma limitação no processo (ABDEL-RAHMAN; SONOMOTO, 2016; BERNARDO et al., 2016). Dessa forma, a aplicação de técnicas como a batelada alimentada e o cultivo contínuo podem representar boas alternativas para evitar a inibição por substrato e aumentar o título e a produtividade de ácido láctico obtidos no processo (CUBAS-CANO et al., 2018). A utilização de microrganismos resistentes ao estresse osmótico ou ainda a suplementação do meio com osmoprotetores, como a betaína, são possíveis soluções recentemente reportadas (GE et al., 2011; YU et al., 2008; ZOU et al., 2013)

A relação carbono/nitrogênio é um aspecto fundamental para a conversão dos açúcares disponíveis no meio de cultivo em ácido láctico (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018a; CUBAS-CANO et al., 2018). Além disso, outra consideração importante sobre as LAB é que elas demandam uma ampla variedade de vitaminas e minerais para manutenção do crescimento celular e produção de ácido láctico. A inclusão de fontes de nitrogênio complexas, como o extrato de levedura, normalmente reflete bons resultados na produção de ácido láctico, uma vez que auxilia no crescimento celular e, por consequência, na produção de ácido láctico, uma vez que esse metabólito é parcialmente associado ao crescimento celular. Os bons resultados obtidos pela adição de extrato de levedura se devem possivelmente à presença de diversas vitaminas, minerais, aminoácidos, entre outros nutrientes que ficam disponíveis no meio para assimilação pelo microrganismo (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018b; WANG; TASHIRO; SONOMOTO, 2015).

Alguns estudos já relataram a possibilidade de se produzir títulos elevados de ácido láctico em condições não-estéreis (GANDOLFI et al., 2015; HU et al., 2016; WATANABE et al., 2013). Dessa forma, o custo do processo diminui, uma vez que não são necessários equipamentos para esterilização, reduzindo também consumo de energia.

A separação e a purificação de ácido láctico a partir dos caldos fermentativos é um dos pontos mais críticos do processo. Essas etapas são de suma importância, visto que muitas

aplicações industriais exigem um produto de alta pureza. Em geral, os custos envolvidos na separação e purificação de bioprodutos, incluindo o ácido láctico, representa de 20 % a 50 % dos custos de operação do processo (LÓPEZ-GARZÓN; STRAATHOF, 2014; RAMASWAMY; HUANG; RAMARAO, 2013).

3. Materiais e Métodos

3.1. Microrganismos e Inóculo

Na etapa de seleção, foram cultivadas diferentes espécies de bactérias ácido-láticas que se encontram na Coleção de Culturas do BiotecLab (Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFRGS), para avaliar o potencial de produção de ácido lático por estes microrganismos nos hidrolisados da casca de soja. As linhagens de bactérias ácido-láticas utilizadas foram: *Lactobacillus plantarum* BL011, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. maltaromicus*, *Lactobacillus* spp. e um consórcio comercial de bactérias probióticas liofilizadas (*L. paracasei* SD5275, *L. rhamnosus* SD 5674, *L. acidophilus* SD5221 e *Bacillus lactis* SD5674). Estoques de todas as linhagens foram mantidos em meio de manutenção contendo 50 % em volume de caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) para crescimento de *Lactobacillus* e 50 % de glicerol, em ultrafreezer a -80 °C para manter a viabilidade celular. Os estoques de todos os microrganismos foram realizados a partir de uma colônia isolada pela técnica de esgotamento em ágar MRS, transferência para MRS líquido e crescidos em microaerofilia em agitador orbital a 37 °C e 120 rpm até o final da fase exponencial (DO=1 medida em espectrofotômetro a 600 nm). As células foram então centrifugadas (3500 g, 4 °C, 15 min) e ressuspensas diretamente no meio de manutenção.

Após selecionada a linhagem que apresentou o melhor resultado, *Lactobacillus plantarum* BL011 isolada de queijo Serrano por Souza et al. (2003), foi realizado também um estoque liofilizado deste microrganismo. Neste processo, essa linhagem foi incubada em agitador orbital em caldo MRS a 37 °C e 120 rpm até atingir DO=1. Após, as células foram centrifugadas (3500 g, 4 °C, 15 min), descartando-se o sobrenadante. As células foram então ressuspensas em meio para liofilização estéril (100 g·L⁻¹ de leite em pó, autoclave por 20 min a 110 °C), transferindo alíquotas de 2 mL dessa suspensão celular em frascos para liofilização com tampa de borracha, cobertos com papel alumínio. Esses frascos foram congelados em *ultrafreezer* a -80 °C por 1 h e, por fim, foram imediatamente colocados no equipamento de liofilização à vácuo para desidratação.

Para os experimentos realizados em agitador orbital (*shaker*), os pré-inóculos foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL com 100 mL de meio MRS líquido, contendo 20 µL do estoque do microrganismo em glicerol. Os pré-inóculos foram então incubados em agitador

orbital a 37 °C e 120 rpm por aproximadamente 12 h para atingir uma densidade ótica (DO) aproximadamente 1, medida em espectrofotômetro a 600 nm. Esse método padrão é utilizado para que se tenha sempre aproximadamente a mesma concentração celular no inóculo. Para os experimentos em biorreatores, os pré-inóculos foram realizados em agitador orbital nas mesmas condições, em Erlenmeyers de 500 mL contendo 150 mL de caldo MRS e 20 µL do estoque em glicerol.

Após atingir DO=1, as células foram centrifugadas em tubos Falcons estéreis a 3500 g e 4 °C por 15 min, descartando-se o sobrenadante. Para os experimentos realizados em agitador orbital, as células foram ressuspensas no mesmo volume de hidrolisado para então ser realizado o inóculo. Já nos experimentos em biorreatores, as células foram ressuspensas no meio de suplementação selecionado após o planejamento experimental. O inóculo foi realizado em todos os casos com 10 % do volume total de trabalho.

3.2. Hidrolisados da Casca de Soja

A casca de soja utilizada nesse estudo foi provida por uma indústria de processamento do grão de soja, localizada na região metropolitana de Porto Alegre, RS. O pré-tratamento de hidrólise ácida diluída da casca de soja *in natura* foi realizado em autoclave a 121 °C e 1 kgf·cm⁻² por 40 min, com 1% em volume de ácido sulfúrico (H₂SO₄) na relação sólido:líquido de 1:10, conforme metodologia descrita por Cassales et al. (2011). Após, as frações líquida e sólida foram separadas por filtração, sendo a parte líquida (hidrolisado) armazenada para posterior utilização, enquanto a parte sólida resultante foi lavada para remover o excesso de ácido e utilizada na etapa de hidrólise enzimática. Esta fração foi então incubada em agitador orbital a 50 °C e 120 rpm por 96 h, em tampão citrato de sódio 1 M e pH 4,8 em uma relação sólido-líquido de 1:20, contendo uma concentração de 15 FPU·g⁻¹ da enzima comercial Novozymes CELLUCLAST® 1.5 L, segundo metodologia descrita por Cortivo et al. (2018).

Ambos os hidrolisados foram concentrados em concentrador à vácuo a uma temperatura de 60 °C de forma a aumentar a concentração inicial de açúcares no meio evitando a formação de compostos inibidores formados pela degradação dos açúcares. Após, tiveram seu pH ajustado com hidróxido de sódio (NaOH) para próximo de 6,5, centrifugados a 4 °C e 8000 g por 15 min e esterilizados em autoclave por 30 min a 60 °C e 0,5 kgf·cm⁻² para então serem utilizados nos ensaios de fermentação.

3.3. Ensaios de fermentação em agitador orbital

Na etapa de seleção dos microrganismos foram testadas algumas variáveis de processo e, ao mesmo tempo, foi avaliado o desempenho das linhagens testadas para selecionar apenas uma linhagem para realizar os posteriores ensaios de fermentação nos biorreatores de cultivo submerso.

No Experimento 1, foram cultivadas todas as linhagens em fermentações de 48 h, utilizado apenas hidrolisado proveniente do tratamento ácido, de forma a avaliar a viabilidade do processo com concentrações iniciais de açúcares de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. No Experimento 2, foram avaliadas as condições de anaerobiose (frascos vedados com rolha de silicone) e microaerofilia (frascos vedados com bucha de algodão). Neste experimento, foi utilizada uma mistura de hidrolisados ácido e enzimático, ambos concentrados a $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em seus conteúdos de açúcar e misturados em igual volume, cultivando os microrganismos por 48 h. No Experimento 3, a produção de ácido lático foi avaliada em cinéticas de 96 h. A partir do Experimento 3, foi utilizado em todos os experimentos posteriores (planejamento experimental, controle e todos os biorreatores) uma mistura de hidrolisados ácido e enzimático concentrados a $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares, mas misturados de forma a obter uma concentração similar de glicose e de xilose.

Todos os ensaios de fermentação em agitador orbital deste item foram realizados em frascos Erlenmeyer, com *headspace* de 2:5, incubados em agitador orbital a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 120 rpm, sem controle de pH. O pH inicial de todos os cultivos foi de aproximadamente 6,0. Amostras foram coletadas em intervalos pré-estabelecidos para medir o pH durante o cultivo e realizar posteriores análises de consumo de substratos e formação de produtos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.4. Planejamento Plackett-Burman

Foi realizado um planejamento experimental Plackett-Burman com uma triplicata no ponto central com o objetivo de avaliar a influência da temperatura de cultivo e da suplementação do hidrolisado da casca de soja com Extrato Bruto de Levedura (EBL), sulfato de manganês (MnSO_4) e sulfato de magnésio (MgSO_4). Os níveis referentes a cada uma das variáveis estudadas, assim como a codificação de cada uma das variáveis, estão descritos na

Tabela 2. O planejamento experimental foi realizado em cultivos de 48 h, utilizando sempre o mesmo agitador orbital, a 120 rpm e alternando as temperaturas.

Após a análise estatística dos resultados obtidos na etapa de planejamento experimental, foi realizada uma etapa controle, de forma a avaliar se o resultado obtido no planejamento foi de fato significativo e, de posse desses resultados, poder definir corretamente as variáveis para o seguimento do estudo. Foram realizados experimentos em duplicata, testando as variáveis que tiveram efeito significativo no resultado da análise estatística do planejamento. Essas fermentações foram realizadas por 48 h em agitador orbital a 120 rpm.

Tabela 2. Níveis das variáveis utilizadas na matriz de planejamento.

Variável	Cod. *	-1	0	+1
Temperatura (°C)	x1	30	34	38
Extrato bruto de levedura (g·L ⁻¹)	x2	0	7,5	15
MnSO ₄ (g·L ⁻¹)	x3	0	0,15	0,3
MgSO ₄ (g·L ⁻¹)	x4	0	0,05	0,1

*Cod: variável codificada.

3.5. Experimentos em Biorreatores

Para os cultivos submersos em biorreatores, foram utilizados vasos de 2,0 L (modelo Biostat B, *Braun Biotech International*, Melsungen, Alemanha), com 1,5 L de volume de trabalho. Todos os testes em biorreatores foram realizados em duplicata, na temperatura de 30 °C e com agitação de 300 rpm. Para ajuste do pH inicial do hidrolisado utilizado como meio de cultivo, assim como para o ajuste automático do pH nos cultivos com pH controlado, foram utilizados NaOH 10 M e H₃PO₄ 5 M.

Em todos os experimentos realizados em biorreatores, a mistura de hidrolisados utilizada como meio de cultivo foi suplementada, conforme resultado obtido no planejamento experimental Plackett-Burman.

3.5.1. Batelada

Nos cultivos do tipo batelada, foram avaliadas as condições de aeração e controle do pH do meio de cultivo. Foram realizados um cultivo em anaerobiose (sem adição de oxigênio no meio) e um cultivo com a aeração de 1 vvm (adição de 1 litro de ar por litro de meio de cultivo), ambos com pH inicial 6,0, sem controle do mesmo. Não foi possível calibrar o eletrodo de oxigênio no cultivo aerado devido às condições dos hidrolisados, não sendo possível, dessa forma, calcular o coeficiente de transferência de oxigênio, o $k_L a$. Uma vez selecionada a melhor condição, foi testado o controle do pH do meio em 6,0.

3.5.2. Batelada Alimentada

Uma vez obtido o melhor resultados nos biorreatores batelada, foram realizadas estratégias de batelada alimentada. Nesses experimentos, foi utilizada a condição de anaerobiose e o pH do meio de cultura foi controlado em 6,0 durante todo o processo, mantendo os demais parâmetros utilizados nos biorreatores batelada. Para os cultivos em biorreatores do tipo batelada alimentada, foram testadas duas estratégias de alimentação linear, ambas com alimentação de 400 mL de hidrolisado enzimático: uma com 12 h e outra com 24 h de alimentação. Em todos os experimentos de batelada alimentada a alimentação do meio de cultura iniciou após 24 h do início do processo.

Foi utilizado como meio de alimentação o hidrolisado enzimático, uma vez que este possui uma composição mais rica em glicose. Este hidrolisado foi concentrado de forma a obter um meio de alimentação mais rico em açúcares. Nos dois primeiros experimentos, foi utilizado hidrolisado enzimático com uma concentração de açúcares de $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, suplementado da mesma forma que o hidrolisado utilizado como meio de cultura nos biorreatores.

Por fim, após uma nova tentativa de obter um hidrolisado mais rico em açúcares, foi realizada uma terceira batelada alimentada com 12 h de alimentação, com um hidrolisado enzimático contendo $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares, também suplementado.

