
**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**

**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

S237u Santos, Larissa Provasi
Utilização de xilose para a produção de ácido láctico 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 láctico. 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.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: UTILIZAÇÃO DE XILOSE PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO 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 (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro

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

Prof. Dr. CAURÉ BARBOSA PORTUGAL (Participação 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 lignocelulósica (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 despreziosa 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 láctico 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 láctico, 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 láctico, 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 láctico 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 láctico e o consumo da fonte de carbono foi realizada em HPLC. Dos isolados selecionados dois foram considerados promissores para a produção de ácido láctico, sendo que *Weizmannia coagulans* BLMI apresentou maior produção de ácido láctico em anaerobiose, chegando a $21,93 \pm 0,9$ g/L e rendimento de 69,18 %, e a cepa *Weizmannia ginsengihumi* BMI foi capaz de produzir $19,79 \pm 0,8$ 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 láctico, o DCCR foi realizado com essa cepa. O DCCR 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 $20,02 \pm 0,19$ g/L e produtividade de 0,55 g/L/h após 36 horas de fermentação, e uma concentração de açúcar residual de $12,59 \pm 0,51$ g/L. A fermentação utilizando os hidrolisados da semente de goiaba e bagaço de cana-de-açúcar apresentaram uma produção de ácido láctico de $0,18 \pm 0,02$ e $1,26 \pm 0,37$ 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 láctico 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 $7,70 \pm 0,43$ e $6,47 \pm 0,9$ 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 $7,96 \pm 0,35$ g/L e BLMI 171 produziu $8,11 \pm 0,08$ g/L após 48 horas de fermentação. Dessa forma, *Weizmannia* sp. foi capaz de fermentar a xilose para a produção de ácido láctico em anaerobiose, apesar da cepa BMI não ser capaz de crescer e nem produzir o ácido láctico a partir dos resíduos. BLMI demonstrou boa resistência cultivada em meio com pH de 4,65, mas para a produção de ácido láctico 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 Erlenmeyer 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 DCCR 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 láctico.....	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 láctico 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 <i>Weizmannia coagulans</i> BMAI (linha tracejada cinza) e <i>Weizmannia ginsengihumi</i> 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 <i>Weizmannia</i> 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 <i>Weizmannia</i> 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 láctico pelos isolados <i>Weizmannia</i> 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 <i>Weizmannia</i> 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 láctico (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 <i>Weizmannia</i> 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 <i>Weizmannia</i> 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 láctico pelos isolados de <i>Weizmannia</i> 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 <i>Weizmannia</i> 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 láctico 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 láctico por <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> BMI em 48h de fermentação.	52
Figura 20 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de AL por <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> BMI em função das variáveis fonte de nitrogênio (X_2) e acetato de sódio (X_3).	56
Figura 23 - Produção de ácido acético por <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 láctico (AL) e ácido acético (AA), e consumo de xilose por <i>W. ginsengihumi</i> BMI. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 72h.	73
Figura 38 - Perfil de crescimento de <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> BMI em meio XYP. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação.	76
Figura 41 – Produção de ácido láctico por <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. coagulans</i> BLMI e <i>W. coagulans</i> 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 láctico pelas cepas <i>W. coagulans</i> BLMI e <i>W. coagulans</i> 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 <i>W. coagulans</i> BLMI e <i>W. coagulans</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> BMI empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR).	52
Tabela 10 - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> 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 <i>W. ginsengihumi</i> BMI empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).	64
Tabela 13 - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de <i>W. ginsengihumi</i> 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 láctico
ALE	<i>Adaptative Laboratory Evolution</i>
ARTP	<i>Atmospheric and Room-Temperature Plasma</i>
BAL	Bactérias do Ácido Lático
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
D.O.	Densidade Óptica
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPBEN	Instituto de Pesquisa em Bioenergia
XYP	<i>Xylose-Yeast-Peptone</i>
LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NC-IUB	<i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry</i>

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 láctico	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 <i>W. coagulans</i> 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-hidroxiopropanóico, mais usualmente denominado como ácido láctico (AL) (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2021). O ácido láctico 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 láctico 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 láctico, 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 láctico 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 láctico. 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 láctico é a adição de agentes neutralizantes para que o baixo pH gerado pela própria produção do ácido láctico não afete o crescimento do microrganismo e conseqüentemente 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 láctico 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 láctico 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 láctico. 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 láctico) utilizando esse gênero. Os relatos existentes utilizam essa mesma abordagem com finalidade de gerar probióticos resistentes ao ácido (LIU *et al.*, 2020).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos são amplamente distribuídos na natureza, e importantes componentes químicos como base para a biotecnologia, sua demanda vem aumentando consideravelmente por conta da limitação dos recursos fossilíferos (MAYTI, 2015).

