RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/07/2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

UTILIZAÇÃO DE XILOSE PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR ISOLADOS DE *Weizmannia* sp. E ABORDAGEM DA EVOLUÇÃO ADAPTATIVA LABORATORIAL

LARISSA PROVASI SANTOS

RIO CLARO – SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

UTILIZAÇÃO DE XILOSE PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR ISOLADOS DE *Weizmannia* sp. E ABORDAGEM DA EVOLUÇÃO ADAPTATIVA LABORATORIAL

LARISSA PROVASI SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero
Coorientadora: Dra. Fernanda Batista de Andrade
Dra. Luciana Fontes Coelho

RIO CLARO – SP

2023

S237u

Santos, Larissa Provasi

Utilização de xilose para a produção de ácido lático por isolados de Weizmannia sp. e abordagem da evolução adaptativa laboratorial / Larissa Provasi Santos. -- Rio Claro, 2023

93 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Jonas Contiero

Coorientadora: Fernanda Batista de Andrade e Luciana Fontes Coelho

1. Microbiologia industrial. 2. Ácido lático. 3. Fermentação. 4. Planejamento experimental. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: UTILIZAÇÃO DE XILOSE PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO POR ISOLADOS DE Weizmannia sp. E ABORDAGEM DA EVOLUÇÃO ADAPTATIVA LABORATORIAL

AUTORA: LARISSA PROVASI SANTOS
ORIENTADOR: JONAS CONTIERO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participaçao Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

Profa. Dra. SUSAN MICHELZ BEITEL (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Estadual do Centro-Oeste

Prof. Dr. CAURÉ BARBOSA PORTUGAL (Participaçao Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade de São Paulo - ESALQ

Rio Claro, 20 de julho de 2023

Dedico a todas as mulheres que me inspiram, sejam elas amigas, profissionais ou família.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001.

Meu muito obrigada ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Contiero. Sou imensamente grata por você ter me cedido inúmeras oportunidades em seu laboratório, desde o meu estágio pude crescer e aprender muito com você. Prof., agradeço pela ajuda em momentos difíceis e também por sanar as minhas dúvidas mais simples, sempre teve boa vontade em resolver qualquer problema. Me inspiro na sua dedicação, persistência e perseverança. Obrigada pela amizade, por compartilhar bons momentos com seus alunos e por todos os bolos da Casa de Bolos.

Obrigada as minhas queridas coorientadoras, Dra. Fernanda Batista de Andrade e Dra. Luciana Fontes Coelho. Fê, muito obrigada por toda ajuda, por todo o ensinamento, por todas as sugestões para tirarmos o melhor dessa pesquisa, por passar pelas situações difíceis comigo e me ajudar a contorná-las. Te considero uma ótima profissional. E o mais importante, obrigada pela sua amizade, sinto sua falta. Lu, obrigada por toda a paciência, por nunca ter negado uma ajuda por mais simples que fosse, por me explicar inúmeras vezes mesmo quando eu não entendia.

Aos professores, técnicos, alunos e funcionários que me auxiliaram de alguma forma, meu muito obrigada. Em especial Dr. Michel Brienzo e Dra. Ana Paula Jacobus, por cederam o hidrolisado dos resíduos e a caracterização. As professoras Dra. Daiane Sass e Dra. Susan Beitel, e Dr. Cauré Portugal que aceitaram participar da banca de qualificação e defesa, contribuindo com as correções e sugestões relevantes. Ao Mr. Rodolfo Bizarria Júnior que deu uma grade ajuda para realizar o sequenciamento, obrigada por dedicar o seu tempo me explicando cada passo.

Meu grande obrigada a minha família por todo amor e suporte financeiro. Ao meu pai, Reginaldo, por me dar toda a liberdade do mundo para que eu sempre fosse uma pessoa livre, por ter passado o natal em Rio Claro comigo para que essa pesquisa não parasse. A minha mãe, Luciani, por me tornar uma pessoa mais forte e sábia. A minha vó Conceição, por toda a preocupação, carinho e apoio para que eu não me sentisse desamparada. Amo vocês imensamente!!!

Um agradecimento especial, a minha psicóloga, Raissa Bueno. Obrigada Raissa por me auxiliar a guiar caminhos menos pesados, para que eu pudesse levar tudo com mais leveza. Obrigada por me ouvir e tranquilizar em muitos dos momentos difíceis. Você é uma excelente profissional!!

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Industrial (LMI) pela convivência, bolinhos de aniversário e aprendizado: Rayane, Gustavo, Ana, Matheus, Raphael, Mateus, Lucas, Lari, Joneclei e principalmente Ingrid. Gui, muito obrigada pela sua amizade, ela vai muito além do laboratório!! Aprendi muitas coisas com você, tanto profissionais quanto pessoais. Obrigada por toda ajuda sempre que pedi, obrigada por todo o suporte, obrigada por todo o carinho, obrigada pela

cumplicidade, obrigada por me ajudar sempre a crescer, obrigada por me escutar, obrigada por tirar o melhor de mim, obrigada, obrigada, obrigada!!

Aos meus amigos Rogério Martins e Lara Santello. Rô, obrigada por me explicar sobre composição da biomassa lignocelúlosica (risos) e como é feito o seu trabalho mesmo estando a uns 15 mil km de distância. Obrigada migo, pela companhia, festas e sorvetes. Sinto sua falta!! Larinha, obrigada por ser uma pessoa tão doce, sempre me sentia amparada ao te encontrar e contar as dificuldades. Obrigada por toda ajuda e apoio.

Um agradecimento especial as "meninas" Bharguan, Luísa e Marina. Mesmo com a distância sempre se fizeram presentes, sempre me deram o ombro amigo quando precisei. Obrigada por sempre estarem comigo. Obrigada Aline, Pedro, Bev e Leo, os poucos momentos juntos foram muito, mais muito bons, quero fortalecer cada vez mais nossos laços. A amizade de todos vocês é essencial!!