Não foi possível calcular a taxa de alimentação a partir da velocidade específica de crescimento, já que as medidas de biomassa não puderam ser realizadas com precisão, em virtude da natureza do hidrolisado. Isso impediu que fossem obtidos alguns parâmetros importantes como a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$). Dessa forma, foi calculado o consumo médio de açúcares (em $\text{g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$) de acordo com a evolução do consumo destes

durante o período de produção exponencial de ácido láctico. Baseado nesse consumo de açúcares, calculou-se uma velocidade de alimentação de hidrolisado a partir da equação (1):

$$F = at + b \quad (1)$$

Onde F é a vazão de alimentação de hidrolisado, em $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a e b são constantes de alimentação. Para a estratégia utilizando hidrolisado enzimático com concentração de açúcares de $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a constante b foi definida em $0,15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, e a constante a foi de $6,76 \times 10^{-2}$ e $1,06 \times 10^{-2} \text{ mL}\cdot\text{min}^{-2}$ para as estratégias de 12 h e 24 h de alimentação, respectivamente. Para a estratégia utilizando hidrolisado enzimático com concentração total de açúcares de $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, a constante b foi definida em $0,10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a constante a foi de $7,59 \times 10^{-2} \text{ mL}\cdot\text{min}^{-2}$. Essas constantes foram calculadas com base no tempo de alimentação determinado, o volume de meio a ser alimentado e a concentração de açúcares presentes no mesmo.

3.6. Métodos Analíticos

As concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido acético e ácido cítrico) foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando equipamento da marca Shimadzu, Japão. Para serem analisadas, as amostras foram centrifugadas (3500 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 min), separando-se o sobrenadante. As amostras foram diluídas na proporção 1:10 em água destilada e filtradas utilizando membranas de acetato de celulose (Sartorius, Alemanha) com poro de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$.

A análise dos compostos presentes nas amostras foi estimada pela injeção de $20 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra no CLAE, utilizando detector de índice de refração (RID-10A) e coluna Aminex HPX-87H ($300 \times 7,8 \text{ mm}$, Bio-Rad, EUA). Como fase móvel foi utilizada uma solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 0,005 \text{ M}$, a um fluxo de $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a uma temperatura de $45 \text{ }^\circ\text{C}$, com tempo de corrida de 23 min .

Devido às características dos hidrolisados, não foi possível realizar a técnica de gravimetria por peso seco para avaliação do crescimento celular. Além disso, a técnica de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) também se mostrou ineficiente, pois apresentou resultados incoerentes. Portanto, esses dados não serão apresentados neste trabalho.

A análise estatística do planejamento experimental foi realizada com o software Statistica 12 (StatSoft Inc., São Paulo, Brasil). A análise estatística dos demais experimentos

foi analisada também pelo software Statistica 12, utilizando análise de variância (ANOVA) e teste Tukey a um nível de 5 % de significância.

O parâmetro cinético de produtividade (Q_p , $g \cdot (L \cdot h)^{-1}$) foi obtido pela razão entre o título de ácido lático e o tempo de cultivo.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização dos hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja

O pré-tratamento da casca de soja com ácido diluído é responsável por separar a matriz lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar os açúcares presentes na fração de hemicelulose da biomassa, liberando principalmente pentoses. Após o tratamento ácido da casca de soja *in natura*, a fração sólida resultante é então submetida a um tratamento enzimático. Este tratamento é responsável por hidrolisar a fração de celulose, liberando uma grande quantidade de glicose. A concentração média dos açúcares detectáveis por HPLC nos hidrolisados obtidos logo após o processo de hidrólise se encontram na Tabela 3. Esses valores são referentes à média dentre todos os hidrolisados produzidos. Esses hidrolisados foram posteriormente concentrados em concentrador à vácuo conforme descrito no item 3.2 da metodologia.

A presença de xilose no hidrolisado enzimático se deve à hidrólise da hemicelulose remanescente na casca proveniente do pré-tratamento ácido, o que acaba por aumentar o grau de hidrólise total da biomassa. É importante ressaltar que a casca de soja é um subproduto do processamento industrial do grão de soja e, portanto, pode sofrer variações na sua composição de acordo com a época de plantio, o clima, o solo, tecnologia de processamento, entre outros fatores. Dessa forma, a composição dos hidrolisados sofre uma variabilidade inerente à sua origem.

Tabela 3. Composição média dos açúcares analisados nos hidrolisados da casca de soja, em g·L⁻¹.

Açúcares	Hidrolisado ácido	Hidrolisado enzimático
Glicose	1,22±0,22	12,75±1,18
Xilose	6,29±1,42	1,99±0,69
Arabinose	4,56±0,46	nd *
Totais	12,07±2,03	14,75±1,74

* não detectado

A pressão osmótica média dos hidrolisados utilizados nos experimentos (pontos iniciais) foi de $2344,54 \pm 167,27$ mOsm \cdot kg $^{-1}$. Esse valor de pressão osmótica é bastante elevado e é devido principalmente à concentração de açúcares nos hidrolisados e pela grande quantidade de hidróxido de sódio necessária para neutralizar ambos os hidrolisados. O hidrolisado ácido possui pH muito baixo. Apesar de ser uma técnica com ácido diluído (1 % em volume), esse hidrolisado é concentrado, o que aumenta ainda mais a concentração de íons H $^{+}$ em solução. O hidrolisado enzimático é um meio tamponado, portanto também é necessária uma grande quantidade de base para que o pH seja ajustado de aproximadamente 4,8 para 6,0. Além disso, é necessário que o pH seja ajustado para um valor um pouco acima de 6,0, pois o hidrolisado sempre sofre uma queda de pH no processo de esterilização em autoclave. Apesar de a arabinose não ser consumida pelas linhagens cultivadas nos ensaios de fermentação do presente estudo, este açúcar foi contabilizado no valor de açúcares iniciais dos hidrolisados, visto que também contribui para o aumento da pressão osmótica.

Poucos microrganismos são capazes de suportar um estresse osmótico elevado e mesmo assim serem capazes de desenvolver o seu metabolismo, o que minimiza a possibilidade de contaminação e mostra a robustez dos microrganismos avaliados nesse estudo. Foram analisados também outros compostos presentes em menor concentração nos hidrolisados. Foi detectada a presença de ácido acético e ácido fórmico nos hidrolisados utilizados nos cultivos, o que é esperado, uma vez que são compostos formados pela degradação de compostos gerados durante o processo de hidrólise. A concentração desses compostos em ambos os hidrolisados é bem baixa, com valores abaixo do limite de quantificação (inferiores a 1 g \cdot L $^{-1}$) após os processos de concentração, neutralização e esterilização.

Cassales et al. (2011) e Cortivo et al. (2018) determinaram em seus estudos a composição da casca de soja e as melhores condições de hidrólise para a casca de soja, visando um alto teor de açúcares hidrolisados e baixo teor de compostos inibidores, que podem ser formados pela degradação de açúcares e da lignina. Dependendo das condições de hidrólise utilizadas, é possível obter uma concentração de açúcares ainda mais elevada, porém são condições mais severas e acarretam a formação de compostos tóxicos que podem inibir o crescimento celular. Apesar disso, Oliveira et al. (2018) utilizaram em seu estudo a linhagem *L. plantarum* CCT 3751 para detoxificação de hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar, demonstrando a capacidade desse microrganismo de não apenas sobreviver em um meio com uma concentração mais expressiva desses compostos, como também de consumir os mesmos ao longo do cultivo.

4.2. Seleção de microrganismos

O Experimento 1 foi realizado utilizando apenas o hidrolisado proveniente do pré-tratamento ácido, de forma a analisar a viabilidade técnica do processo. Esse experimento foi realizado na condição de microaerofilia, utilizando duas diferentes concentrações iniciais de açúcares totais: 20 g·L⁻¹ (glicose 4,12±0,76 g·L⁻¹, xilose 10,07±1,59 g·L⁻¹, arabinose 6,64±0,68 g·L⁻¹) e 60 g·L⁻¹ (glicose 11,15±0,57 g·L⁻¹, xilose 29,75±1,17 g·L⁻¹, arabinose 18,52±0,57 g·L⁻¹). Nesta etapa foi analisada a capacidade das linhagens de converter os açúcares presentes no meio utilizado em ácido láctico em 48 h de cultivo, conforme consta na Tabela 4.

Tabela 4. Consumo de açúcares e título de ácido láctico no Experimento 1, após 48 h de cultivo, utilizando hidrolisado ácido da casca de soja com concentrações de 20 g·L⁻¹ e 60 g·L⁻¹ de açúcares.

Concentração de açúcares totais	Linhagem	Consumo de açúcares * (%)	Ácido Láctico * (g·L ⁻¹)
20 g·L ⁻¹	<i>L. plantarum</i> BL011	77,85±0,01% ^a	12,64±0,015 ^a
	<i>L. casei</i>	73,06±0,02% ^a	12,81±0,79 ^a
	<i>L. delbrueckii</i>	79,37±0,06% ^a	12,59±0,89 ^a
	<i>L. maltaromicus</i>	70,61±0,05% ^a	13,43±0,08 ^a
	<i>Lactobacillus</i> spp.	78,38±0,12% ^a	8,29±0,72 ^b
	Consórcio comercial	76,91±0,09% ^a	13,96±0,49 ^a
60 g·L ⁻¹	<i>L. plantarum</i> BL011	51,59±0,04% ^a	26,56±0,99 ^a
	<i>L. casei</i>	53,58±0,05% ^a	24,99±1,22 ^a
	<i>L. delbrueckii</i>	53,19±0,03% ^a	24,99±0,08 ^a
	<i>L. maltaromicus</i>	49,01±0,05% ^a	25,40±0,35 ^a
	<i>Lactobacillus</i> spp.	47,77±0,02% ^a	24,23±0,64 ^a
	Consórcio comercial	47,67±0,01% ^a	24,66±0,07 ^a

*Médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas diferentes em cada coluna indicam diferença estatísticas (p<0,05).

Os valores para açúcares consumidos foram tomados considerando apenas o consumo de glicose e de xilose, uma vez que as linhagens testadas neste estudo não apresentaram capacidade de consumir a arabinose presente no hidrolisado proveniente do tratamento ácido. No entanto, toda a glicose e boa parte da xilose foram consumidas por todas as linhagens. Não foram testadas concentrações maiores de açúcares, pois, como apresentado acima, os hidrolisados da casca de soja possuem uma elevada pressão osmótica, que aumenta conforme aumenta a concentração de açúcares no meio. Muitos estudos relatam que um aumento da concentração inicial de açúcares normalmente acarreta uma condição de estresse osmótico elevada, o que pode afetar negativamente o crescimento e metabolismo celular (ABDEL-RAHMAN et al., 2015; DE OLIVEIRA; FILHO; ROSSELL, 2016). Isso faz com que os microrganismos demandem mais tempo para consumirem os açúcares presentes no meio de cultura (ou até mesmo inibindo o consumo de açúcares), resultando em uma cinética muito mais lenta e muitas vezes terminando o cultivo sem o completo consumo dos substratos disponíveis. (CORTIVO et al., 2019)

Em todas as fermentações foi detectada uma produção próxima a $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido acético entre 24 h e 48 h de cultivo. Não foi detectada a produção de outros metabólitos comumente produzidos durante fermentações por bactérias ácido-láticas que são capazes de metabolizar pentoses (heterofermentativas). Estudos apontam que linhagens de LAB heterofermentativas facultativas podem utilizar vias metabólicas diferentes e produzir ácido lático sem necessariamente produzir metabólitos secundários.

O pH dos cultivos decaiu de forma muito semelhante em todos os experimentos, ficando com valor próximo a 4,3 ao final das fermentações. Essa redução do pH é devida à produção de ácido lático ao longo do cultivo, o que acaba causando uma condição de estresse e inibindo o crescimento celular, o consumo de açúcares e, conseqüentemente, a produção do próprio metabólito. Um comportamento parecido foi observado, por exemplo, no estudo de Solval et al. (2019), onde foram cultivadas diferentes linhagens de *Lactobacillus* utilizando diferentes fontes de carbono como substrato para a produção de ácido lático. Muitos autores recomendam diferentes estratégias para contornar este problema. Uma delas e a mais recorrente é realizar o controle do pH dos cultivos em biorreatores. No entanto, por haver muitas variáveis a serem definidas nessa etapa ainda preliminar do estudo, decidiu-se por continuar os experimentos em agitador orbital e sem controle de pH até que fossem definidas mais parâmetros e tivesse sido definida apenas uma linhagem, para então testar outros parâmetros que podem ser melhor avaliados nos experimentos realizados em biorreatores.

Fermentações para produção de ácido láctico usando-se coculturas ou associações de microrganismos muitas vezes produzem bons resultados, dependendo das linhagens que estão sendo utilizadas e há certa necessidade de se conhecer melhor o metabolismo de cada um dos microrganismos presentes. Em muitos casos, coculturas são capazes de consumir os açúcares com eficiência, combinando suas rotas metabólicas e aumentando a produção de ácido láctico (BADER et al., 2010; CUI; LI; WAN, 2011). No entanto, no presente estudo as coculturas utilizadas, *Lactobacillus* spp. e o consórcio comercial de Probióticos, não demonstraram benefício, uma vez tiveram desempenho inferior estatisticamente, ou não diferindo estatisticamente na produção de ácido láctico e no consumo de açúcares em relação às demais linhagens. Além disso, por serem conjuntos de bactérias ácido-láticas, não foi possível identificar qual microrganismo estava sendo determinante no processo. Para isso, seria necessário um estudo mais aprofundado e identificação e isolamento desses microrganismos. Portanto, para a próxima etapa, foram descartadas. Além disso, definiu-se continuar com a concentração de $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares totais para os próximos experimentos, uma vez que os microrganismos foram capazes de produzir boas concentrações de ácido láctico consumindo apenas metade dos açúcares disponíveis.

No Experimento 2, foi utilizada uma mistura de hidrolisados ácido e enzimático, ambos concentrados a $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares totais e misturados em igual volume (glicose $27,96\pm 2,12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, xilose $18,51\pm 1,42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Foram realizados cultivos de 48 h nas condições de anaerobiose e de microaerofilia, com resultados expressos na Tabela 5.

A partir da análise destes resultados, houve pouca ou nenhuma diferença estatística entre os experimentos em ausência de oxigenação e em microaerofilia. *L. plantarum* BL011 apresentou resultado um pouco superior para produção de ácido láctico na condição de anaerobiose, apesar de não apresentar diferença estatística. Normalmente, LAB crescem e produzem ácido láctico em condições anaeróbias, mas são classificadas como bactérias anaeróbias aerotolerantes, pois são capazes de crescer na presença de oxigênio. Por questão de conveniência, escolheu-se continuar os experimentos na condição de microaerofilia e testar essa variável futuramente nos experimentos em biorreatores. A linhagem *L. maltaromicus* teve desempenho inferior no consumo de açúcares em ambas as condições e, apesar de não ter diferença estatística na produção de ácido láctico, essa linhagem não foi utilizada no Experimento 3.