Os ácidos orgânicos têm como característica o fato de apresentarem carbono em sua estrutura, baixo massa molecular e estrutura simples contendo um ou mais grupos carboxílicos, e também são menos reativos que os ácidos inorgânicos, portanto são caracterizados por propriedades ácidas fracas e não se dissocia completamente em água. Por conta das suas propriedades e aplicações os ácidos orgânicos são bastante utilizados no mercado, sendo os mais comuns o acético, o prôpionico, o láctico, o cítrico e o succínico (DU; LIU; CHEN, 2015; PANDA *et al.*, 2016; PANDA *et al.*, 2020).

Seres do reino animal, vegetal e microbiano são capazes de sintetizar essas moléculas. A maioria dos ácidos orgânicos são geralmente subproduto do processo fermentativo, por tanto ocorrem nas principais vias metabólicas dos microrganismos (MATTEY, 1992; CHEN; NIELSEN, 2016).

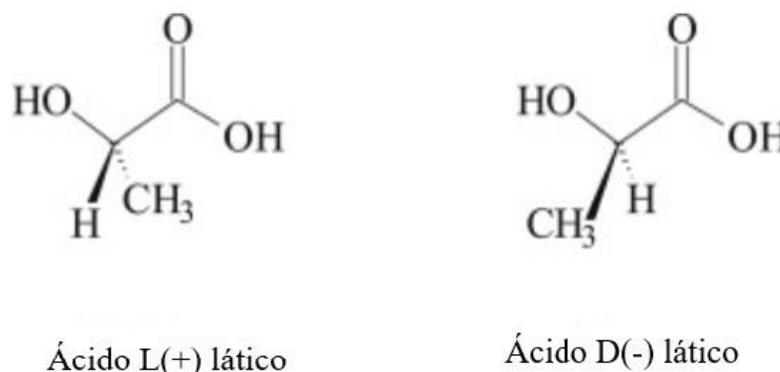
2.2 ÁCIDO LÁTICO

O ácido 2-hidroxiopropanóico ($\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$) conhecido também como ácido lático, é um dos ácidos orgânicos de maior ocorrência (AGRAWAL; KUMAR, 2023). Esse composto foi descoberto em meados de 1780 pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele, que isolou o ácido lático de leite azedo. Até 1857 o composto foi considerado um componente do leite, quando Louis Pasteur descobriu outro fenômeno e postulou o ácido lático como um metabólito de fermentação gerado por determinados microrganismos (GHAFAR *et al.*, 2014; BENEVENUTI; PEREIRA, 2016).

Esse ácido orgânico contém três funções químicas, sendo um átomo de carbono terminal representado pela função ácido carboxílico, o outro átomo de carbono terminal é um hidrôcarboneto, e por fim o átomo de carbono central que é uma função álcool (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004; BENEVENUTI; PEREIRA, 2016). Entre as propriedades do ácido lático destaca-se sua solubilidade em água e solventes orgânicos miscíveis com a água, mas insolubilidade em outros solventes orgânicos, baixa volatilidade (16,8 °C), ponto de ebulição de 82 °C à 0,5 mm Hg e massa molar de 90,08 g (NARAYANAN; ROYCHOUDHURY; SRIVASTAVA, 2004).

Pode-se encontrar esse ácido orgânico em duas formas enantioméricas, como ácido L(+) lático e ácido D(-) lático (RICCI *et al.*, 2019), como observado na Figura 1. O sinal (+) ou (-) indica a direção de rotação da luz polarizada no plano dada por um produto químico, mas ambos os enantiômeros possuem propriedades químicas e físicas idênticas na sua forma pura (JEN; TAN, 2020). Segundo Pohanka (2020), L(+) é um composto endógeno, sendo o L-lactato encontrado no sangue humano a uma concentração de 0,5 a 1 mmol/L. Enquanto o D(-) ácido lático é um enantiômero que não está envolvido nos processos metabólicos básicos da maioria das formas de vida, com exceção das bactérias do ácido lático (BAL) (JUODEIKIENE, *et al.*, 2015; PENG *et al.*, 2020).