Leo, obrigada!! Obrigada por passar o dia de Ano Novo comigo (mesmo que de forma despretensiosa rsrss), obrigada por todos os jantares juntos, pelo carinho, pela diversão, risada, distração, por me escutar reclamar, e muitas outras coisas. Sua companhia foi essencial nessa reta final. Gosto muito de você!! Você tem importância aqui e agora.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

“Diz-se que, momentos antes de um rio cair no oceano ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada, os cumes, as montanhas, o longo caminho sinuoso através das florestas, através dos povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. Podemos apenas ir em frente. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entrar no oceano é que o medo desaparece. Porque apenas então o rio compreende que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano. Por um lado é desaparecimento e por outro lado é renascimento. ”

Gibran Khalil Gibran

RESUMO

O ácido lático é um ácido orgânico de grande ocorrência, utilizado em diferentes setores industriais, como farmacêutico, alimentício, cosmético e têxtil, ganhando destaque também por atuar como monômero na síntese de biopolímeros. Há duas formas de se obter o ácido lático, através da utilização de produtos de origem petrolífera, ou por meio de bioprocessos. Esse último já ocupa a maior parte do mercado produtor, mas ainda há obstáculos a serem superados, como a produção da biomolécula a partir de substratos de baixo custo, utilizando materiais lignocelulósicos que é um dos maiores desafios. Outro obstáculo é a purificação do ácido lático, pois os microrganismos produtores desse composto não toleram faixas muito baixas de pH, tornando-se indispensável o uso de agentes neutralizantes, como por exemplo, o carbonato de cálcio que podem gerar resíduos como o gesso. Com isso, o objetivo desse estudo foi isolar *Weizmannia* sp. produtora de ácido lático a partir de bagaço de cana-de-açúcar, e utilizar o planejamento experimental para otimizar a produção do metabólito. Adicionalmente realizar uma evolução adaptativa laboratorial (ALE) para obtenção de cepas resistentes a concentração do ácido no meio durante seu crescimento e produção da biomolécula. Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers e os isolados foram cultivados em meio xilose- extrato de levedura- peptona (XYP), contendo 20 g/L da fonte de carbono. A identificação dos isolados foi dada através da técnica de PCR do 16S rDNA, seguido de sequenciamento. O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado com os componentes do meio de cultivo, como fonte de carbono (xilose), fonte de nitrogênio (peptona e extrato de levedura) e acetato de sódio. A quantificação do ácido lático e o consumo da fonte de carbono foi realizada em HPLC. Dos isolados selecionados dois foram considerados promissores para a produção de ácido lático, sendo que *Weizmannia coagulans* BLMI apresentou maior produção de ácido lático em anaerobiose, chegando a 21,93±0,9 g/L e rendimento de 69,18 %, e a cepa *Weizmannia ginsengihumi* BMI foi capaz de produzir 19,79±0,8 g/L com um rendimento de 70,46 %. Por *W. ginsengihumi* ser uma espécie sem registros na literatura até o momento para a produção de ácido lático, o DCCR foi realizado com essa cepa. O DDCR mostrou que as variáveis fonte de carbono e nitrogênio tanto na forma linear quanto quadrática apresentaram influência na resposta, mas as interações das variáveis não tiveram significância ($p < 0,05$). E a variável que apresentou maior influência foi a xilose em nível linear. A análise de superfície de resposta indicou que as concentrações ótimas de fonte de carbono e fonte de nitrogênio foram 32,5 e 3,5 g/L, respectivamente, sem a necessidade de adicionar acetato de sódio ao meio de cultivo, levando à produção de 20,02±0,19 g/L e produtividade de 0,55 g/L/h após 36 horas de fermentação, e uma concentração de açúcar residual de 12,59±0,51 g/L. A fermentação utilizando os hidrolisados da semente de goiaba e bagaço de cana-de-açúcar apresentaram uma produção de ácido lático de 0,18±0,02 e 1,26±0,37 g/L, respectivamente, uma produção extremamente baixa quando comparado com a literatura. Nos ensaios da ALE, a bactéria *W. coagulans* BLMI passou por 71 transferências, totalizando 280 gerações, sendo capaz de suportar uma concentração de 90 mM de ácido lático com um pH do meio em 4,65. Nas fermentações com a cepa selvagem e a cepa evoluída, *W. coagulans* BLMI 171, sem a presença de agente neutralizante produziram 7,70±0,43 e 6,47±0,9 g/L, respectivamente após 48 horas de fermentação. Quanto a produção de ácido acético foi maior mesmo os ensaios sendo conduzidos em anaerobiose, BLMI produziu 7,96±0,35 g/L e BLMI 171 produziu 8,11±0,08 g/L após 48 horas de fermentação. Dessa forma, *Weizmannia* sp. foi capaz de fermentar a xilose para a produção de ácido lático em anaerobiose, apesar da cepa BMI não ser capaz de crescer e nem produzir o ácido lático a partir dos resíduos. BLMI demonstrou boa resistência cultivada em meio com pH de 4,65, mas para a produção de ácido lático são necessárias intervenções moleculares.

Palavras chave: Pentose; resíduo frutorefinaria; ácidos orgânicos; *Weizmannia* sp.; planejamento experimental.

ABSTRACT

Lactic acid is an organic acid of great occurrence, used in different industrial sectors, such as pharmaceuticals, food, cosmetics, and textiles, and also gaining prominence for acting as a monomer in the synthesis of biopolymers. There are two ways to obtain lactic acid, through the use of products of petroleum origin, or bioprocesses. The latter already occupies most of the producing market, but there are still obstacles to be overcome, such as the production of the biomolecule from low-cost substrates, using lignocellulosic materials, which is one of the biggest challenges. Another obstacle is the purification of lactic acid, as the microorganisms that produce this compound do not tolerate very low pH ranges, making it essential to use neutralizing agents, such as calcium carbonate, which can generate residues such as gypsum. Thus, this study aimed to isolate *Weizmannia* sp. producer of lactic acid from sugarcane bagasse, and to use the experimental design to optimize the production of the metabolite. Additionally, carry out an adaptive laboratory evolution (ALE) to obtain strains resistant to acid concentration in the medium during their growth and production of the biomolecule. The experiments were carried out in Erlenmeyers flasks and the isolates were cultivated in xylose-yeast extract-peptone (XYP) medium, containing 20 g/L of the carbon source. The identification of the isolates was given through the 16S rDNA PCR technique, followed by sequencing. The rotational central composite design (DCCR) was performed with the components of the culture medium as carbon source (xylose), nitrogen source (peptone and yeast extract), and sodium acetate. The quantification of lactic acid and the consumption of the carbon source was performed in HPLC. Of the selected isolates, two were considered promising for the production of lactic acid, with *Weizmannia coagulans* BLMI showing the highest production of lactic acid in anaerobic conditions, reaching 21.93±0.9 g/L and a yield of 69.18%, and the strain *Weizmannia ginsengihumi* BMI was able to produce 19.79±0.8 g/L with a yield of 70.46%. Because *W. ginsengihumi* is a species with no records in the literature so far for the production of lactic acid, the DCCR was performed with this strain. The DDCR showed that the carbon and nitrogen source variables in both linear and quadratic forms influenced the response, but the interactions of the variables were not significant ($p < 0.05$). And the variable that showed the greatest influence was xylose at a linear level. Response surface analysis indicated that the optimal concentrations of carbon source and nitrogen source were 32.5 and 3.5 g/L, respectively, without the need to add sodium acetate to the culture medium, leading to the production of 20.02±0.19 g/L and productivity of 0.55 g/L/h after 36 hours of fermentation, and a residual sugar concentration of 12.59±0.51 g/L. Fermentation using hydrolysates of guava seed and sugarcane bagasse showed a lactic acid production of 0.18±0.02 and 1.26±0.37 g/L, respectively, an extremely low production when compared to the literature. In the ALE assays, the bacteria *W. coagulans* BLMI underwent 71 transfers, totaling 280 generations, being able to support a concentration of 90 mM of lactic acid with a medium pH of 4.65. Fermentations with the wild strain and the evolved strain, *W. coagulans* BLMI 171, without the presence of a neutralizing agent produced 7.70±0.43 and 6.47±0.9 g/L, respectively, after 48 hours of fermentation. As for the production of acetic acid, it was higher even in the tests being conducted in anaerobic conditions, BLMI produced 7.96±0.35 g/L and BLMI 171 produced 8.11±0.08 g/L after 48 hours of fermentation. Thus, *Weizmannia* sp. was able to ferment xylose to produce lactic acid in anaerobiosis, despite the BMI strain not being able to grow or produce lactic acid from waste. BLMI showed good resistance grown in a medium with a pH of 4.65, but molecular interventions are required for lactic acid production.