Tabela 5. Consumo de açúcares e título de ácido láctico obtido no Experimento 2, após 48 h de cultivo, em diferentes condições de disponibilidade de oxigênio.

Condição de aeração	Linhagem	Consumo de açúcares * (%)	Ácido Láctico * (g·L ⁻¹)
Anaerobiose	<i>L. plantarum</i> BL011	75,18±0,02% ^a	34,33±0,34 ^a
	<i>L. casei</i>	77,26±0,00% ^a	32,37±1,05 ^a
	<i>L. delbrueckii</i>	77,58±0,00% ^a	33,73±2,07 ^a
	<i>L. maltaromicus</i>	65,02±0,05% ^b	31,34±0,15 ^a
Microaerofilia	<i>L. plantarum</i> BL011	78,36±0,03% ^a	32,91±1,37 ^a
	<i>L. casei</i>	79,56±0,00% ^a	31,78±1,54 ^a
	<i>L. delbrueckii</i>	78,80±0,01% ^a	33,54±2,18 ^a
	<i>L. maltaromicus</i>	67,41±0,02% ^b	29,55±0,02 ^a

*Médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas diferentes em cada coluna indicam diferença estatísticas (p<0,05).

No Experimento 3 foram cultivadas as 3 linhagens remanescentes em agitador orbital por 96 h, de forma a avaliar com mais precisão a cinética destes microrganismos no hidrolisado. Foi utilizada uma mistura dos hidrolisados com uma concentração total de açúcares próximo a 60 g·L⁻¹, porém de forma a obter uma concentração inicial similar de glicose e xilose, 26,16±0,29 g·L⁻¹ e 22,98±0,63 g·L⁻¹, respectivamente. Decidiu-se realizar essa mistura dessa forma para que a concentração de glicose no meio não fosse muito maior do que a de xilose como no Experimento 2, por exemplo, em uma tentativa de evitar a repressão catabólica da xilose pela glicose. Como o hidrolisado enzimático tem uma concentração elevada de glicose, ao misturar os hidrolisados em igual volume, a concentração final de glicose na mistura seria sempre bastante superior à de xilose.

As cinéticas de consumo de açúcares e produção de ácido láctico pelas linhagens podem ser observadas nas Figura 3, Figura 4 e Figura 5. Na Figura 6 pode-se observar o perfil de decaimento do pH, que é muito semelhante em todas as fermentações.

Analisando os resultados obtidos pelo cultivo dos microrganismos no Experimento 3, notou-se que em todos os cultivos os microrganismos parecem passar por uma fase de adaptação nas primeiras 6 horas de cultivo e fase exponencial de produção de ácido láctico entre 6 h e 36 h de cultivo. Observa-se que a queda no pH ocorre simultaneamente à produção de ácido láctico por todas as linhagens, chegando próximo a 4,3, assim como ocorreu nos cultivos anteriores.

Através da análise dos gráficos, é possível observar também que o consumo de xilose pelas linhagens é muito mais lento do que o consumo de glicose. Por conta disso, é possível afirmar que ocorreu repressão catabólica da xilose pela glicose nesses experimentos. A estratégia de realizar uma mistura de hidrolisados de forma a obter uma concentração similar de glicose e xilose tinha como objetivo diminuir este efeito. Embora a xilose não tenha sido completamente consumida, neste experimento havia em média $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a mais de xilose no meio de cultura e a concentração final de xilose foi menor do que nos experimentos 1 e 2.

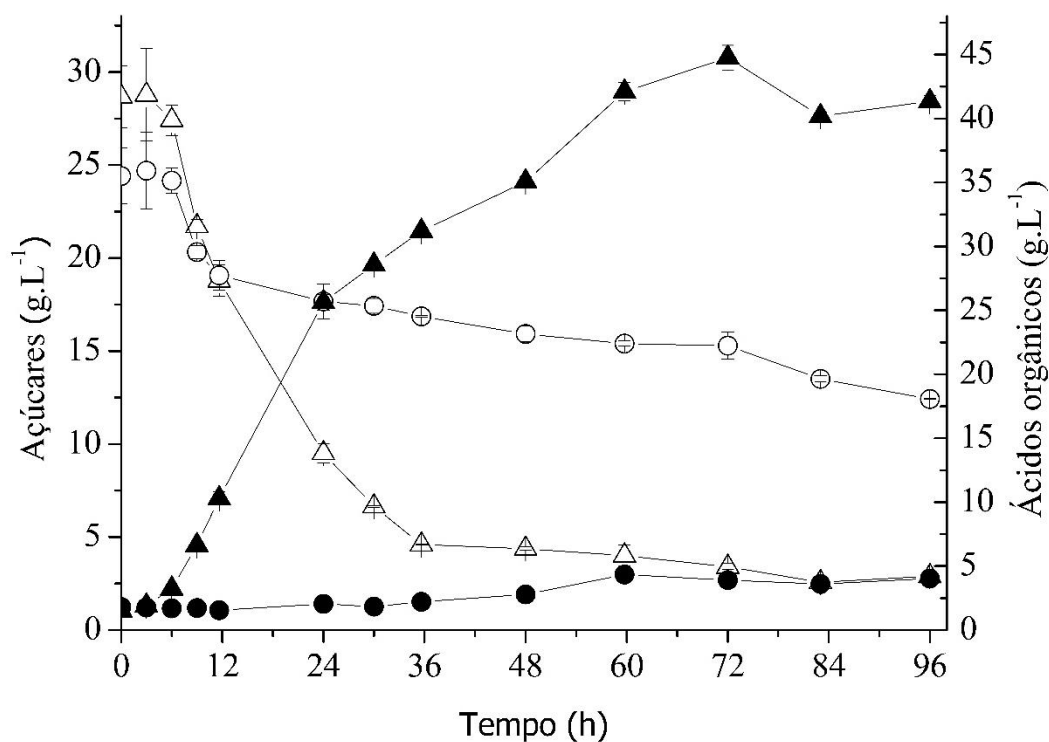


Figura 3. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem *L. plantarum* BL011 em mistura de hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja em agitador orbital a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e 120 rpm. Legenda: glicose (Δ), xilose (\circ), ácido láctico (\blacktriangle) e ácido acético (\bullet).

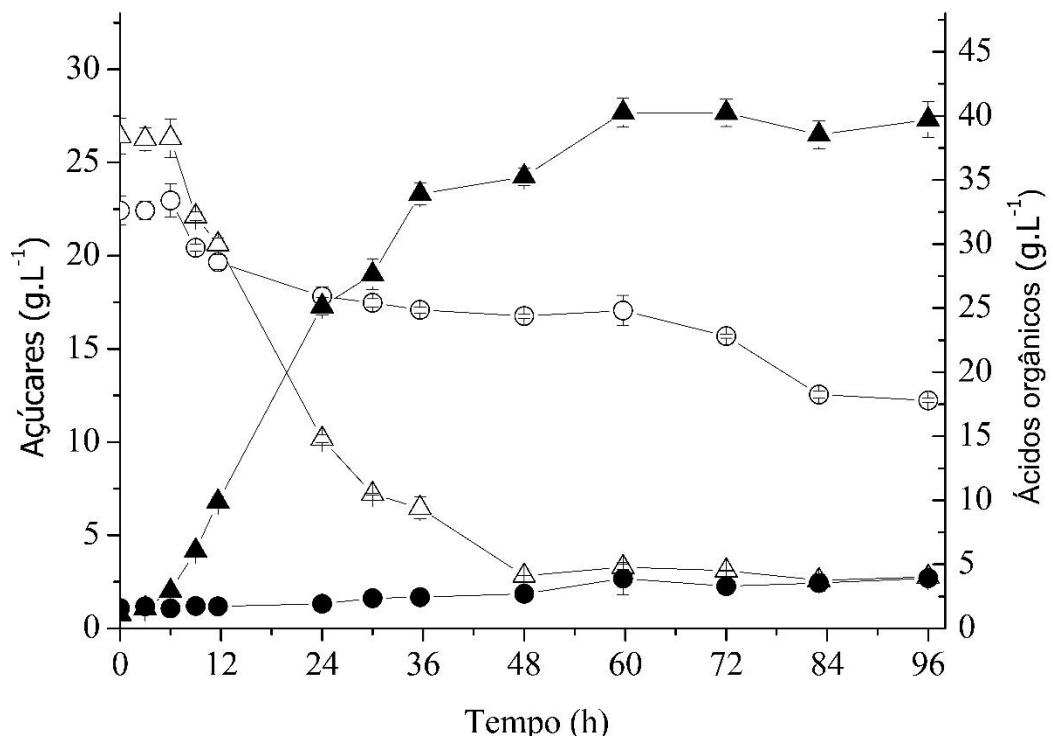


Figura 4. Cinética de produção de ácido lático pela linhagem *L. casei* em mistura de hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja em agitador orbital a 37 °C e 120 rpm. Legenda: glicose (Δ), xilose (\circ), ácido lático (\blacktriangle) e ácido acético (\bullet).

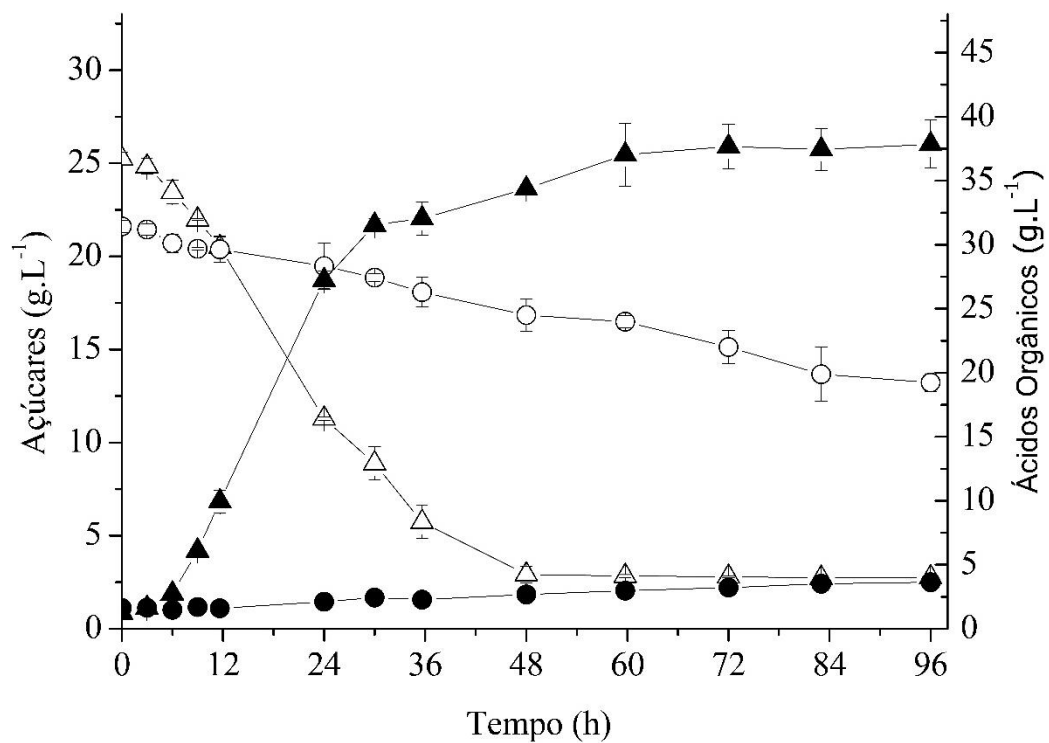


Figura 5. Cinética de produção de ácido lático pela linhagem *L. delbrueckii* em mistura de hidrolisados ácido e enzimático da casca de soja em agitador orbital a 37 °C e 120 rpm. Legenda: glicose (Δ), xilose (\circ), ácido lático (\blacktriangle) e ácido acético (\bullet).

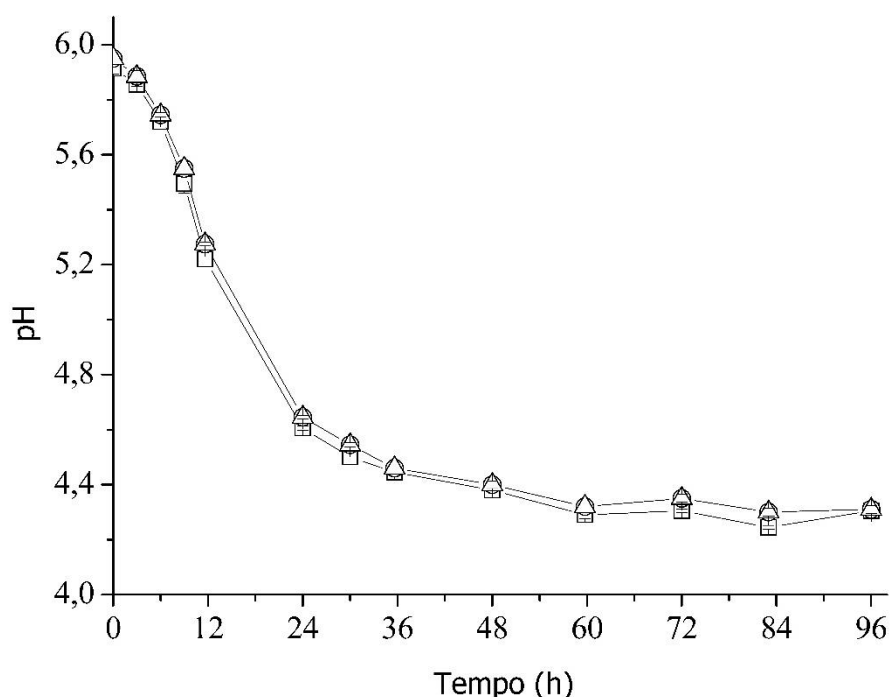


Figura 6. Perfil cinético do pH ao longo dos cultivos no Experimento 3. Legenda: *L. plantarum* BL011 (Δ), *L. casei* (○) e *L. delbrueckii* (□).