Figura 1 - Fórmula estrutural das duas formas enantioméricas do ácido láctico.



Fonte: Modificado de Jen e Tan (2020).

2.3 MERCADO DO ÁCIDO LÁTICO

O ácido láctico possui um grande valor comercial devido a sua gama de aplicabilidade, como acidulante, conservante e intermediários para muitos produtos. Com isso a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA classificou como GRAS (geralmente considerado como seguro), podendo assim ser utilizado na indústria alimentícia, como também na indústria química, farmacêutica e de cosméticos (RODRIGUES *et al.*, 2017).

Na indústria alimentícia é adicionado ácido láctico em carnes processadas por exemplo, pois prolonga a vida útil do produto, realça o sabor e consegue auxiliar no controle contra patógenos de origem alimentar. O ácido láctico desempenha um papel de aromatizante, acidulante, regulador de pH, controle da qualidade microbiana e fortificação mineral (WEE; KIM; RUY, 2006).

Já no mercado de cosméticos o ácido láctico é utilizado por conta dos seus efeitos umectantes, antimicrobianos, rejuvenescedor, clareador de pele, hidratante, anti-tártaro e anti-acne (MARTINEZ *et al.*, 2013).

Outra aplicação do ácido láctico é como monômero de matéria-prima para a síntese do ácido polilático, um polímero biodegradável utilizado na confecção de matérias como embalagens de alimentos, filme para cobertura (*mulching*), sacos de lixo e roupas de proteção (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN; VIRUTHAGIRI, 2008). O mercado global desse polímero foi avaliado em 1 bilhão de dólares em 2021, e está projetado para atingir 1,9 bilhões de dólares em 2026, com uma taxa de crescimento em 12,2% de 2021 para 2026 (MARKETS AND MARKETS, 2023).

O mercado de ácido láctico e seus derivados de ácido polilático estão entre os mais importantes da indústria química (ZIADI *et al.*, 2020). Para o ano de 2022 a estimativa do mercado mundial de ácido láctico estava em torno de 3,1 bilhões de dólares, e espera-se que entre 2023 e 2030 a taxa de crescimento anual seja de 8% (GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

A empresa Corbion Purac da Holanda é uma das mais conhecidas no mercado, produz tanto o L(+) quanto o D(-) ácido láctico. Atendendo diferentes setores, com um mercado dividido em insumos de panificação, laticínios, produtos bioquímicos, produtos da área médica, biopolímeros, entre outros (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018). No Brasil existem algumas empresas que produzem ácido láctico, entre elas temos: Corbion Purac (BOOTZ, 2010), Galactic Brasil, Nanobiomatrix e outras, são exemplo de filiais encontradas no território brasileiro.

O aumento da demanda por ácido láctico ocorre por vários motivos, como a crescente demanda por produtos ecologicamente corretos e o aumento dos preços dos produtos derivados da petroquímica, assim como das reservas limitadas de energia fóssil (ZIADI *et al.*, 2020; TAIB *et al.*, 2022).

2.4 SÍNTESE QUÍMICA E BIOLÓGICA

O ácido láctico pode ser produzido tanto pela via química quanto bioquímica. A primeira é realizada principalmente pela rota da lactonitrila, onde se utiliza cianeto de hidrogênio e acetaldeído sob pressão elevada, resultando na formação de lactonitrila. Posteriormente, a lactonitrila passa pelo processo de destilação e é hidrolisada com ácido clorídrico ou sulfúrico para produzir ácido láctico e o sal de amônio. O ácido láctico é esterificado com metanol, formando então lactato de metila, o qual é recuperado e purificado por destilação, e hidrolisado com água acidificada para produzir ácido láctico e metanol, esse por sua vez é destilado e reciclado (KOMESU *et al.*, 2017; RAWOOF *et al.*, 2020).

Há também outras rotas químicas, como a degradação catalisada por base de açúcares; oxidação de propilenoglicol; reação de acetaldeído, monóxido de carbono e água em altas temperaturas e pressões; hidrólise do ácido dicloro propiônico; e oxidação de ácido nítrico de propileno, no entanto essas sínteses não são economicamente viáveis (GAO; MA; XU, 2011).