Keywords: Pentose; fruit refinery residue; organic acids; *Weizmannia* sp.; experimental planning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fórmula estrutural das duas formas enantioméricas do ácido lático.....19
Figura 2 - Bactérias crescidas em placa de Petri com meio XYP com adição de carbonato de cálcio, após 48 horas de incubação. O crescimento das colônias pode ser observado a partir da formação do halo. A seta preta indica uma representação da formação de halo. 34
Figura 3 - Imagem representativa de um dos 8 isolados selecionados para a produção de ácido lático após a coloração de Gram visualizada em microscópio óptico em aumento de 1000X. As setas indicam os bacilos corados. 36
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação dos produtos de PCR correspondente ao fragmento de 1500 pares de bases do gene 16S rDNA. As colunas estão identificadas com o nome das cepas correspondentes; MM: 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) utilizado como padrão de peso molecular.....37
Figura 5 - Curva de crescimento das espécies *Weizmannia coagulans* BMAI (linha tracejada cinza) e Weizmannia ginsengihumi BMI (linha preta) em meio XYP a 50 °C e 150 rpm, durante 14 horas de cultivo. Ensaio realizado em triplicata. 40
Figura 6 - Perfil de crescimento dos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 41
Figura 7 - Consumo da xilose pelos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 41
Figura 8 - Produção de ácido lático pelos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 42
Figura 9 - Via proposta para a conversão do lactato em acetato na presença de oxigênio. 43
Figura 10 - Produção de ácido acético pelos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 44
Figura 11 – Rendimento dos produtos ácido lático (a) e ácido acético (a), pelo substrato em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 45
Figura 12 - Perfil de crescimento dos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose, sob atmosfera de anaerobiose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 46
Figura 13 – Comparação do perfil de crescimento em aerobiose (O_2) e anaerobiose (N_2) das cepas BLMI (a), B2L1 (b), B07 (c), BMI (d) e BMAI (e). O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 46

Figura 14 - Consumo da xilose pelos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose, sob atmosfera anaeróbica. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 47
Figura 15- Produção de ácido lático pelos isolados de *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose, sob atmosfera anaeróbica. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 48
Figura 16 - Produção de ácido acético pelos isolados de *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose, sob atmosfera anaeróbica. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 49
Figura 17 - Rendimento dos produtos. A) ácido lático e B) ácido acético, pelo substrato em meio XYP contendo 20 g/L de xilose, sob atmosfera anaeróbica. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 49
Figura 18 - Produção de ácido lático por *W. ginsengihumi* BMI em função do tempo para os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. Os ensaios do ponto central (9, 10, 17 e 18) estão representados pela média dos valores em E0. 51
Figura 19 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis concentração de xilose, fonte de nitrogênio e acetato de sódio sobre a produção de AL por *W. ginsengihumi* BMI em 48h de fermentação. 52
Figura 20 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de AL por *W. ginsengihumi* BMI em função das variáveis xilose (X_1) e fonte de nitrogênio (X_2). 53
Figura 21 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de AL por *W. ginsengihumi* BMI em função das variáveis xilose (X_1) e acetato de sódio (X_3). 55
Figura 22 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de AL por *W. ginsengihumi* BMI em função das variáveis fonte de nitrogênio (X_2) e acetato de sódio (X_3). 56
Figura 23 - Produção de ácido ácetico por *W. ginsengihumi* BMI em função do tempo para os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. Os ensaios do ponto central (9, 10, 17 e 18) estão representados pela média dos valores em E0. 58
Figura 24 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis concentração de xilose, fonte de nitrogênio e acetato de sódio sobre a produção de AA por *W. ginsengihumi* BMI em 48 horas de fermentação. 58
Figura 25 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de ácido acético em 48h de fermentação, em função das variáveis xilose (X_1) e fonte de nitrogênio (X_2). 59
Figura 26 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de ácido acético em 48 horas de fermentação, em função das variáveis xilose (X_1) e acetato de sódio (X_3). 60

Figura 27 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de ácido acético em 48 horas de fermentação, em função das variáveis nitrogênio (X_2) e acetato de sódio (X_3). 61
Figura 28 - Perfil de crescimento de *W. ginsengihumi* BMI em função do tempo para os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. Os ensaios do ponto central (9, 10, 17 e 18) estão representados pela média dos valores em E0. 63
Figura 29 - Diagrama de Pareto e efeitos estimados das variáveis concentração de xilose, fonte de nitrogênio e acetato de sódio sobre o crescimento de *W. ginsengihumi* BMI em 48h de fermentação. 63
Figura 30 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de biomassa bacteriana (BB) em 48 horas de fermentação, em função das variáveis xilose (X_1) e nitrogênio (X_2). 65
Figura 31 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de biomassa bacteriana (BB) em 48 horas de fermentação, em função das variáveis xilose (X_1) e acetato de sódio (X_3). 66
Figura 32 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de biomassa bacteriana (BB) em 48 horas de fermentação, em função das variáveis nitrogênio (X_2) e acetato de sódio (X_3). 67
Figura 33 – Concentração de açúcar residual por *W. ginsengihumi* BMI em função do tempo para os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. Os ensaios do ponto central (9, 10, 17 e 18) estão representados pela média dos valores em E0. 69
Figura 34 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de açúcar residual em 48h de fermentação, em função das variáveis xilose (X_1) e fonte de nitrogênio (X_2). ..70
Figura 35 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de açúcar residual em 48h de fermentação, em função das variáveis xilose (X_1) e acetato de sódio (X_3). 71
Figura 36 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de açúcar residual em 48h de fermentação, em função das variáveis nitrogênio (X_2) e acetato de sódio (X_3). 72
Figura 37 - Cinética da produção de ácido lático (AL) e ácido acético (AA), e consumo de xilose por *W. ginsengihumi* BMI. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 72h. 73
Figura 38 - Perfil de crescimento de *W. ginsengihumi* BMI em meio XYP com os valores obtidos do planejamento experimental. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 72 horas de fermentação. 74
Figura 39 – Perfil de crescimento de *W. ginsengihumi* BMI utilizando a xilose presente nos hidrolisados de semente de goiaba e bagaço de cana-de-açúcar em meio XYP. O cultivo ocorreu a 50 °C, 150 rpm durante 48 h de fermentação. 75