Apesar de as linhagens *L. casei* e *L. delbrueckii* visualmente apresentarem uma cinética ligeiramente mais rápida, o consumo de açúcares, a produção de ácido lático e a produtividade não apresentaram diferença estatística entre os microrganismos nos tempos de 24 h e de 48 h, como apresentado na Tabela 6. No entanto, o maior título de ácido lático foi obtido pela linhagem *L. plantarum* BL011, chegando a $43,27 \pm 0,63 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ após 72 h de cultivo. Este valor é estatisticamente superior ao máximo produzidos por *L. delbrueckii*, $36,44 \pm 1,71 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, no mesmo tempo de cultivo. Apesar de não poder afirmar que o resultado é superior ao obtido por *L. casei*, por conta de a linhagem já ter sido utilizada em outros trabalhos recentes e ter sido isolada no nosso grupo de pesquisa, foi selecionada para dar continuidade ao estudo a linhagem *L. plantarum* BL011, descartando-se as demais (COGHETTO et al., 2016; SOUZA; ROSA; AYUB, 2003).

Em seu estudo, Coghetto e colaboradores (2016) tiveram como objetivo tinham como objetivo otimizar a produção de células de *L. plantarum* BL011 em biorreatores utilizando como substrato um resíduo líquido de uma indústria de processamento de soja. Esse resíduo possui uma alta concentração de açúcares simples e complexos. Através de um planejamento experimental e de uma sequência de experimentos, os autores avaliaram o comportamento do microrganismo em diferentes condições. Apesar de o substrato em questão ser diferente do

utilizado no presente estudo, esse microrganismo demonstrou capacidade de desenvolver o seu metabolismo em um meio de cultura alternativo, produzindo aproximadamente 40 g·L⁻¹ de ácido láctico em 24 h de cultivo em biorreator de cultivo submerso, num experimento em que o resíduo (contendo 40 g·L⁻¹ de açúcares) passou por uma etapa de hidrólise e foi suplementado com extrato de levedura, sulfato de magnésio e sulfato de manganês.

É possível observar através da análise dos gráficos apresentados acima que há uma diferença inesperada para o balanço de massa dos cultivos ao se comparar a quantidade de açúcares consumidos e o ácido láctico produzido. Isso possivelmente se deve à presença de outras fontes de carbono no hidrolisado que estão sendo metabolizados pelas linhagens e que não estão sendo quantificados através da técnica de cromatografia que foi utilizada nesse estudo. Segundo apontam estudos na literatura, dependendo da linhagem, *L. plantarum* pode metabolizar de 15 a 25 diferentes fontes de carbono (SIRAGUSA et al., 2014).

Tabela 6. Análise do consumo de açúcares, produção de ácido láctico e produtividade pelas linhagens no Experimento 3.

Linhagem	Consumo de açúcares * (%)			Ácido Láctico * (g·L ⁻¹)			Qp * [g·(L·h) ⁻¹]		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>L. plantarum</i> BL011	45,74±0,00 ^a	59,43±0,02 ^a	62,67±0,00 ^a	24,15±0,29 ^a	33,57±0,70 ^a	43,27±0,63 ^a	1,01±0,01 ^a	0,70±0,01 ^a	0,60±0,01 ^a
<i>L. casei</i>	42,67±0,02 ^a	59,88±0,01 ^a	61,53±0,01 ^a	24,03±0,52 ^a	34,14±0,54 ^a	39,12±0,93 ^{ab}	1,00±0,02 ^a	0,71±0,01 ^a	0,54±0,01 ^{ab}
<i>L. delbrueckii</i>	40,72±0,01 ^a	59,29±0,02 ^a	63,06±0,01 ^a	26,02±0,66 ^a	33,15±0,14 ^a	36,44±1,71 ^b	1,011±0,02 ^a	0,69±0,00 ^a	0,51±0,02 ^b

*Média±desvio padrão;

Letras sobrescritas diferentes em cada coluna indicam diferença estatísticas (p<0,05).

4.3. Planejamento experimental

Em um estudo realizado recentemente no nosso grupo de pesquisa, Coghetto et al. (2016) cultivaram *L. plantarum* BL011 em biorreatores de cultivo submerso em batelada, com o objetivo de produzir biomassa celular. Em seu estudo, foi utilizado como substrato um resíduo proveniente do tratamento de efluentes de uma indústria de processamento de soja, com cultivo na temperatura de 25 °C e suplementando esse meio com extrato de levedura, sulfato de magnésio e sulfato de manganês. Além disso, já foi amplamente relatado na literatura que a relação carbono/nitrogênio no meio de cultura é um fator essencial para a conversão dos açúcares disponíveis em ácido lático por LAB, sendo a adição de suplementos como o extrato de levedura bastante comum nesse tipo de processo fermentativo. Em vista disso, foi realizado um planejamento experimental do tipo Plackett-Burman com uma triplicata no ponto central, de forma a avaliar a influência da temperatura e se a suplementação dos compostos citados no hidrolisado da casca de soja influenciariam positivamente na produção e produtividade de ácido lático.

Os experimentos desta etapa foram realizados em hidrolisado contendo concentração de açúcares totais próximo a 60 g·L⁻¹, com concentrações de glicose e de xilose de 24,39±0,94g·L⁻¹ e 21,17±0,93 g·L⁻¹, respectivamente. A matriz de planejamento, junto com os resultados obtidos para título de ácido lático e produtividade após 48 h de cultivo estão representados na Tabela 7.

O planejamento foi analisado através do software Statistica 12, variáveis significativas com confiança > 95 %, obtendo-se um R² de 0,86. Foram apontadas como variáveis significativas, como é possível observar no Diagrama de Pareto apresentado na Figura 7, a temperatura (x1, influência negativa, apontando o uso da temperatura de 30 °C) e a suplementação com extrato de levedura (x2, influência positiva) e sulfato de magnésio (x4, influência positiva). A suplementação do hidrolisado com sulfato de manganês (x3) não apresentou efeito significativo.

Comparativamente, no estudo de Coghetto et al. (2016) as melhores condições de cultivo foram na temperatura de 25 °C. No entanto, esse experimento foi realizado em biorreatores e com uma taxa de aeração bastante elevada, de 4,0 vvm, utilizado um meio de cultura com uma composição bem diferente e com suplementação diferente. No presente estudo, foram realizadas tentativas de cultivar em agitador orbital *L. plantarum* BL011 no mesmo hidrolisado utilizado no planejamento experimental e o resultado não foi satisfatório. Nessa temperatura, o microrganismo não foi capaz de desenvolver o seu metabolismo nos

hidrolisados da casca de soja, produzindo valores muito baixos de ácido lático e praticamente não consumindo os açúcares disponíveis no meio. Por conta disso, foi testada a temperatura de 30 °C (nível -1), na qual o resultado foi bastante satisfatório.

Tabela 7. Matriz do planejamento experimental com níveis codificados, título de ácido lático e produtividade em 48 h de cultivo.

Emsaio	x1	x2	x3	x4	Ácido lático (g·L ⁻¹)	Qp [g·(L·h) ⁻¹]
1	+1	-1	-1	+1	13,04	0,27
2	+1	+1	+1	-1	5,26	0,11
3	+1	+1	-1	-1	21,73	0,45
4	-1	+1	+1	+1	40,05	0,83
5	+1	-1	+1	+1	14,16	0,30
6	-1	+1	-1	+1	38,38	0,80
7	-1	-1	+1	-1	16,45	0,34
8	-1	-1	-1	-1	11,92	0,25
9	0	0	0	0	22,6	0,47
10	0	0	0	0	22,67	0,47
11	0	0	0	0	29,97	0,62

x1: Temperatura (°C);
x2: Extrato Bruto de levedura (g·L⁻¹);
x3: Sulfato de Manganês (g·L⁻¹);
x4: Sulfato de Magnésio (g·L⁻¹).

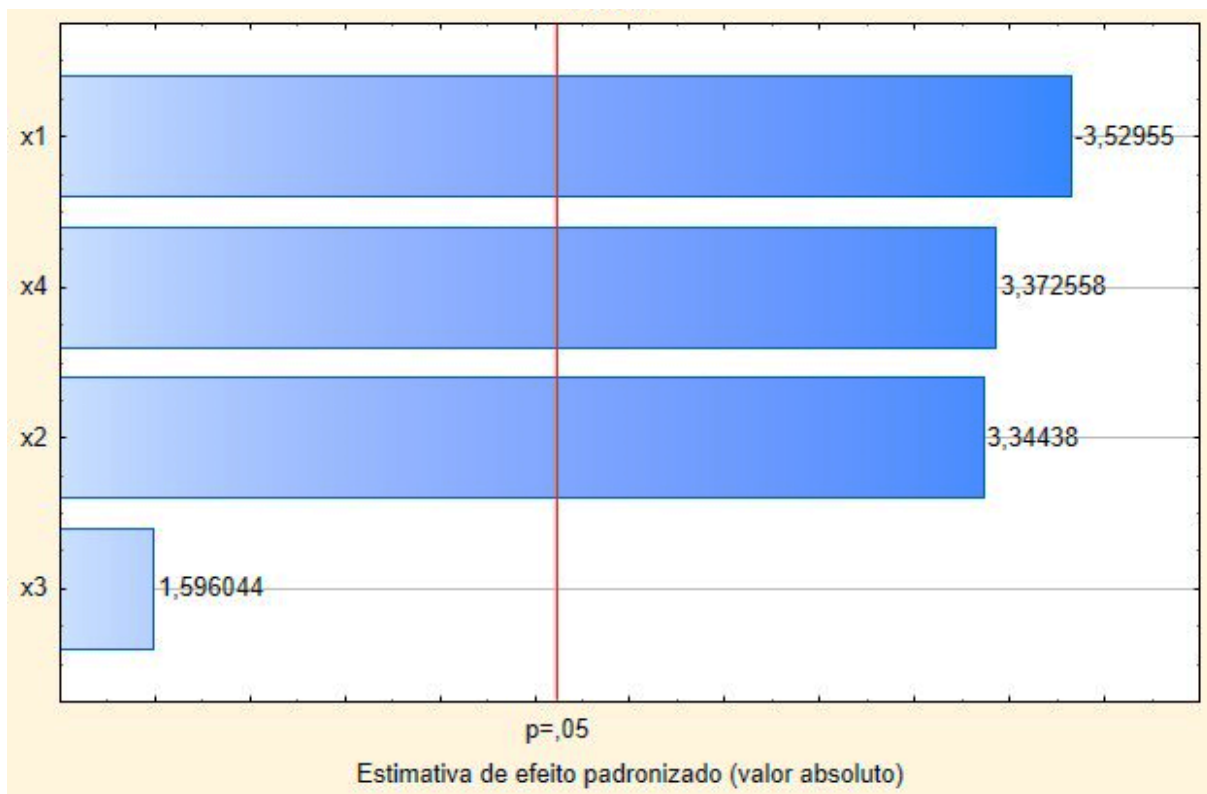


Figura 7. Diagrama de Pareto obtido pela análise do Planejamento experimental para a variável Q_p com o software Statistica 12, confiabilidade de 95 % e $R^2=0,86$.

Em seu estudo, Naveena et al. (2005) também utilizaram um planejamento experimental Plackett-Burman para avaliar a influência de diversas variáveis e da suplementação de hidrolisado de farelo de trigo na produção de ácido lático por *L. amylophilus* GV6. Como resultado do seu planejamento experimental, foi indicado que a suplementação com extrato de levedura teve efeito positivo, com sulfato de manganês teve efeito negativo e com sulfato de magnésio não teve efeito significativo.

Para confirmar o resultado obtido pelo planejamento e a influência das variáveis testadas, foram realizados novos experimentos nas temperaturas de 30 °C (temperatura indicada no planejamento) e a 37 °C (temperatura utilizada nos experimentos 1, 2 e 3), com um cultivo de controle (sem suplementação), outro com suplementação de extrato bruto de levedura e sulfato de magnésio igual ao do nível 0 e outro igual ao do nível +1 (níveis utilizados na matriz de planejamento). Os resultados desses experimentos constam na Tabela 8.

Esses resultados confirmam o que foi indicado pelo planejamento experimental em relação à suplementação do hidrolisado. Os experimentos de controle (hidrolisado sem suplementação) tiveram desempenho estatisticamente inferior, tanto para o consumo de açúcares quanto para a produção de ácido lático. Concordando com o resultado obtido no

planejamento, nesse experimento a suplementação do meio com extrato bruto de levedura e com sulfato de magnésio tiveram uma influência importante na produção de ácido lático e no consumo dos açúcares. Pode-se observar que o resultado utilizando uma suplementação intermediária, que é do nível 0, teve impacto muito semelhante à suplementação de nível +1. Outros estudos já realizaram testes variando a concentração de extrato de levedura no meio de cultura e muitos desses estudos mostraram que altas concentrações dessa fonte nutricional não aumentaram a produção de ácido lático (ALVES DE OLIVEIRA et al., 2018b; SUMITHA; CHRISTY MATHELIN; SIVANANDHAM, 2018).

Tabela 8. Consumo de açúcares e produção de ácido lático por *L. plantarum* BL011 após 48 h, nos cultivos a 30 °C e 37 °C, com e sem suplementação.

Temperatura (°C)	Cultivo	Consumo de açúcares* (%)	Ácido lático* (g·L⁻¹)
30	Controle	47,70±0,04% ^b	22,37±0,11 ^c
	Sup. 0	66,84±0,68% ^a	38,21±2,04 ^a
	Sup. +1	67,40±0,01% ^a	38,55±0,98 ^a
37	Controle	52,11±0,01% ^b	27,27±0,11 ^b
	Sup. 0	69,25±0,01% ^a	37,26±0,87 ^a
	Sup. +1	69,70±0,02% ^a	35,53±0,81 ^a

*Médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas diferentes em cada coluna indicam diferença estatísticas (p<0,05);

Sup. 0: 7,5 g·L⁻¹ EBL e 0,05 g·L⁻¹ Mgso4;

Sup. +1: 15 g·L⁻¹ EBL e 0,1 g·L⁻¹ MgSO₄.