Uma das desvantagens da síntese química é a mistura racêmica de ácido L(+) e D(-) láctico, afetando as propriedades físicas e químicas do PLA, por exemplo, pois o polímero será termicamente e mecanicamente instável, apresentando uma vida útil curta. E a purificação dos enantiômeros não é vantajosa, uma vez que gasta solventes e não é um processo ambientalmente viável (JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2007; ALEXANDRINI *et al.*, 2019).

Por outro lado, temos a síntese bioquímica do ácido láctico, a qual é responsável pela maior parte da produção mundial de ácido 2-hidroxiopropiônico. O processo de fermentação para a produção de ácido láctico possui diversas vantagens em relação a síntese química, como utilização de substratos de baixo custo, temperaturas inferiores, há um menor consumo de energia, alta pureza dos enantiômeros e menores impactos ambientais (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2011). Mesmo assim, a fermentação do ácido láctico enfrenta problemas, pois há uma menor

produtividade e os custos envolvidos nos processos de *downstream* são bastante elevados (ALEXANDRINE *et al.*, 2019).

2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM NA FERMENTAÇÃO DO ÁCIDO LÁTICO

A produção biológica do ácido lático é mensurada pela concentração, rendimento e produtividade desse ácido, podendo ser induzida por diferentes fatores, como a temperatura, pH, microrganismos e fonte de carbono. E esses fatores são dependentes entre si, conforme o substrato escolhido, apenas determinados microrganismos conseguem se multiplicar, esses por sua vez dependem de uma faixa de temperaturas e pH para realizar suas funções metabólicas (HOFVENDAHL; HANH-HÅGERDAL, 2000).

2.5.1 Microrganismo

As bactérias do ácido lático (BAL) são um grupo de microrganismos estudados desde meados do século 20, que produzem ácido lático como principal produto metabólito por meio da fermentação de carboidratos. O grupo apresenta características bem definidas; são gram-positivos, heterótrofos, não formadoras de esporos que exigem requisitos nutricionais complexos, pois carecem de muitas capacidades biossintéticas (REDDY *et al.*, 2008). O gênero *Bacillus* apesar de possuir espécies produtoras de ácido lático, não pertencem ao grupo das BAL. No entanto, esse gênero vem ganhando destaque por apresentar vantagens em relação às BAL, como por exemplo redução no custo de produção de ácido lático (POUDEL; TASHIRO; SAKAI, 2015).

O gênero *Weizmannia* consiste em três espécies, sendo *W. coagulans*, *W. ginsengihumi* e *W. acidiproducens*. Essas espécies constituíam o clado Coagulans que pertenciam ao gênero *Bacillus*. Recentemente foi proposto uma reorganização do gênero *Bacillus*, onde foram realizadas análises genômicas comparativas e filogenéticas em 352 sequências gênicas pertencentes a família Bacillaceae para esclarecer as relações evolutivas, uma vez que a taxonomia do grupo não estava bem elucidada, pois os critérios utilizados para a classificação eram imprecisos e permitiu a adição de inúmeras espécies ao gênero (GUPTA *et al.*, 2020).

Dessa forma, foi sugerido que 17 clados de *Bacillus* fossem reconhecidos como novos gêneros, sendo eles *Alteribacter*, *Ectobacillus*, *Evansella*, *Ferdinandcohnia*, *Gottfriedia*, *Heyndrickxia*, *Lederbergia*, *Litchfieldia*, *Margalitia*, *Niallia*, *Priestia*, *Robertmurraya*, *Rossellomorea*, *Schinkia*, *Siminovitchia*, *Sutcliffeiella* e *Weizmannia* (GUPTA *et al.*, 2020).

As espécies do gênero *Weizmannia* são bactérias formadoras de endosporos, aeróbias ou anaeróbias facultativa, gram-positivas, com formato de bastonete, possuem mobilidade, com exceção de *W. ginsengihumi* que é imóvel (GUPTA *et al.*, 2020). *Weizmannia coagulans* é uma espécie que vem ganhando notoriedade devido a suas características vantajosas relacionadas a

requisitos de crescimento, como: faixa de temperatura entre 50 e 60 °C, necessidades nutricionais simples e alta pureza óptica do enantiômero L(+) ácido láctico (MICHELSON *et al.*, 2006; SCHROEDTER *et al.*, 2020).