Figura 40 - Consumo da xilose presente nos hidrolisados de goiaba e bagaço de cana-de-açúcar por *W. ginsengihumi* BMI em meio XYP. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 76
Figura 41 – Produção de ácido lático por *W. ginsengihumi* BMI utilizando os hidrolisados de goiaba e bagaço de cana-de-açúcar como substrato. A bactéria foi cultivada em meio XYP a 50 °C, 150 rpm por 48 h de fermentação. 77
Figura 42 - Perfil de crescimento das cepas *W. coagulans* BLMI e *W. coagulans* BLMI 371 em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 79
Figura 43 - Produção de ácido lático pelas cepas *W. coagulans* BLMI e *W. coagulans* BLMI 371 em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 79
Figura 44 - Consumo da xilose pelas cepas *W. coagulans* BLMI e *W. coagulans* BLMI 371 em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 3 - Especificação dos níveis codificados e reais das variáveis xilose (X_1), fonte de nitrogênio (X_2) e acetato de sódio (X_3) utilizadas no planejamento DCCR 2^3 empregado no cultivo de *W. ginsengihumi* BMI a 150 rpm, 50 °C por 48 horas. 31
Tabela 4 - Matriz do planejamento DCCR 2^3 contendo as condições de cultivo (X_1 - xilose, X_2 - fonte de nitrogênio e X_3 - acetato de sódio) em seus níveis codificados. 31
Tabela 1 – Composição do hidrolisado da semente de goiaba. 32
Tabela 2 – Composição do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar. 32
Tabela 5 - Produção de ácido lático pelos isolados cultivados em meio XYP contendo 20 g/L de xilose a 150 rpm, 50 °C por 48 horas sem agente neutralizante. 35
Tabela 6 - Identificação dos isolados de acordo com a sequência obtida a partir da região do rDNA 16S e comparação com os dados do GenBank. 38
Tabela 7 - Número de acesso gerado para os isolados depositados na plataforma do NCBI. 39
Tabela 8 - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de *W. ginsengihumi* BMI. Os meios foram compostos por xilose como fonte de carbono, extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio, e acetato de sódio. As variáveis independentes estão representadas pelos níveis reais. As repostas correspondem a 48 horas de fermentação. 50
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de AL por *W. ginsengihumi* BMI empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR). 52
Tabela 10 - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de *W. ginsengihumi* BMI. Os meios foram compostos por xilose como fonte de carbono, extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio, e acetato de sódio. As variáveis independentes estão representadas pelos níveis reais. As repostas correspondem a produção e produtividade de ácido acético em 48 horas de fermentação. 57
Tabela 11 - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de *W. ginsengihumi* BMI. Os meios foram compostos por xilose como fonte de carbono, extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio, e acetato de sódio. As variáveis independentes estão representadas pelos níveis reais. A reposta corresponde a concentração de biomassa em 48 horas de fermentação, e também os resultados referentes a conversão do produto em biomassa para os ácidos orgânicos. 61
Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o crescimento de *W. ginsengihumi* BMI empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR). 64
Tabela 13 - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de *W. ginsengihumi* BMI. Os meios foram compostos por xilose como fonte de carbono, extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio, e acetato de sódio. As variáveis independentes estão representadas pelos

níveis reais. A reposta corresponde a concentração de açúcar residual em 48 horas de fermentação. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido acético
AL	Ácido lático
ALE	*Adaptative Laboratory Evolution*
ARTP	*Atmospheric and Room-Temperature Plasma*
BAL	Bactérias do Ácido Lático
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
D.O.	Densidade Óptica
GRAS	*Generally Recognized as Safe*
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography*
IPBEN	Instituto de Pesquisa em Bioenergia
XYP	*Xylose-Yeast-Peptone*
LAB	*Lactic Acid Bacteria*
LB	*Lysogeny Broth*
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NC-IUB	*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17
2.1 ÁCIDOS ORGÂNICOS 17
2.2 ÁCIDO LÁTICO 18
2.3 MERCADO DO ÁCIDO LÁTICO 19
2.4 SÍNTESE QUÍMICA E BIOLÓGICA 20
2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FERMENTAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO 21
2.5.1 Microrganismo 21
2.5.2 Fontes de carbono 22
2.5.3 pH do meio de cultivo 23
2.5.4 Temperatura 23
3 OBJETIVOS 24
3.1 OBJETIVO GERAL 24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 24
4 METODOLOGIA 24
4.1 MEIOS DE CULTURA 25
4.1.1 Lysogeny Broth (LB) 25
4.1.2 Meio xilose-extrato de levedura-peptona (XYP) 25
4.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS 25
4.2.1 Seleção dos microrganismos 26
4.2.2 Identificação por coloração de Gram 26
4.2.3 Identificação molecular dos microrganismos 27
4.2.3.1 Extração do DNA genômico 27
4.2.3.2 Amplificação do gene 16S rDNA 27
4.2.3.3 Eletroforese em gel de agarose 1% 27
4.2.3.4 Purificação dos produtos de PCR 28
4.2.3.5 Reação de sequenciamento do gene 16S rDNA 28
4.2.3.6 Análise das sequências obtidas 28
4.3 CURVA DE CRESCIMENTO 29
4.4 FERMENTAÇÕES 29
4.4.1 Microrganismos 29
4.4.2 Condições de cultivo 29
4.4.2.1 Preparo do inóculo 29
4.4.2.2 Fermentação em aerobiose 30
4.4.2.3 Fermentação em anaerobiose 30
4.4.2.4 Planejamento experimental fatorial 30