Como é possível observar também, o ácido lático produzido e os açúcares consumidos tiveram pouca diferença nos meios suplementados, não havendo diferença estatística entre as duas temperaturas. Tendo isso em vista, decidiu-se dar continuidade ao estudo na temperatura de 30 °C, uma vez que demanda menos energia do equipamento a ser utilizado para o controle de temperatura, além de auxiliar na diminuição dos riscos de contaminação, uma vez que grande parte das bactérias tem em 37 °C a temperatura ideal para seu crescimento; e utilizar a

suplementação intermediária (igual ao nível 0 do planejamento experimental), uma vez que demanda menor quantidade (e menor custo) desses reagentes. É relevante ressaltar que os resultados obtidos com a suplementação do meio de cultivo foram expressivamente melhores, uma vez que foi obtida maior produção de ácido lático no mesmo tempo de cultivo.

4.4. Cultivos em biorreatores batelada

Nos experimentos realizados em biorreatores de cultivo submerso do tipo batelada foi possível avaliar com mais precisão a influência da presença de oxigênio durante a fermentação dos hidrolisados de casca de soja por *L. plantarum* BL011, além de poder avaliar também a influência do controle do pH do meio de cultura durante a fermentação.

No experimento realizado com aeração de 1 vvm, notou-se um comportamento muito semelhante aos experimentos em agitador orbital realizados anteriormente. Esse experimento está representado na Figura 8. Em 24 h de cultivo foi obtido o maior valor para produtividade, $0,97 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, tendo produzido $23,39 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido lático. No entanto, o título máximo de ácido lático foi obtido em 72 h de cultivo, tendo produzido $36,23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

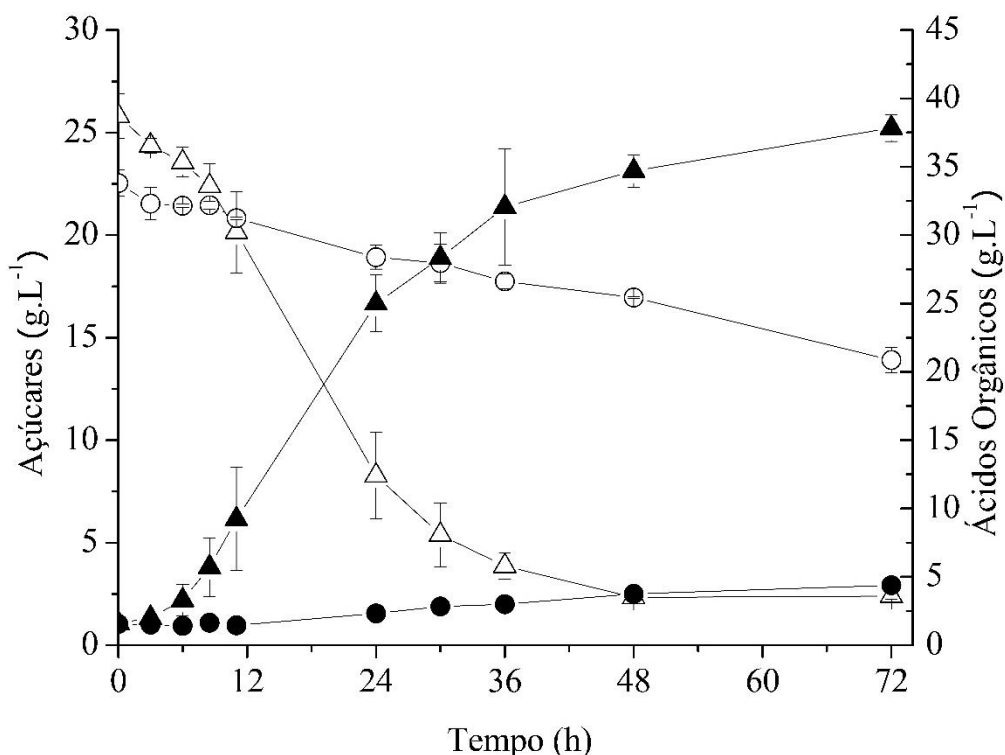


Figura 8. Cinética de produção de ácido lático pela linhagem *L. plantarum* BL011 em biorreator do tipo batelada, a 30 °C e aeração de 1vvm. Legenda: glicose (Δ), xilose (○), ácido lático (▲) e ácido acético (●).

Com base nesse resultado e comparando com os resultados obtidos nos experimentos realizados em agitador orbital, é possível afirmar que a aeração de 1 vvm nesse caso representa uma condição próxima à de microaerofilia. Apesar de haver um fluxo de oxigênio para dentro do biorreator, a quantidade de oxigênio fornecida não é alta. Por conta da composição complexa do hidrolisado, não foi possível calibrar o eletrodo de oxigênio do biorreator, não sendo possível inferir com certeza sobre a transferência de oxigênio durante essa fermentação.

No cultivo realizado em biorreator em ausência de oxigênio (anaerobiose) foi obtida uma cinética ligeiramente mais acelerada e com maior título de ácido lático, como está apresentado na Figura 9. Nesse experimento também foi obtido um título máximo de ácido lático em 72 h de cultivo, tendo produzido $39,63 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A maior produtividade, $1,16 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$, foi obtida no tempo de 24 h, com um título de ácido lático de $27,83 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

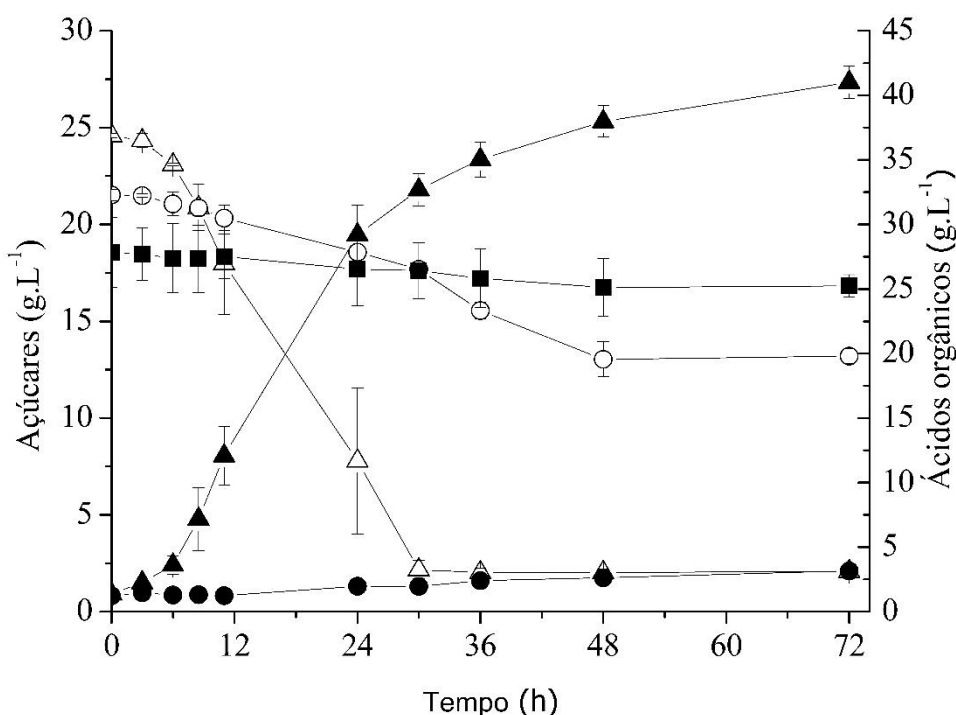


Figura 9. Cinética de produção de ácido lático pela linhagem *L. plantarum* BL011 em biorreator do tipo batelada, a 30 °C em anaerobiose. Legenda: glicose (Δ), xilose (\circ), ácido lático (\blacktriangle), ácido acético (\bullet) e ácido cítrico (\blacksquare).

Não foi injetado nitrogênio no biorreator antes de realizar o inóculo para zerar o oxigênio dissolvido no meio de cultivo, o que é uma prática comum em cultivos realizados em biorreatores de anaerobiose. A utilização de nitrogênio nesse caso é desnecessária e seria um desperdício desse reagente, por dois motivos: não foi possível calibrar o eletrodo de oxigênio, portanto, não seria possível saber quando a concentração de oxigênio estaria de fato zerada; e

a linhagem *L. plantarum* BL011, assim como a maioria das bactérias ácido-láticas, apresenta metabolismo anaeróbico facultativo, fazendo que todo o oxigênio dissolvido no hidrolisado (cuja concentração é baixa) seja logo assimilado.

Apesar de não haver diferença estatística para a produção de ácido lático entre os experimentos realizados nos biorreatores nas condições de anaerobiose e aeração de 1 vvm, as bactérias ácido-láticas são anaeróbias aerotolerantes e é mais comum produzirem maiores quantidades de ácido lático na condição de anaerobiose. Além disso, não haver necessidade de aerar o cultivo com ar comprimido representa também uma diminuição no custo do processo. Por conta disso, decidiu-se continuar os experimentos na condição de anaerobiose.

É possível observar pela análise da Figura 10 que o pH de ambos os cultivos decaiu de forma bastante semelhante, acompanhando a cinética de produção de ácido lático. Novamente, ao atingir um valor próximo de 4,3, o metabolismo do microrganismo desacelerou, parando de consumir os açúcares ainda presentes no meio e de produzir ácido lático. Os efeitos causados pelo estresse ácido foram analisados através de caracterização proteômica em um estudo recente utilizando *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (ZHAI et al., 2014). Nesse estudo, os autores demonstraram que o piruvato era realocado para produção da enzima acetil-CoA ao invés de lactato. Essa mudança faz com que essa enzima produza ácidos graxos, alterando a fluidez da membrana celular. Dessa forma, a membrana fica mais resistente às trocas com o meio externo para conseguir armazenar energia, utilizando ATP para manutenção celular e não mais para produção de ácido lático. O mesmo padrão foi apresentado em outros estudos com *L. casei* e *L. rhamnosus* (BROADBENT et al., 2010; KOPONEN et al., 2012).

Analisando esses resultados e comparando com os resultados obtidos nos experimentos em agitador orbital e por outros autores na literatura, ficou evidente que o controle do pH do cultivo deveria ser um fator determinante para a otimização do processo. No entanto, nos estudos encontrados na literatura, o valor de pH a ser fixado variava muito de acordo com o tipo de substrato e o microrganismo que estava sendo utilizado no cultivo. Além disso, diversos agentes neutralizantes podem ser utilizados, sendo o hidróxido de sódio o agente mais comum. Em alguns estudos, recomenda-se o uso de outras substâncias alcalinas, uma vez que a adição de uma grande quantidade de NaOH no meio de cultura pode contribuir para um aumento do estresse osmótico. Outro fator a ser definido foi a concentração da base a ser escolhida, pois se muito diluída, seria necessário um volume muito grande e se muito concentrada, poderia impactar negativamente na produção de ácido lático.

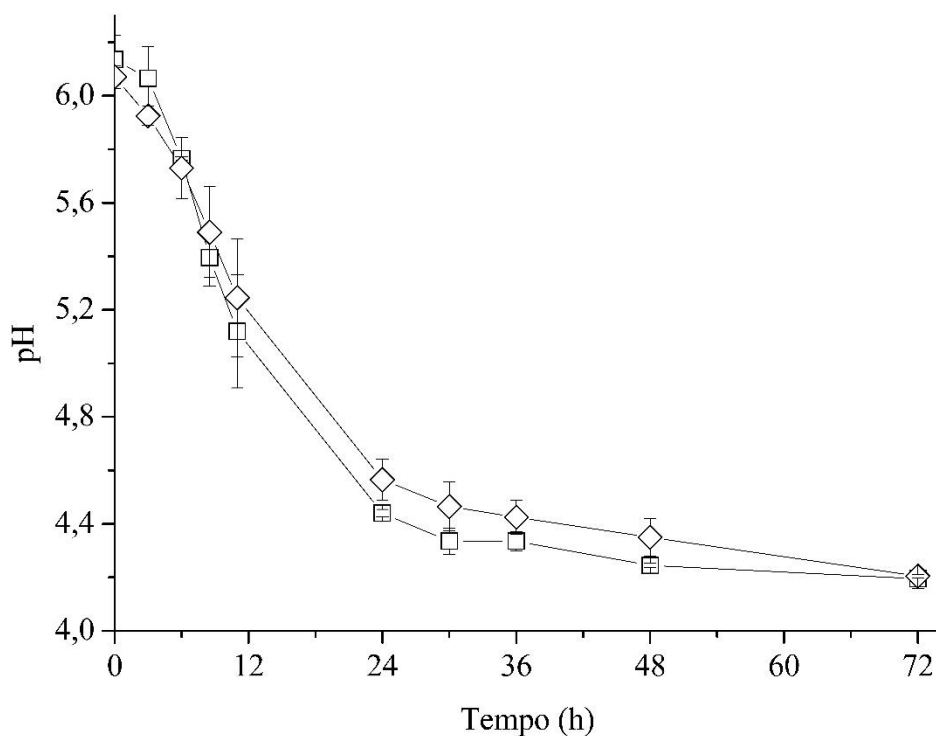


Figura 10. Perfil cinético do pH ao longo dos cultivos em biorreatores batelada a 30 °C e sem controle de pH. Legenda: Biorreator em anaerobiose (□) e biorreator com aeração de 1 vvm (◇).