2.5.2 Fontes de carbono

Diferentes tipos de substratos podem ser utilizados como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo. O açúcar na sua forma pura, como a glicose é uma excelente fonte de carbono, pois é um substrato sem impurezas, o que facilita na etapa de *downstream*, no entanto açúcares de alta pureza apresentam custo elevado (VISHNU; SEENAYYA; REDDY, 2002). Levando em consideração que a fonte de carbono é um dos fatores que contribuem para o encarecimento da produção de ácido láctico, a utilização de resíduos é uma excelente opção, uma vez que esses são substratos de baixo custo, além de contribuir com um descarte adequado preservando o meio ambiente (JARAMILLO, 2014; YANKOV, 2022).

A safra de cana-de-açúcar de 2022/2023 está estimada em 610 milhões de toneladas, com um aumento de 5,4% em relação à safra anterior (CONAB, 2023), essa gramínea é usada para produzir açúcar e etanol. Da moagem da cana-de-açúcar sobra o bagaço, um material lignocelulósico que é utilizado pelas próprias usinas como fonte de energia, mesmo assim o bagaço ainda representa o maior resíduo da agroindústria. (PEDRESCHI, 2009).

O bagaço de cana-de açúcar contém componentes que não foram extraídos durante a moagem como os componentes da parede celular, sendo eles celulose, hemicelulose e lignina. A hemicelulose ou xilana, é um heteropolímero constituída por pentoses (xilose e arabinose), hexoses e/ou ácidos urônicos (SOARES, 2012).

Outro setor da agroindústria que gera grandes quantidades de resíduo é o da fruticultura, os quais podem conter um alto nível de vitaminas, sais minerais e outros componentes, e com isso surge a necessidade de encontrar novas maneiras de realizar o aproveitamento da casca, semente ou bagaço das frutas (COELHO; VIANA; AZEVEDO, 2014). Entre as frutas comercializadas no mercado brasileiro, destaca-se a *Psidium guajava* conhecida popularmente como goiaba, um fruto nativo da América do Sul com ampla distribuição nas regiões tropicais da América (RISTERUCCI, 2005).

Segundo informações obtidas da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) (2021), do ano de 2009 até o ano de 2019 a produção da goiaba no Brasil aumentou em 166%, mais da metade dessa produção é destinada à indústria para confecção de doces, sucos, geleias, polpa congelada, entre outros. Entretanto, no decorrer das etapas de aproveitamento do fruto as cascas e as sementes não são aproveitadas representando uma dificuldade para as indústrias alimentícias que não são capazes de realizar um descarte adequado (SILVEIRA *et al.*, 2017). Para

agregar valor a esse resíduo, os açúcares da biomassa da semente de goiaba podem ser utilizados por microrganismos para a produção de ácido lático.

2.5.3 pH do meio de cultivo

Os microrganismos toleram determinada faixa de pH no entanto, ao longo do processo fermentativo ocorre uma diminuição do pH justamente pela produção do metabólito ser um ácido. O metabolismo dos microrganismos utilizados para a produção do ácido lático é então inibido por conta do pH reduzido, com isso há uma diminuição do crescimento celular e conseqüentemente uma diminuição na produção de ácido lático (UPADHYAYA; DEVEAUX; CHRISTOPHER, 2014; EITEMAN; RAMALINGAM, 2015). A inibição do metabolismo celular se dá por conta da permeabilidade do ácido lático à membrana celular, dessa forma o composto se acumula no interior da célula e acaba por romper a membrana plasmática, levando à morte celular (RAWOOF *et al.*, 2020).

Com isso, para manter o pH na faixa ideal de crescimento destes microrganismos é necessário adicionar agentes neutralizantes como, carbonato de cálcio, hidróxido de cálcio, amônia, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio. Os mais eficazes são a amônia, hidróxido de sódio e hidróxido de potássio, pois não produzem sulfato de cálcio como subproduto, a amônia no entanto é tóxica para a célula (YANG *et al.*, 2015).

Atrelado a necessidade da utilização de agentes neutralizantes, a etapa de *downstream* acaba sendo comprometida, com isso a recuperação do ácido lático representa 50% do custo total do processo, além de ser um ponto que afeta diretamente na qualidade e rendimento do produto (OUYANG *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2021).