4.4.2.5 Fermentação com resíduos 31
4.5 EVOLUÇÃO ADAPTATIVA LABORATORIAL 32
4.5.1 Fermentação cepa selvagem e evoluída 33
4.6 METODOLOGIA ANALÍTICA 33
4.6.1 Quantificação de ácidos orgânicos 33
4.6.2 Determinação da concentração celular 33
4.6.3 Determinação do consumo da fonte de carbono 33
4.6.4 Análises estatísticas 34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS 34
5.1.1 Identificação dos microrganismos 35
5.1.2 Extração, amplificação por PCR, purificação e sequenciamento do gene 16S rDNA 36
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO 39
5.3 FERMENTAÇÕES 40
5.3.1 Fermentação em aerobiose 40
5.3.2 Fermentação em anaerobiose 45
5.3.3 Planejamento experimental 50
5.3.3.1 Resposta ácido lático 50
5.3.3.2 Resposta ácido acético 56
5.3.3.3 Resposta biomassa 61
5.3.3.4 Açúcar residual 67
5.3.3.5 Validação do ponto escolhido como ótimo e cinética da fermentação em shaker 72
5.3.4 Fermentação resíduos 74
5.4 EVOLUÇÃO ADAPTATIVA LABORATORIAL 78
5.4.1 Fermentação *W. coagulans* BLMI – Selvagem X evoluída 78
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

1 INTRODUÇÃO

O avanço nas pesquisas biotecnológicas tem permitido um aumento na produção de compostos primários a partir de recursos renováveis em relação aos derivados petroquímicos. Um exemplo de produto primário obtido a partir de resíduos é o ácido 2-hidroxipropanóico, mais usualmente denominado como ácido lático (AL) (ABDEL-RAHMAN *et al*., 2021). O ácido lático é um ácido orgânico de maior ocorrência, pois possui uma alta aplicabilidade na indústria de alimentos, farmacêutica, cosméticos e têxtil, e atua como monômero na síntese de biopolímeros (LIN; WANG, 2007; LIANG; MCDONALD; COATS, 2015).

Em 2021 o mercado mundial de ácido lático estava avaliado em 2,9 bilhões de dólares, sendo a sua maior aplicação no segmento de biopolímeros, representando 28% da aplicabilidade do ácido. Pode-se inferir que essa alta demanda do ácido polilático está relacionado a doença global da COVID-19. Em virtude da pandemia, houve um aumento de preocupações relacionadas a bem-estar e saneamento, e os consumidores preferiram comprar alimentos embalados (GRAND VIEW RESEARCH, 2022). Este comportamento causou um enorme impacto na poluição proveniente do plástico, nesse cenário a indústria de petróleo teve queda nos preços deixando o plástico convencional ainda mais competitivo economicamente e, além disso, houve aumento na produção e descartes de equipamentos de segurança individuais hospitalares, como as máscaras cirúrgicas e ainda houve uma mudança comportamental devido ao *lockdown* que levou as pessoas a realizarem suas compras rotineiras em supermercados e aumentarem o consumo de comidas prontas no sistema de *delivery,* o que levou ao maior consumo de embalagens plásticas. Em Singapura, por exemplo, esse consumo contribuiu para 1400 toneladas a mais de geração de lixo plástico (ADYEL, 2020).

Entre as outras utilidades do ácido lático, o mesmo pode ser usado como matéria-prima para gerar produtos químicos intermediários como ácido acrílico, 1,2-propanodiol, ácido pirúvico, acetaldeído e 2,3-pentanodiona (DAFUL et al., 2016).

A produção microbiana de ácido lático se dá pela metabolização dos açúcares, os quais são preferíveis na sua forma pura, porém materiais amiláceos ou resíduos também podem ser utilizados (KRISHNA et al., 2018; BEITEL et al., 2020). Uma das vantagens dos açúcares na sua forma pura como fonte de carbono é a redução do custo da purificação, mas o seu alto valor encarece o processo de produção de ácido lático. Já os amiláceos não são vantajosos por serem uma fonte alimentar (NWAMBA et al., 2021). Dessa forma, os resíduos contendo açúcar são um modelo de produção sustentável (NWAMBA et al., 2021).

Outro ponto crucial para a produção de ácido lático é a adição de agentes neutralizantes para que o baixo pH gerado pela própria produção do ácido lático não afete o crescimento do microrganismo e consequentemente a produção da molécula de interesse. No entanto, adicioná-los ao meio pode implicar em outras variáveis, como: dependendo da concentração do neutralizante

utilizado, o mesmo pode ser tóxico para as células; ou pode causar a precipitação do ácido lático e depois ser necessário uma etapa a mais para extraí-lo, tornando a etapa de *downstream* cada vez mais dispendiosa e ambientalmente prejudicial (JUTURU; WU, 2015).

Tendo em vista os pontos necessários para diminuir o custo de produção do composto de interesse por meio da fermentação, assim como agregar valor a um material que é descartado, esse estudo busca analisar os principais fatores que podem influenciar no processo. A fonte de carbono deve ser preferencialmente um resíduo, pois agrega valor ao produto uma vez que pode ser utilizado como matéria-prima, além de contribuir ecologicamente propiciando um destino adequado.

Nesse estudo será utilizada a xilose da biomassa da semente de goiaba, resíduo do processamento da fruta como fonte de carbono. Até o presente momento que seja de nosso conhecimento, não há dados na literatura que tenham utilizado este resíduo para a produção de ácido lático a partir de microrganismos. Será utilizado como comparativo de produção o bagaço da cana-de-açúcar, esse resíduo é encontrado em grandes quantidades no território brasileiro, sendo a principal matéria-prima usada para a síntese do ácido lático. Vale salientar que foi utilizado microrganismos do gênero *Weizmannia* sp., anteriormente classificados como *Bacillus* sp.

Adicionalmente nesse estudo foi realizado o isolamento de *Weizmannia* sp. termofílicos e a evolução adaptativa laboratorial para obtenção de cepas tolerantes a ácido foi realizada, já que até o presente momento não há estudos com o mesmo objetivo (produção de ácido lático) utilizando esse gênero. Os relatos existentes utilizam essa mesma abordagem com finalidade de gerar probióticos resistentes ao ácido (LIU *et al*., 2020).

.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, no presente estudo verificou-se que:

(a) Condições anaeróbicas permitem maior produção de ácido lático;

(b) É a primeira vez que é relatada a produção de ácido lático a partir da espécie *Weizmannia ginsengihumi;*

(c) O delineamento experimental mostrou que apenas a fonte de carbono (xilose) e fonte de nitrogênio (peptona e extrato de levedura) são variáveis que influenciaram na produção de ácido lático, e acetato de sódio não é essencial no meio;

(d) A bactéria *W. ginsengihumi* BMI não foi capaz de consumir os resíduos nem para se multiplicar nem para crescer produzir ácido lático;

(e) O isolado *W. coagulans* apresentou uma boa resistência ao ácido, uma vez que foi capaz de se multiplicar em pH 4,65 com uma concentração de 90 mM, mas não houve nenhuma melhora na produção de ácido lático sem a presença do agente neutralizante.