Foi realizado então um cultivo em biorreator anaeróbico e com controle de pH, cujo resultado pode ser observado na Figura 11. O pH do cultivo foi controlado em 6,0, visto que este foi o pH inicial de todos os cultivos até o momento, com hidróxido de sódio 10 M, que, apesar de ser uma solução bastante concentrada, apresentou um resultado satisfatório. Alguns estudos na literatura sugerem que o uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como agente neutralizante pode render resultados mais expressivos do que usando NaOH. Durante o presente estudo, um teste foi realizado utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 4 M como agente neutralizante (resultado não apresentado). Como resultado, além de este reagente ser pouco solúvel o que se refletiu em dificuldades na operação, foi necessário um volume maior para neutralizar o ácido láctico produzido, sendo obtido um título de ácido láctico muito semelhante ao utilizando NaOH 10 M. Dessa forma, nas condições testadas, o resultado não justificou o uso deste reagente, uma vez que é mais conveniente trabalhar com NaOH. Pode-se afirmar com segurança que foi o melhor resultado obtido em biorreator do tipo batelada, uma vez que o tempo de fermentação diminuiu de 48 h para praticamente 24 h, chegando a valores similares de produção de ácido láctico e de açúcares remanescentes no final do cultivo.

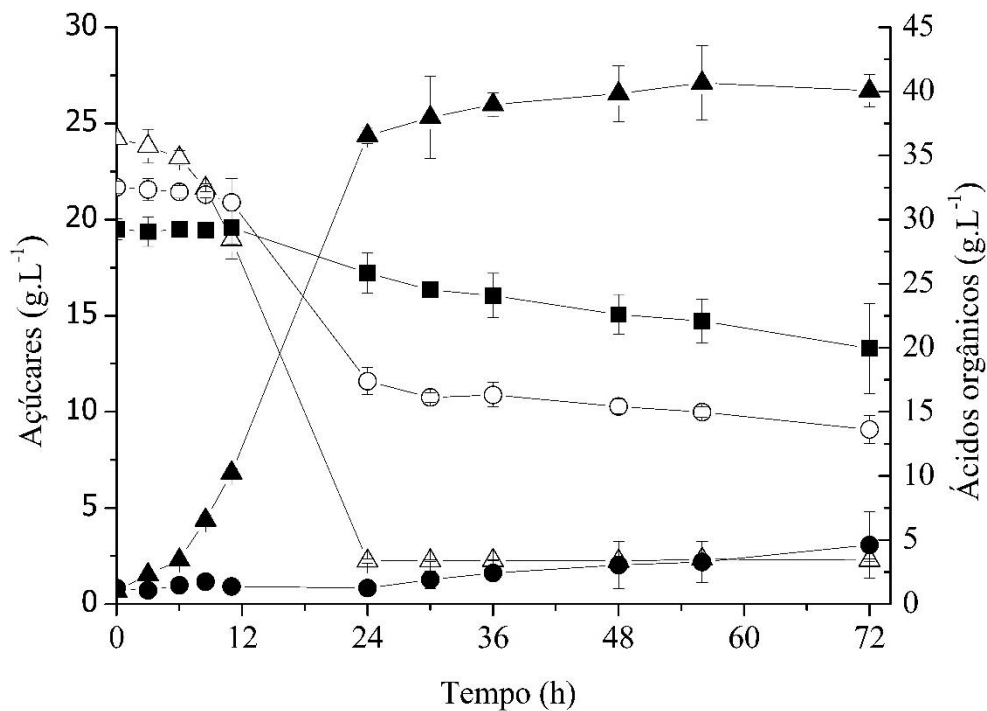


Figura 11. Cinética de produção de ácido lático pela linhagem *L. plantarum* BL011 em biorreator do tipo batelada, a 30 °C em anaerobiose e com pH controlado em 6,0. Legenda: glicose (Δ), xilose (○), ácido lático (▲), ácido acético (●) e ácido cítrico (■).

Nos experimentos realizados nos biorreatores com pH livre ficou evidente a repressão catabólica da xilose pela glicose, uma vez que observa-se praticamente um consumo sequencial desses açúcares. No entanto, quando o pH do cultivo foi controlado, esse comportamento não ocorre. O consumo de xilose continua sendo mais lento do que o de glicose, mas esses açúcares são consumidos de forma simultânea entre 6 e 24 h. Após 24 h, no entanto, os açúcares praticamente não foram mais consumidos, assim como praticamente não há mais a produção de ácido lático. Após as primeiras 24 h de cultivo, observa-se também uma produção bem pequena de ácido acético, que parece ser produzido a partir da xilose. Isso ocorre tanto nos experimentos com pH livre quanto no experimento com o pH controlado, sendo um comportamento normal, uma vez que em rotas heterofermentativas LAB podem produzir ácido acético a partir da fermentação de pentoses (CUBAS-CANO et al., 2018).

Zhang et al. (2016) conseguiram contornar essa problemática em seu estudo, por exemplo, através da inserção de plasmídeos contendo genes chave para a conversão de xilose em ácido lático na linhagem *L. plantarum* NCIMB 8826. Foram obtidos pelos autores resultados bastante satisfatório nesse estudo, uma vez que a linhagem foi capaz de consumir

totalmente os açúcares presentes no hidrolisado de palha de milho, tanto na estratégia de SHF quanto de SSF.

É possível observar que a partir do experimento em anaerobiose, está sendo explicitada nos gráficos a concentração de ácido cítrico durante o cultivo. Esta substância foi um ponto de interesse ao longo do estudo, uma vez que o citrato de sódio e o ácido cítrico são componentes do tampão de citrato utilizado no tratamento de hidrólise enzimática. Nesta solução tamponada, ambos os reagentes liberam o íon citrato. Uma vez que o hidrolisado é concentrado, a concentração desse íon aumenta ainda mais e é um pico em destaque nos cromatogramas de todas as análises.

Como havia uma problemática em relação ao balanço de massa dos cultivos, buscou-se nos cromatogramas outras substâncias que pudessem estar sendo assimiladas pela linhagem *L. plantarum* BL011 ao longo das fermentações e notou-se que em alguns casos o pico de citrato diminuía levemente. Porém, um fato curioso é que o consumo de citrato não acontecia em todas as fermentações utilizando os hidrolisados, inclusive em testes em meio sintético (citrato de amônio é um reagente utilizado na formulação do caldo MRS) em que a concentração de citrato era baixa. Uma vez que não se obteve resultados consistentes, foi descartado o consumo de citrato como um fator que impactasse no resultado.

No entanto, é possível observar que o metabolismo desse microrganismo em anaerobiose consumiu certa quantidade do citrato disponível no hidrolisado, sendo esse consumo ainda mais acentuado após o esgotamento da glicose do meio no cultivo com pH controlado. Na literatura, estudos apontam que na ausência de oxigênio, bactérias ácido-láticas heterofermentativas podem utilizar uma rota metabólica secundária para assimilar o citrato, sendo utilizado principalmente como auxiliar na manutenção celular, geração de energia e para formação de diacetil ou acetoína. No entanto, a produção dessas substâncias pode ser inibida quando o metabolismo celular está desviando o piruvato produzido a partir dos açúcares para a formação de lactato (MEDINA DE FIGUEROA; OLIVER; BENITO DE CÁRDENAS, 2001). Além disso, o consumo de citrato em meios ricos em carboidratos ocorre com mais frequência após ser atingida a fase estacionária de crescimento microbiano (DÍAZ-MUÑIZ et al., 2006). Em um estudo sobre o consumo de citrato por diferentes espécies de *Lactobacillus* em meios contendo diferentes açúcares, todas as espécies de *L. plantarum* testadas foram capazes de assimilar citrato em um meio contendo glicose (DE FIGUEROA et al., 2000).

Comparativamente em um estudo recente utilizando a linhagem *L. casei* TISTR 390 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar contendo aproximadamente 34 g·L⁻¹ de açúcares

totais, os autores obtiveram uma produção de ácido láctico de $21,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ após 120 h de fermentação em biorreator batelada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH inicial 7,0 (OONKHANOND et al., 2017). Já Bernardo et al. (2016) obtiveram um título de ácido láctico de $57 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ após 48 h de cultivo em uma fermentação com *L. rhamnosus* B103, em biorreator do tipo batelada, a uma temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH controlado em 6,2, utilizando como substrato um resíduo proveniente de uma indústria de laticínios contendo $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose).

4.5. Biorreatores: batelada alimentada

A utilização de uma estratégia de batelada alimentada é interessante, uma vez que é possível contornar problemas como inibição por substrato e por produto. Nesse tipo de estratégia, é possível adicionar ao meio de cultura uma solução mais concentrada de açúcares para aumentar a produção e produtividade do processo sem causar condições de estresse.

De posse da melhor condição obtida nos cultivos submersos em biorreatores do tipo batelada foram realizados alguns testes de batelada alimentada, utilizando hidrolisado enzimático como substrato de alimentação. Normalmente, biorreatores batelada alimentada utilizam soluções muito concentradas de açúcares simples (como glicose ou lactose), de forma a aumentar ainda mais a concentração celular e, conseqüentemente, a concentração do produto desejado.

O hidrolisado proveniente do tratamento enzimático foi concentrado até atingir uma concentração de açúcares totais de aproximadamente $90 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($76,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose) e suplementado da mesma forma que o hidrolisado utilizado nas fermentações. Com base no experimento em anaerobiose e pH controlado em 6,0, através de um *software* em um computador acoplado à unidade do biorreator, foi possível verificar que muito próximo ao tempo de 24 h de fermentação a adição automática de NaOH diminuía muito, quase estagnando, indicando que estava diminuindo a produção de ácido láctico e o consumo dos açúcares estava parando. Como não foi possível aferir com precisão o crescimento celular, foi através dessa informação que decidiu-se iniciar a alimentação no tempo de 24 h, possivelmente iniciando a alimentação no final da fase exponencial de crescimento. A taxa de alimentação foi definida de acordo com a quantidade de açúcares consumidos na fase exponencial de produção de ácido láctico, entre 6 h e 24 h. A partir disso, calculou-se que a alimentação deveria iniciar em $0,15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, com a taxa de alimentação crescendo linearmente por 12 h, de forma a alimentar

o biorreator com 400 mL de hidrolisado enzimático suplementado ao final deste período. O resultado desse experimento pode ser observado pela análise da Figura 12.

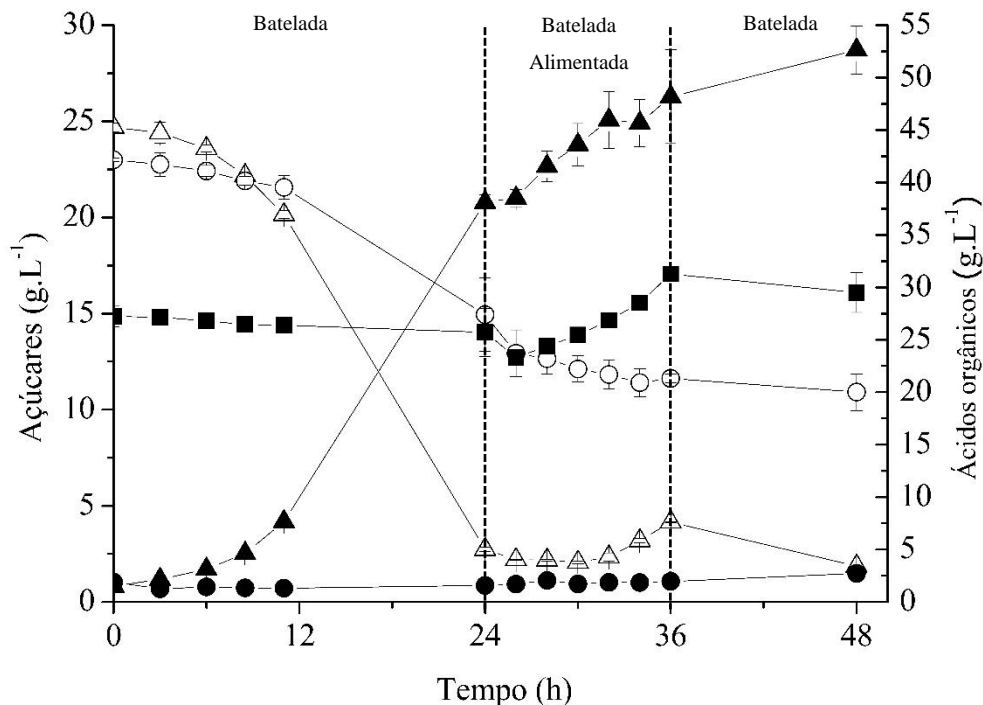


Figura 12. Cinética de produção de ácido lático pela linhagem *L. plantarum* BL011 em biorreator do tipo batelada alimentada com 12 h de alimentação, a 30 °C em anaerobiose pH controlado em 6,0 e hidrolisado de alimentação contendo 90 g.L⁻¹ de açúcares. Legenda: glicose (Δ), xilose (○), ácido lático (▲), ácido acético (●) e ácido cítrico (■).

Como esperado, a produção de ácido lático aumentou conforme o hidrolisado enzimático era alimentado no biorreator, podendo ser observado um aumento aproximadamente linear da produção de ácido lático a partir do início da alimentação. A concentração dos açúcares nas primeiras 8 h de alimentação foi bastante próxima à do início da alimentação, indicando que foi possível obter uma condição de batelada alimentada por este período. Nas últimas 4 h de alimentação houve um pequeno acúmulo de glicose no meio, aumentando de 2,34±0,20 g.L⁻¹ para 4,15±0,03 g.L⁻¹, sendo posteriormente completamente consumida.

Na estratégia de alimentação linear pelo tempo de 24 h, foi utilizado o mesmo raciocínio apontado anteriormente. Desta forma, após 24 h de fermentação, iniciou-se a alimentação de hidrolisado enzimático com taxa de alimentação de 0,15 mL.min⁻¹, crescendo linearmente por 24 h, alimentando o biorreator com 400 mL de hidrolisado enzimático suplementado ao final deste período. Este resultado está apresentado na Figura 13. É possível observar que no caso da

estratégia de 24 h de alimentação linear, a concentração de açúcares se manteve constante após o início da alimentação. Enquanto isso, o título de ácido lático aumentou de forma aproximadamente linear, exceto por um leve desvio nas primeiras horas de alimentação. Em ambos os casos, a linhagem foi capaz de converter todos os açúcares presentes no hidrolisado enzimático alimentado em ácido lático.