Dessa forma pode-se concluir que a espécie *Weizmannia ginsengihumi* é capaz de produzir o ácido lático, porém em concentrações menores das já descritas na literatura utilizando outras espécies do gênero, mesmo assim é uma cepa que apresenta um potencial para ser utilizada na produção deste ácido a partir de resíduos de frutorefinaria desde que se realize evolução adaptativa laboratorial afim de gerar resistência aos inibidores de crescimento presentes nestes resíduos.

Complementarmente, o planejamento experimental realizado com espécie *Weizmannia ginsengihumi* revelou que a variável acetato de sódio, um dos componentes que compõe o meio de cultivo XYP, e é utilizado na literatura como GYP (Glicose, extrato de levedura e peptona) não é necessário para o crescimento e nem para a produção de ácido lático, mas é interessante realizar mais estudo com diferentes meios de cultivo utilizando essa espécie, além da utilização de outras fontes de carbono.

Por fim, seria atraente realizar mais estudos com *Weizmannia coagulans*, visto que a cepa BLMI foi capaz de tolerar o pH ácido do meio de cultivo. Com o avanço da ciência há muitas ferramentas disponíveis para aprimorar processos e células, como por exemplo a técnica de CRISPR-Cas9, que permite a edição do gene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali; TASHIRO, Yukihiro; SONOMOTO, Kenji. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. **Journal of biotechnology**, v. 156, n. 4, p. 286-301, 2011.

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali; TASHIRO, Yukihiro; SONOMOTO, Kenji. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 6, p. 877-902, 2013.

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali et al. Evaluating the Effect of Lignocellulose-Derived Microbial Inhibitors on the Growth and Lactic Acid Production by Bacillus coagulans Azu-10. **Fermentation**, v. 7, n. 1, p. 17, 2021.

ADYEL, T.M.; Accumulation of plastic waste during COVID-19. **Science Letters**, v. 369, p. 1314-1315, 2020.

AHMAD, Ashfaq; BANAT, Fawzi; TAHER, Hanifa. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: recent developments and challenges. **Environmental Technology & Innovation**, p. 101138, 2020.

AGRAWAL, Deepti; KUMAR, Vinod. Recent progress on sugarcane-bagasse based lactic acid production: Technical advancements, potential and limitations. **Industrial Crops and Products**, v. 193, p. 116132, 2023.

ALEXANDRI, Maria et al. Recent advances in d-lactic acid production from renewable resources: case studies on agro-industrial waste streams. **Food technology and biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 293-304, 2019.

ASH, Carol et al. Phylogenetic heterogeneity of the genus Bacillus revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 202-206, 1991.

BANDO, Yukiko et al. A microbiological study of biohydrogen production from beer lees. **International journal of hydrogen energy**, v. 38, n. 6, p. 2709-2718, 2013.

BEITEL, Susan Michelz et al. High D (−) lactic acid levels production by Sporolactobacillus nakayamae and an efficient purification. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1367-1376, 2016.

BEITEL, Susan Michelz; COELHO, Luciana Fontes; CONTIERO, Jonas. Efficient conversion of agroindustrial waste into D (-) lactic acid by Lactobacillus delbrueckii using fed-batch fermentation. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

BENEVENUTI, Carolina Santos Jordani; PEREIRA JR, Nei. Prospecção tecnológica da produção de ácido lático no contexto de biorrefinaria: Tendências e oportunidades. **Revista ESPACIOS| Vol. 37 (Nº 23) Año 2016**, 2016.

BHANDARI, Vaibhav et al. Molecular signatures for Bacillus species: demarcation of the Bacillus subtilis and Bacillus cereus clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus Bacillus. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, n. Pt_7, p. 2712-2726, 2013.

BOKULICH, Nicholas A.; MILLS, David A. Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism. **Food microbiology**, v. 31, n. 1, p. 126-132, 2012.

BOOTZ, M. PURAC - Líder Mundial na Preservação Natural de Alimentos. Revista Food Ingredients Brasil. FIB - Food Ingredients Brasil, São Paulo, SP, v. 15, p. 19 - 20, setembro, 2010.

CALVO-GARRIDO, Carlos et al. Microbial antagonism toward Botrytis bunch rot of grapes in multiple field tests using one Bacillus ginsengihumi strain and formulated biological control products. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 105, 2019.

CHEN, Gui-Mei et al. Microbial diversity and flavor of Chinese rice wine (Huangjiu): an overview of current research and future prospects. **Current Opinion in Food Science**, v. 42, p. 37-50, 2021.

CHEN, Yun; NIELSEN, Jens. Biobased organic acids production by metabolically engineered microorganisms. **Current opinion in biotechnology**, v. 37, p. 165-172, 2016.

COELHO, Luciana Fontes. Isolamento e seleção de micro-organismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido lático. 2011.

COELHO, Emanuela Monteiro; VIANA, Arão Cardoso; AZEVEDO, Luciana Cavalcanti. Prospecção Tecnológica para o aproveitamento de resíduos industriais, com foco na indústria de processamento de manga. **Cadernos de Prospecção**, v. 7, n. 4, p. 550, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acesso em: https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4977-producao-de-cana-chega-a-610-1-milhoes-de-toneladas-na-safra-2022-23-com-melhora-na-produtividade-nas-lavouras#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20cana%2Dde,em%20rela%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A0%20temporada%20passada.

DAFUL, Asfaw Gezae et al. Environmental impact assessment of lignocellulosic lactic acid production: Integrated with existing sugar mills. **Food and bioproducts processing**, v. 99, p. 58-70, 2016.

DE OLIVEIRA, Regiane Alves et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects. **Biochemical engineering journal**, v. 133, p.219-239, 2018.

DRAGOSITS, Martin; MATTANOVICH, Diethard. Adaptive laboratory evolution–principles and applications for biotechnology. **Microbial cell factories**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2013.
ELFERINK, Stefanie J.W.H.O. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by Lactobacillus buchneri. **Applied and Environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125-132, 2001.

DU, Guocheng; LIU, Long; CHEN, Jian. White biotechnology for organic acids. **Industrial Biorefineries & white biotechnology**, p. 409-444, 2015.