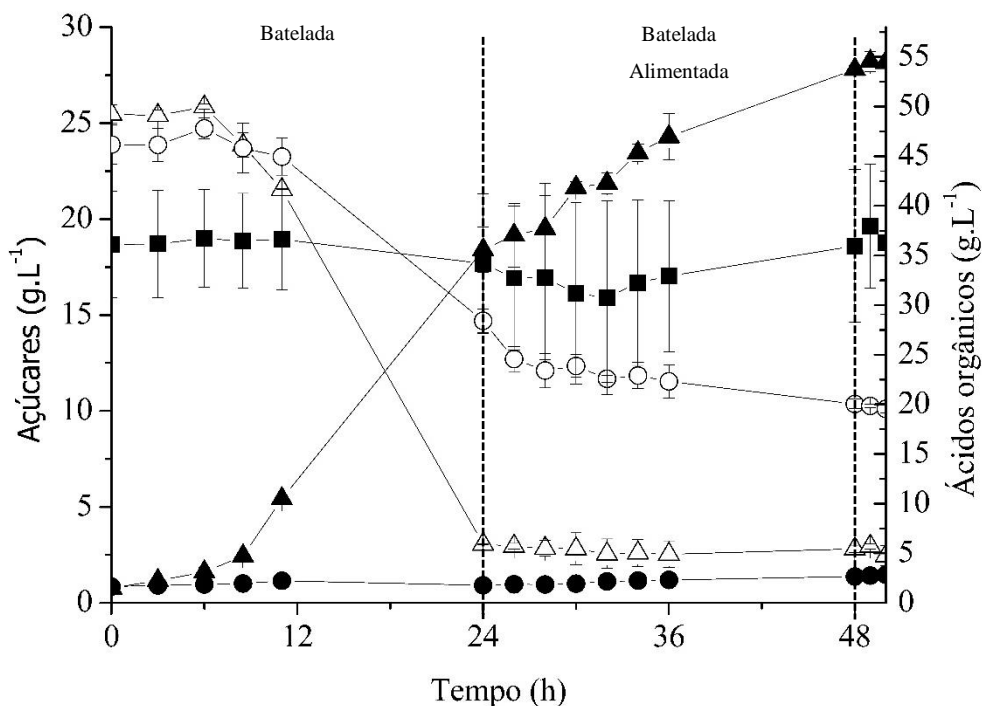


Figura 13. Cinética de produção de ácido lático pela linhagem *L. plantarum* BL011 em biorreator do tipo batelada alimentada com 24 h de alimentação, a 30 °C em anaerobiose pH controlado em 6,0 e hidrolisado de alimentação contendo 90 g.L⁻¹ de açúcares. Legenda: glicose (Δ), xilose (○), ácido lático (▲), ácido acético (●) e ácido cítrico (■).

Analisando os dois resultados, abre-se a possibilidade de que, nessas condições e na concentração de açúcares totais do hidrolisado de alimentação, o tempo de alimentação deveria ser intermediário. No entanto, devido à forma como os experimentos foram realizados, seria difícil realizar tempos de alimentação intermediários.

Em uma tentativa de obter maior produção e produtividade de ácido lático, foi possível aumentar a concentração de açúcares totais do hidrolisado enzimático para 130 g.L⁻¹ (107,38±2,42 g.L⁻¹ de glicose). Decidiu-se utilizar a estratégia de 12 h de alimentação linear que, apesar de ter um leve acúmulo de açúcares próximo ao fim da alimentação, apresentou uma produtividade um pouco superior durante o tempo de alimentação. Não foram testadas

concentrações mais elevadas de hidrolisado enzimático nesse estudo, pois o mesmo pode caramelizar e danificar o equipamento utilizado para concentrar os hidrolisados.

O resultado deste experimento está apresentado na Figura 14. Apesar do acúmulo de aproximadamente $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose no meio de cultura no final da alimentação, nesse experimento foi possível obter a maior produtividade dentre todos os experimentos realizados: $1,65 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ em 26 h de cultivo, 2 h após o início da alimentação. Também nesse experimento, obteve-se o maior título de ácido láctico: $58,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao final de 48 h de fermentação. Apesar do pequeno acúmulo de glicose, a linhagem foi capaz de consumir esse açúcar nas horas seguintes, sendo capaz de converter todos os açúcares presentes no hidrolisado enzimático alimentado em ácido láctico.

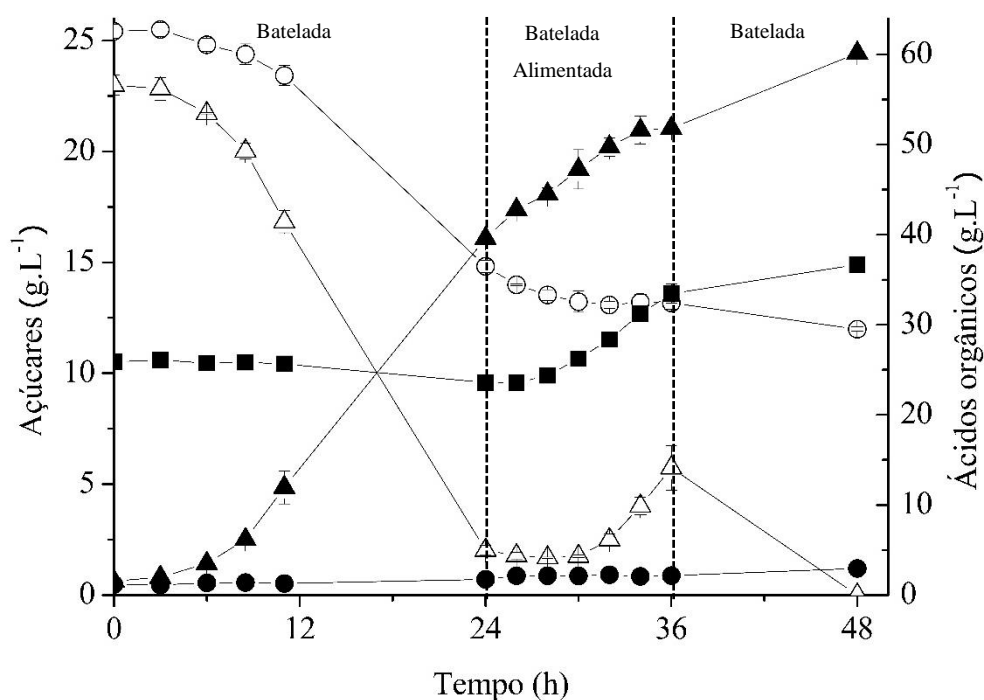


Figura 14. Cinética de produção de ácido láctico pela linhagem *L. plantarum* BL011 em biorreator do tipo batelada alimentada com 12 h de alimentação, a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em anaerobiose pH controlado em 6,0 e hidrolisado de alimentação contendo $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares. Legenda: glicose (Δ), xilose (\circ), ácido láctico (\blacktriangle), ácido acético (\bullet) e ácido cítrico (\blacksquare).

Além disso, nesse experimento foi possível manter a produtividade do processo acima de $1,5 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ entre 24 e 34 h de cultivo, o que representa um resultado bastante promissor. Como é possível observar na Tabela 9, onde são apresentados os resultados obtidos em todos os experimentos realizados nos biorreatores (batelada e batelada alimentada), esse valor para

produtividade havia sido obtido apenas uma vez, em um tempo específico. Por conta disso, manter a produtividade acima desse valor por 10 h de fermentação representa um ótimo resultado.

Pela análise desta tabela, observa-se também que em 24 h, o resultado obtido no biorreator em batelada com pH controlado tem resultado estatisticamente superior aos de pH livre. Além disso, todos os biorreatores do tipo batelada alimentada tiveram resultado estatisticamente superiores aos biorreatores em batelada simples, sendo o último (batelada alimentada, 12 h de alimentação com hidrolisado enzimático contendo 130 g·L⁻¹ de açúcares totais) o melhor resultado dentre todos.

Tabela 9. Produção de ácido láctico e produtividade volumétrica nos experimentos realizados em biorreatores do tipo batelada e batelada alimentada com *L. plantarum* BL011.

Biorreator	Ácido Láctico * (g·L ⁻¹)		Qp * [g·(L·h) ⁻¹]	
	24 h	48 h	24 h	48 h
1 vvm ¹	23,395±2,29 ^c	33,09±1,41 ^b	0,97±0,09 ^c	0,69±0,03 ^c
Anaerobiose ¹	27,83±2,52 ^{bc}	36,6±1,46 ^b	1,16±0,11 ^{bc}	0,76±0,03 ^c
pH 6	35,52±0,65 ^a	38,81±2,18 ^b	1,48±0,02 ^a	0,81±0,04 ^c
Fed-batch 1 ²	36,61±0,66 ^a	51,12±2,33 ^{ab}	1,52±0,03 ^{ab}	1,06±0,01 ^b
Fed-batch 2 ³	34,07±2,49 ^{ab}	52,25±0,16 ^{ab}	1,42±0,10 ^a	1,09±0,01 ^b
Fed-batch 3 ⁴	38,06±0,31 ^a	58,59±0,59 ^a	1,58±0,01 ^a	1,22±0,01 ^a

¹pH inicial igual a 6,0;

²Biorreator batelada alimentada, 12 de alimentação com hidrolisado enzimático contendo 90 g·L⁻¹ de açúcares totais;

³Biorreator batelada alimentada, 24 h de alimentação com hidrolisado enzimático contendo 90 g·L⁻¹ de açúcares totais;

⁴Biorreator batelada alimentada, 12 h de alimentação com hidrolisado enzimático contendo 130 g·L⁻¹ de açúcares totais;

*Médias ± desvio padrão;

Letras sobrescritas diferentes em cada coluna indicam diferença estatísticas (p<0,05).

Em seu estudo utilizando a estratégia de batelada alimentada, Zhang et al. (2016) obtiveram $61.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido láctico, com uma produtividade de $0,32 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$, utilizando uma linhagem geneticamente modificada de *L. plantarum* em hidrolisado de palha de milho. Unrean, (2018), utilizando uma estratégia de SSF e alimentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, enzimas e células, conseguiu obter uma produção de $72,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido láctico com uma linhagem de *L. pentosus* após 72 h de fermentação. Em ambos os casos, foram obtidos valores de produtividade inferiores aos obtidos nesse estudo, além de as linhagens utilizadas produzirem quantidades significativas de ácido acético durante as fermentações.

Utilizando resíduo proveniente de laticínios contendo em torno de $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose como substrato para o cultivo de *L. rhamnosus* B103, Bernardo et al. (2016) obtiveram uma produtividade de $1,07 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ em 24 h de fermentação utilizando uma estratégia de alimentação constante. Já na estratégia pH stat, conseguiram aumentar a produtividade do processo para $3,10 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ em 24 h de fermentação. Em ambos os casos, o meio de alimentação era composto por $500 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de lactose de soro. Apesar de nesse estudo os autores terem obtido uma produtividade superior na estratégia pH stat, vale ressaltar que o meio de cultura utilizado era menos complexo e o meio de alimentação continha uma concentração de açúcares muito mais elevada.

5. Conclusões

Em vista dos resultados apresentados, é possível afirmar que a casca de soja é uma potencial matéria prima para a bioprodução de ácido lático, uma vez que os tratamentos realizados com esse subproduto agroindustrial resultaram em hidrolisados com alta concentração de açúcares e baixa concentração de compostos inibidores. Apesar da alta pressão osmótica dos hidrolisados, a linhagem *Lactobacillus plantarum* BL011 se mostrou um microrganismo robusto, uma vez que a mesma foi capaz de utilizar grande parte dos açúcares presentes para a produção exclusiva de ácido lático.

O planejamento experimental Plackett-Burman foi uma ferramenta estatística importante nesse estudo, pois auxiliou para um aumento da produtividade do processo através da determinação da melhor temperatura e suplementação do hidrolisado. A partir desse resultado obteve-se resultados ainda melhores no processo.

O controle do pH do meio de cultura teve impacto positivo no processo, uma vez que essa estratégia parece ter contribuído para a diminuição do estresse causado pela acidificação pelo excesso de produto no meio de cultura. Com essa estratégia, foi possível diminuir o tempo de fermentação de 48 h para aproximadamente 24 h, aumentando consideravelmente a produtividade do processo.

A estratégia de batelada alimentada teve um resultado estatisticamente superior aos obtidos nas bateladas simples, tanto na produção de ácido lático quanto na produtividade volumétrica. Na estratégia de alimentação de 12 h com o hidrolisado enzimático contendo $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcares totais, foi obtido o melhor resultado. Nesse processo, foi possível manter a produtividade acima de $1,5 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ durante 10 h de alimentação, além de ter obtido a maior produtividade e título de ácido lático dentre todos os experimentos realizados: $1,65 \text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{h})^{-1}$ e $58,28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente.

Sugere-se para a elaboração de novos trabalhos com o cultivo de *L. plantarum* BL011 em hidrolisados de casca de soja que se encontre uma metodologia adequada para identificar e quantificar a proporção dos estereoisômeros de ácido lático produzidos, uma vez que essa informação é de suma importância para a aplicação industrial deste produto. Além disso, seria interessante buscar uma forma de identificar quais outras fontes de carbono poderiam estar sendo assimiladas pela linhagem e convertidas a ácido lático durante a fermentação, de forma a poder calcular o rendimento do processo. Sugere-se que também seja avaliada a relação carbono/nitrogênio ideal para este processo.

Outra sugestão é que se busque alternativas para que se possa medir o crescimento celular durante as fermentações em hidrolisado, de forma a poder avaliar de forma mais precisa os resultados obtidos. A partir disso, seria possível também calcular a velocidade específica de crescimento desse microrganismo na fermentação do hidrolisado, possibilitando novas estratégias de batelada alimentada, por exemplo, com o objetivo de tentar se obter uma produção e produtividade ainda maiores de ácido lático nesse processo.

Pode-se fazer também um estudo avaliando a produção de enzimas durante o processo, por exemplo, tentando verificar qual tipo de deficiência pode estar fazendo com que sobre xilose no final da fermentação. Outra alternativa é avaliar a utilização de alguma ferramenta de biologia molecular para modificar genes chaves que possam viabilizar o consumo desse açúcar remanescente pelo microrganismo.