EBRAHIMI, Vida; HASHEMI, Atieh. Challenges of in vitro genome editing with CRISPR/Cas9 and possible solutions: A review. **Gene**, v. 753, p. 144813, 2020.

EITEMAN, Mark A.; RAMALINGAM, Subramanian. Microbial production of lactic acid. **Biotechnology letters**, v. 37, p. 955-972, 2015.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Area: all contries. Production Items: sugar cane e guavas. Year: 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: março de 2021.

GHAFFAR, Tayyba 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.

GAO, Chao; MA, Cuiqing; XU, Ping. Biotechnological routes based on lactic acid productionfrom biomass. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 930-939, 2011.

Grand View Research, Lactic Acid Market Size, Share & Trends Analysis Report by Raw Material (Sugarcane, Corn, Cassava), by Application (Industrial, F&B, Pharmaceuticals, Personal Care, PLA), and Segment Forecasts, 2018 - 2025, San Francisco, 2019. Acesso em: https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market

GUPTA, Radhey S. et al. Robust demarcation of 17 distinct Bacillus species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of Robertmurraya kyonggiensis sp. nov. and proposal for an emended genus Bacillus limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 2020.

HOFVENDAHL, Karin; HAHN–HÄGERDAL, Bärbel. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 2-4, p. 87-107, 2000.

HUANG, Zi-Rui et al. Exploring core functional microbiota responsible for the production of volatile flavour during the traditional brewing of Wuyi Hong Qu glutinous rice wine. **Food microbiology**, v. 76, p. 487-496, 2018.

JARAMILLO, Lizeth Yuliana Acevedo. **Avaliação do PotenciaL Biotecnológico de Linhagens.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2014.

JANTASEE, Sasiradee et al. Potential and assessment of lactic acid production and isolation– a review. **Journal of chemical technology & biotechnology**, v. 92, n. 12, p. 2885-2893,2017.

JEM, K. Jim; TAN, Bowen. The development and challenges of poly (lactic acid) and poly (glycolic acid). **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, v. 3, n. 2, p. 60-70, 2020.

JINEK, Martin et al. A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, 2012.

JOGLEKAR, H. G.; RAHMAN, I.; BABU, S.; KULKARNI B. D.; JOSHI, A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. **Sep. Purif. Technol.**. v.52, p.1-17, 2006.

JOHN, Rojan P.; NAMPOOTHIRI, K. Madhavan; PANDEY, Ashok. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 524-534, 2007.

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

JUTURU, Veeresh; WU, Jin Chuan. Microbial production of lactic acid: the latest development. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 967-977, 2016.

KOMESU, Andrea et al. Lactic acid production to purification: a review. **BioResources**, v. 12, n. 2, p. 4364-4383, 2017.

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

KUMAR, Anil; THAKUR, Avinash; PANESAR, Parmjit Singh. Lactic acid and its separation and purification techniques: A review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 18, n. 4, p. 823-853, 2019.

LEE, Boon Beng; THAM, Heng Jin; CHAN, Eng Seng. Fed-batch fermentation of lactic acid bacteria to improve biomass production: a theoretical approach. **Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 15, p. 2211-2215, 2007.

LEE, Kyung Dong et al. Novel Bacillus ginsengihumi CMRO6 Inhibits Adipogenesis via p38MAPK/Erk44/42 and Stimulates Glucose Uptake in 3T3-L1 Pre-Adipocytes through Akt/AS160 Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4727, 2022.

LI, Chenglong et al. Recent advances in the separation and purification of lactic acid from fermentation broth. **Process Biochemistry**, 2021.

LIANG, Shaobo; MCDONALD, Armando G.; COATS, Erik R. Lactic acid production frompotato peel waste by anaerobic sequencing batch fermentation using undefined mixedculture. **Waste Management**, v. 45, p. 51-56, 2015.

LIU, KaiYue et al. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of Bacillus coagulans. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 14, p. 6363-6373, 2020.

LOGAN, Niall A. et al. Genus I. bacillus. Bergey's manual of systematic bacteriology, v. 3, p. 21-128, 2009.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

Markets anda Markets. Polylactic Acid Market by Grade (Thermoforming, Extrusion, Injection Molding, Blow Molding), Application (Rigid Thermoform, Film & Sheet, Bottles), End-use Industry (Packaging, Consumer Goods, Agricultural, Textile, Biomedical) and Region (2022-2026). Updated on: March 23, 2023. Acesso em: https://www.marketsandmarkets.com/Market-

Reports/polylactic-acid-pla-market-29418964.html?gclid=CjwKCAjwscGjBhAXEiwAswQqNOWmwO_sEFBLORqdSqylASAhZG2gxCqXZnIVA2jOqL3dhTR7K8LMzxoCLCgQAvD_BwE

MARTINEZ, Fabio Andres Castillo et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in food science & technology**, v. 30, n. 1, p. 70-83, 2013.

MATTEY, Michael. The production of organic acids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 1-2, p. 87-132, 1992.

MICHELSON, Tiina et al. L (+)-Lactic acid producer Bacillus coagulans SIM-7 DSM 14043 and its comparison with Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis DSM 20073. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 861-867, 2006.

MODIG, Tobias; LIDEN, Gunnar; TAHERZADEH, Mohammad J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical journal**, v. 363, n. 3, p. 769-776, 2002.

MURPHY, M. G. et al. Oxygen dependent lactate utilization by Lactobacillus plantarum. **Archives of Microbiology**, v. 141, n. 1, p. 75-79, 1985.

NARAYANAN, Niju; ROYCHOUDHURY, Pradip K.; SRIVASTAVA, Aradhana. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. **Electronic journal of Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 167-178, 2004.

NWAMBA, Marknoah Chinenye et al. Trends and hassles in the microbial production of lactic acid from lignocellulosic biomass. **Environmental Technology & Innovation**, p. 101337, 2020.

OHARA, Hitomi; YAHATA, Masahito. L-Lactic acid production by Bacillus sp. in anaerobic and aerobic culture. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 272-274, 1996.

OTTENHEIM, Christoph; NAWRATH, Margarete; WU, Jin Chuan. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2018.

OUYANG, Jia et al. Efficient non-sterilized fermentation of biomass-derived xylose to lactic acid by a thermotolerant Bacillus coagulans NL01. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, p. 2387-2397, 2012.

OUYANG, Jia 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.

PAL, Parimal et al. Process intensification in lactic acid production: a review of membrane based processes. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 11-12, p. 1549-1559, 2009.

PALMQVIST, Eva; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PANDA, Sandeep Kumar et al. Research and production of organic acids and industrial potential. **Bioprocessing for Biomolecules Production**, p. 195-209, 2019.

PANDA, Sandeep Kumar et al. Research and production of organic acids and industrial potential. **Bioprocessing for Biomolecules Production**, p. 195-209, 2019.

PATEL, Milind A. et al. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3228-3235, 2006.

PATEL, Sudip; GUPTA, Radhey S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus Bacillus: Proposal for six new genera of Bacillus species, Peribacillus gen. nov., Cytobacillus gen. nov., Mesobacillus gen. nov., Neobacillus gen. nov., Metabacillus gen. nov. and Alkalihalobacillus gen. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 1, p. 406-438, 2020.

PAYOT, T.; CHEMALY, Z.; FICK, M. Lactic acid production by Bacillus coagulans—kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 191-199, 1999.

PEDRESCHI, Ricardo. Aproveitamento de bagaço de cana da indústria sucroalcooleira na produção de painéis de aglomerados. 2009. 61 f. 2009. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia da Madeira) -Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2009

PENG, Kaidi et al. Recent insights in the impact of emerging technologies on lactic acid bacteria: A review. **Food Research International**, p. 109544, 2020.

POHANKA, Miroslav. D-Lactic Acid as a Metabolite: Toxicology, Diagnosis, and Detection. **BioMed Research International**, v. 2020, 2020.

POUDEL, Pramod; TASHIRO, Yukihiro; SAKAI, Kenji. New application of Bacillus strains for optically pure l-lactic acid production: general overview and future prospects. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 80, n. 4, p. 642-654, 2016.

QUATRAVAUX, S. et al. Examination of Lactobacillus plantarum lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. **Journal of applied microbiology**, v. 101, n. 4, p. 903-912, 2006.

RAWOOF, Salma Aathika Abdur et al. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p. 1-18, 2020.

REDDY, Gopal et al. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation—a review. **Biotechnology advances**, v. 26, n. 1, p. 22-34, 2008.

RICCI, Annalisa et al. In vitro metabolism of elderberry juice polyphenols by lactic acid bacteria. **Food chemistry**, v. 276, p. 692-699, 2019.

RISTERUCCI, Ange-Marie et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from Psidium guajava L. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 4, p. 745-748, 2005.

RODRIGUES, C. et al. Production and application of lactic Acid. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier. p. 543-556. 2017.

SCHROEDTER, Linda et al. L-(+)-Lactic Acid from Reed: Comparing Various Resources for the Nutrient Provision of B. coagulans. **Resources**, v. 9, n. 7, p. 89, 2020.

SCHROEDTER, Linda et al. Biorefinery Concept Employing Bacillus coagulans: LX-Lignin and L-(+)-Lactic Acid from Lignocellulose. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1810, 2021.

SILVEIRA, MÁRCIA LILIANE RIPPEL et al. Aproveitamento tecnológico das sementes de goiaba (Psidium guajava L.) como farinha na elaboração de biscoitos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 34, n. 2, 2017.

SINGHVI, Mamata; ZENDO, Takeshi; SONOMOTO, Kenji. Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and future prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 14, p. 5911-5924, 2018.

SU, Fei; XU, Ping. Genomic analysis of thermophilic Bacillus coagulans strains: efficient producers for platform bio-chemicals. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2014.

TAIB, Nur-Azzah Afifah Binti et al. A review on poly lactic acid (PLA) as a biodegradable polymer. **Polymer Bulletin**, v. 80, n. 2, p. 1179-1213, 2023.

TANAKA, K. et al. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium Lactococcus lactis IO-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 160-167, 2002.

TEN et al. Bacillus ginsengihumi sp. nov., a Novel Species Isolated from Soil of a Ginseng Field in Pocheon Province, South Korea. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 10, p. 1554-1560, 2006.

THOMAS, T. D.; MCKAY, L. L.; MORRIS, H. A. Lactate metabolism by pediococci isolated from cheese. **Applied and environmental microbiology**, v. 49, n. 4, p. 908-913, 1985.

TIAN, Xiwei et al. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by Lactobacillus paracasei. **Bioresource Technology**, v. 323, p. 124549, 2021.

UPADHYAYA, Bikram P.; DEVEAUX, Linda C.; CHRISTOPHER, Lew P. Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 637-644, 2014.

VAN DER POL, Edwin C. et al. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio) chemicals and fuels. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, p. 9579-9593, 2014.

VAN DER POL, Edwin et al. Precultivation of Bacillus coagulans DSM2314 in the presence of furfural decreases inhibitory effects of lignocellulosic by-products during l (+)-lactic acid fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 10307-10319, 2016.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. **Chemical and biochemical engineering quarterly**, v. 22, n. 2, p. 245-264, 2008.

VISHNU, C.; SEENAYYA, G.; REDDY, Gopal. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L (+) lactic acid using Lactobacillus amylophilus GV6. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 429-433, 2002.

WALTON, Sara L. et al. Production of lactic acid from hemicellulose extracts by Bacillus coagulans MXL-9. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 823-830, 2010.

WANG, Limin et al. Efficient production of L-lactic acid from corncob molasses, a waste by-product in xylitol production, by a newly isolated xylose utilizing Bacillus sp. strain. **Bioresource technology**, v. 101, n. 20, p. 7908-7915, 2010.

WANG, Yiwu et al. Signature of dissolved organic matter and microbial communities based on different oxygen levels response during distillers dried grains with solubles plus sugarcane pith co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 349, p. 126868, 2022.

WEE, Young-Jung; KIM, Jin-Nam; RYU, Hwa-Won. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163-172, 2006.
YANG, Peng-Bo et al. Effect of different types of calcium carbonate on the lactic acid fermentation performance of Lactobacillus lactis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, p. 38-46, 2015.

YANKOV, Dragomir. Fermentative Lactic Acid Production From Lignocellulosic Feedstocks: From Source to Purified Product. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, p. 93, 2022.

YE, Lidan 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.

ZHANG, Yuming et al. Heterologous expression and biochemical characterization of a thermostable xylulose kinase from Bacillus coagulans IPE22. **Journal of basic microbiology**, v. 59, n. 5, p. 542-551, 2019.

ZHENG, Zhaojuan et al. Enhanced L-lactic acid production from biomass-derived xylose by a mutant Bacillus coagulans. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 173, p. 1896-1906, 2014.

ZHOU, Yuwen et al. Microbial engineering for the production and application of phytases to the treatment of the toxic pollutants: A review. **Environmental Pollution**, p. 119703, 2022.

ZIADI, Manel et al. Bioreactor Scale-Up and Kinetic Modeling of Lactic Acid and Biomass Production by Enterococcus faecalis SLT13 during Batch Culture on Hydrolyzed Cheese Whey. **Journal of Chemistry**, v. 2020, 2020.