Além disso, seria interessante avaliar quais processos seriam viáveis para a separação e purificação do ácido lático produzido nos hidrolisados de casca de soja, avaliando também a possibilidade e a viabilidade do escalonamento deste processo. Sugere-se também avaliar técnicas para a produção de PLA a partir do ácido lático obtido após a purificação e analisar suas características e potenciais usos na indústria.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, M. A. et al. Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 2, p. 153–158, 2015.

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.

ALMEIDA, J. R. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, abr. 2007.

ALVES DE OLIVEIRA, R. et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 219–239, 2018a.

ALVES DE OLIVEIRA, R. et al. Different strategies to improve lactic acid productivity based on microorganism physiology and optimum operating conditions. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 57, n. 31, p. 10118–10125, 2018b.

ALVES DE OLIVEIRA, R. et al. Detoxification of sugarcane-derived hemicellulosic hydrolysate using a lactic acid producing strain. **Journal of Biotechnology**, v. 278, n. February, p. 56–63, 2018c.

ALVES DE OLIVEIRA, R. et al. Current advances in separation and purification of second-generation lactic acid. **Separation & Purification Reviews**, v. 0, n. 0, p. 1–17, 2019.

ANDERSEN, N. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Experimental and Modeling studies. **Applied microbiology**, v. 4, n. 1, p. 39–45, 2007.

ASO, Y. et al. Continuous production of D-lactic acid from cellobiose in cell recycle fermentation using β -glucosidase-displaying *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 4, p. 441–446, 2019.

BADER, J. et al. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 371–387, 2010.

BARAKAT, A.; DE VRIES, H.; ROUAU, X. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 362–373, 2013.

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.

BIDDY, M. J.; SCARLATA, C.; KINCHIN, C. **Chemicals from Biomass: A Market Assessment of Bioproducts with Near-Term Potential**. Golden, CO (United States): [s.n.]. Disponível em: <<http://www.osti.gov/servlets/purl/1244312/>>.

BROADBENT, J. R. et al. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2445–2458, 1 maio 2010.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: Role of microorganisms in

food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1–2, p. 131–149, 1999.

CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675–4683, 2011.

CASTILLO MARTINEZ, F. A. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, 2013.

COGHETTO, C. C. et al. Lactobacillus plantarum BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein acid residue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 941–948, 2016.

CORTIVO, P. R. D. et al. Fermentation of oat and soybean hull hydrolysates into ethanol and xylitol by recombinant industrial strains of Saccharomyces cerevisiae under diverse oxygen environments. **Industrial Crops and Products**, v. 113, n. June 2017, p. 10–18, 2018.

CORTIVO, P. R. D. et al. Production of 2,3-butanediol by Klebsiella pneumoniae BLh-1 and Pantoea agglomerans BL1 cultivated in acid and enzymatic hydrolysates of soybean hull. **Biotechnology Progress**, n. January, p. 1–8, 2019.

CUBAS-CANO, E. et al. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 12, n. 2, p. 290–303, mar. 2018.

CUI, F.; LI, Y.; WAN, C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of Lactobacillus rhamnosus and Lactobacillus brevis. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1831–1836, 2011.

DAS, D.; GOYAL, A. Lactic Acid Bacteria in Food Industry. In: **Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology**. [s.l: s.n.]. p. 757–772.

DE FIGUEROA, R. M. et al. Citrate utilization by homo- and heterofermentative lactobacilli. **Microbiological Research**, v. 154, n. 4, p. 313–320, 2000.

DE OLIVEIRA, R. A.; FILHO, R. M.; ROSSELL, C. E. V. High lactic acid production from molasses and hydrolysed sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Transactions**, v. 50, p. 307–312, 2016.

DÍAZ-MUÑIZ, I. et al. Lactobacillus casei metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: A bioinformatics approach. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 4, p. 872–882, 2006.

DJUKIĆ-VUKOVIĆ, A. et al. Towards sustainability of lactic acid and poly-lactic acid polymers production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 108, n. March, p. 238–252, 2019.

GANDOLFI, S. et al. Hemp hurds biorefining: A path to green l-(+)-lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 59–65, 2015.

GAO, M. et al. Production of Lactic Acid from Soybean Straw Using Immobilized Lactobacillus casei and Batch or Repeated- batch Fermentation. v. 13, p. 6722–6735, 2018.

GE, X. Y. et al. Improvement of l-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of Lactobacillus casei at high temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 73–78, 2011.

GE, X. Y.; QIAN, H.; ZHANG, W. G. Improvement of l-lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers by mixed culture of Aspergillus niger and Lactobacillus sp. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 5, p. 1872–1874, 2009.

GEZAE DAFUL, A.; GÖRGENS, J. F. Techno-economic analysis and environmental impact assessment of lignocellulosic lactic acid production. **Chemical Engineering Science**, v. 162, p. 53–65, abr. 2017.

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.

GREWAL, J.; KHARE, S. K. One-pot bioprocess for lactic acid production from lignocellulosic agro-wastes by using ionic liquid stable *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 251, n. December 2017, p. 268–273, 2018.

GUHA, A.; BANERJEE, S.; BERA, D. Production of Lactic Acid From Sweet Meat Industry Waste By *Lactobacillus Delbruki*. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 02, n. 04, p. 630–634, 2013.

GUO, W. et al. Construction of a constitutively expressed homo-fermentative pathway in *Lactobacillus brevis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 15, p. 6641–6650, 2014.

HAMA, S. et al. Production of d-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 167–172, 2015.

HARNPICARNCHAI, P. et al. A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars. **Protein Expression and Purification**, v. 67, n. 2, p. 61–69, 2009.

HICKERT, L. R. et al. Fermentation kinetics of acid – enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 61–67, 2014.

HU, J. et al. High-titer lactic acid production by *Lactobacillus pentosus* FL0421 from corn stover using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 74–80, 2016.

ISIKGOR, F. H.; BECER, C. R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polymer Chemistry**, v. 6, n. 25, p. 4497–4559, 2015.

JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103–112, 2016.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial production of lactic acid: the latest development. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 967–977, 2016.

KARP, S. G. et al. Application of the biorefinery concept to produce l-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1765–1772, 2011.

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.

KOPONEN, J. et al. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 4, p. 1357–1374, fev. 2012.

KRISHNA, B. S. et al. Industrial production of lactic acid and its applications. **International Journal of Biotech Research**, v. 1, n. 1, p. 42–54, 2018.

KUMAR, R.; MAHAJANI, S. M. Industrial _ Engineering Chemistry Research Volume 46 issue 21 2007 [doi 10.1021_2Fie061274j] Kumar, Rakesh_ Mahajani, Sanjay M. -- Esterification of Lactic Acid with n-Butanol by Reactive Distillation.pdf. p. 6873–6882, 2007.

LAOPAIBOON, P. et al. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 1036–1043, 2010.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 1–24, 1997.

LÓPEZ-GARZÓN, C. S.; STRAATHOF, A. J. J. Recovery of carboxylic acids produced by fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 873–904, 2014.

MARGEOT, A. et al. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 372–380, 2009.

MEDINA DE FIGUEROA, R.; OLIVER, G.; BENITO DE CÁRDENAS, I. L. Influence of temperature on flavour compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Microbiological Research**, v. 155, n. 4, p. 257–262, 2001.

MIS SOLVAL, K. et al. Growth kinetics and lactic acid production of *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496, *L. acidophilus* NRRL B-4495, and *L. reuteri* B-14171 in media containing egg white hydrolysates. **Lwt**, v. 105, n. April 2018, p. 393–399, 2019.

MLADENOVIC, D. et al. Lactic acid production on molasses enriched potato stillage by *Lactobacillus paracasei* immobilized onto agro-industrial waste supports. **Industrial Crops and Products**, v. 124, n. June, p. 142–148, 2018.

NAKANO, S.; UGWU, C. U.; TOKIWA, Y. Efficient production of d-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)₂ as a neutralizing agent. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 791–794, 2012.

NAVEENA, B. J. et al. Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 4, p. 485–490, 2005.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OKANO, K. et al. Homo-D-lactic acid fermentation from arabinose by redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5175–5178, 2009.

OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, p. 1–14, 2008.

OONKHANOND, B. et al. Lactic acid production from sugarcane bagasse by an integrated system of lignocellulose fractionation, saccharification, fermentation, and ex-situ nanofiltration. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 3, p. 2533–2541, 2017.

OUYANG, J. et al. Open fermentative production of l-lactic acid by *Bacillus* sp. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 475–480, 2013.

PAPADIMITRIOU, K. et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 837–890, 2016.

PARRA-RAMÍREZ, D.; MARTINEZ, A.; CARDONA, C. A. Lactic acid production from glucose and xylose using the lactogenic *Escherichia coli* strain JU15: Experiments and techno-economic results. **Bioresource Technology**, v. 273, n. October 2018, p. 86–92, 2019.

PENG, L. et al. *Bacillus* sp. strain P38: An efficient producer of l-lactate from cellulosic hydrolysate, with high tolerance for 2-furfural. **Bioresource Technology**, v. 149, p. 169–176, 2013.

PRÜCKLER, M. et al. Comparison of homo- and heterofermentative lactic acid bacteria for implementation of fermented wheat bran in bread. **Food Microbiology**, v. 49, p. 211–219, 2015.

RAMASWAMY, S.; HUANG, H.; RAMARAO, B. V. **Separation and Purification Technologies in Biorefineries**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

REDDY, L. V. et al. L-Lactic acid production by combined utilization of agricultural

bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 187–194, 2016.

SALGADO, J. M. et al. Development of cost-effective media to increase the economic potential for larger-scale bioproduction of natural food additives by *Lactobacillus rhamnosus*, *Debaryomyces Hansenii*, and *Aspergillus niger*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10414–10428, 2009.

SASAKI, C. et al. Production of D-lactic acid from sugarcane bagasse using steam-explosion. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 352, n. 1, 2012.

SIRAGUSA, S. et al. Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. **Journal of Proteomics**, v. 96, p. 366–380, Jan. 2014.

SIVAKUMAR, G. et al. Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 8–18, 2010.

SOUZA, C. F. V. DE; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 260–266, 2003.

SUMITHA, V.; CHRISTY MATHÉLIN, R.; SIVANANDHAM, M. Effect of major and minor nutrients on lactic acid production using biodiesel waste-derived crude glycerol as a carbon source by *Lactobacillus casei* NCIM 2125. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, v. 40, n. 11, p. 1322–1331, 2018.

TERÁN HILARES, R. et al. Hydrodynamic cavitation-assisted alkaline pretreatment as a new approach for sugarcane bagasse biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 609–614, 2016.

TIAN, X. et al. Oxygen transfer efficiency and environmental osmolarity response to neutralizing agents on L-lactic acid production efficiency by *Lactobacillus paracasei*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2049–2054, 2014.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 49, n. 12, p. 832–864, 2011.

UNREAN, P. Optimized feeding schemes of simultaneous saccharification and fermentation process for high lactic acid titer from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 111, n. July 2017, p. 660–666, 2018.

VAN DER POL, E. C. et al. Identifying inhibitory effects of lignocellulosic by-products on growth of lactic acid producing micro-organisms using a rapid small-scale screening method. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 297–304, 2016.

VAN DER POL, E. C.; EGGINK, G.; WEUSTHUIS, R. A. Production of L(+)-lactic acid from acid pretreated sugarcane bagasse using *Bacillus coagulans* DSM2314 in a simultaneous saccharification and fermentation strategy. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2016.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Probiotic Yeasts. In: **Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 411–433.

WANG, Y. et al. Engineering and adaptive evolution of *Escherichia coli* W for L-lactic acid fermentation from molasses and corn steep liquor without additional nutrients. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 394–400, 2013.

WANG, Y. et al. Exploring the potential of lactic acid production from lignocellulosic hydrolysates with various ratios of hexose versus pentose by *Bacillus coagulans* IPE22. **Bioresource Technology**, v. 261, n. April, p. 342–349, 2018.

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.

WATANABE, M. et al. Fermentative l-(+)-lactic acid production from non-sterilized rice washing drainage containing rice bran by a newly isolated lactic acid bacteria without any additions of nutrients. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, n. 4, p. 449–452, 2013.

XIA, C. et al. Conversion of corn stover hydrolysates to acids: comparison between *Clostridium carboxidivorans* P7 and microbial communities developed from lake sediment and an anaerobic digester. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 8, n. 1, p. 169–178, 2018.

YAO, K.; TANG, C. Controlled polymerization of next-generation renewable monomers and beyond. **Macromolecules**, v. 46, n. 5, p. 1689–1712, 2013.

YE, L. et al. Highly efficient production of l-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. **Bioresource Technology**, v. 132, p. 38–44, 2013.

YOSHIDA, S. et al. Homo-D-lactic acid production from mixed sugars using xylose-assimilating operon-integrated *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 1, p. 67–76, 2011.

YU, L. et al. Genome shuffling enhanced l-lactic acid production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 134, n. 1–2, p. 154–159, 2008.

ZHAI, Z. et al. Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CAUH1 and functional identification of a novel acid stress-related transcriptional regulator Ldb0677. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1524–1537, jun. 2014.

ZHANG, Y. et al. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 279–288, 2016.

ZHANG, Y.; VADLANI, P. V. D-lactic acid biosynthesis from biomass-derived sugars via *Lactobacillus delbrueckii* fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 12, p. 1897–1904, 2013.

ZHOU, C. H. et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass to fine chemicals and fuels. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 11, p. 5588–5617, 2011.

ZHOU, S. et al. Production of Optically Pure D-Lactic Acid in Mineral Salts Medium by Metabolically Engineered *Escherichia coli* W3110. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 399–407, 1 jan. 2003.

ZHU, Y.; LEE, Y. Y.; ELANDER, R. T. Conversion of aqueous ammonia-treated corn stover to lactic acid by simultaneous saccharification and cofermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 721–738, 2007.

ZOU, H. et al. Not only osmoprotectant: Betaine increased lactate dehydrogenase activity and l-lactate production in *Lactobacilli*. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 591–595, 2013.