Caso se obtenha um microrganismo capaz de tolerar as faixas de pH da produção do ácido lático, diminuiria os custos na etapa de *downstream*, e isto é possível com a técnica de evolução adaptativa laboratorial (*Adaptative Laboratory Evolution - ALE*) (SINGHVI; ZENDO; SONOMOTO, 2018). A ALE permite o desenvolvimento de microrganismos por um período prolongado em condições bem definidas, permitindo apenas que células capazes de sobreviver as condições impostas consigam se desenvolver, selecionando desta maneira apenas os fenótipos melhorados (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

2.5.4 Temperatura

A temperatura é uma variável significativa no crescimento celular e na concentração do produto de interesse, pois os microrganismos exigem diferentes faixas de temperatura para que seus processos metabólicos ocorram de maneira eficiente (MADIGAN *et al.*, 2016). A fermentação pode ser conduzida em temperatura ambiente (15-27 °C), mesofílico (25-40 °C), termofílico (40- 65 °C),

termofílico extremo (65-80 °C) e hipertermofílico (temperaturas superiores a 80 °C) (RAWOOF *et al.*, 2020).

Outra barreira encontrada na fermentação para a produção de ácido lático, é o custo operacional referente a esterilidade. Os microrganismos utilizados na indústria para a produção de ácido lático geralmente são os mesofílicos, por tanto o meio deve ser esterilizado para não ocorrer a contaminação. Em prática, não esterilizar eliminaria custo de mão de obra, reduziria o consumo de energia e descartaria a utilização de equipamentos de esterilização (GAO; MA; XU *et al.*, 2011)

Para um aumento na produção, e redução dos riscos relacionados a contaminação é desejável microrganismos que tolerem temperaturas mais elevadas (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013). Os *Weizmannia* sp. (antigo gênero *Bacillus* sp.) possui diversos estudos na literatura por ser um produtor de ácido lático termotolerante, pois além das vantagens já citadas, *Weizmannia coagulans* por exemplo, é capaz de manter suas atividades enzimáticas mesmo em altas temperaturas e realizar o processo de sacarificação e fermentação simultânea de subprodutos lignocelulósicos (OUYANG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2018; SCHROEDTER *et al.*, 2020; SCHROEDTER *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produção de ácido lático a partir de xilose por novos isolados de *Weizmannia* sp. termofílicos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolamento de *Weizmannia* sp. termofílicos;
- Produção de ácido lático utilizando xilose como fonte de carbono;
- Estudo da influência da fonte de carbono, assim como dos componentes do meio de cultivo na produção de ácido lático, utilizando Planejamento Experimental como ferramenta para otimizar o processo de fermentação;
- Produção de ácido lático utilizando a xilose presente na biomassa da semente da goiaba como fonte de carbono, e do bagaço da cana-de-açúcar.
- Obtenção de cepa resistente a alteração de pH gerada a partir da produção de ácido lático por meio de evolução adaptativa laboratorial (ALE);

4 METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado seguindo as etapas descritas a seguir:

(a) Isolamento das cepas do bagaço de cana-de-açúcar, seguida de cultivo e identificação por PCR e sequenciamento utilizando o 16S rDNA.

(b) Curva de crescimento das duas espécies de *Weizmannia* em meio XYP.

(c) Fermentação dos 5 isolados selecionados em atmosfera de oxigênio e atmosfera de nitrogênio para quantificação da produção de ácido lático, ácido acético, consumo do substrato e crescimento.

(d) Planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) analisando os componentes do meio de cultivo: fonte de carbono (xilose), fonte de nitrogênio (extrato de levedura e peptona) e acetato de sódio, para otimizar a produção de ácido lático pelo isolado *Weizmannia ginsengihumi* BMI.

(e) Fermentação utilizando os resíduos bagaço de cana-de-açúcar e biomassa da semente de goiaba como fonte de carbono para a produção de ácido lático em anaerobiose.

(f) Evolução Adaptativa Laboratorial (ALE) com o isolado *Weizmannia coagulans* BLMI em meio XYP com aumento gradual de ácido lático em aerobiose.

(g) Fermentação com a cepa selvagem e evoluída, obtida na ALE para comparar o crescimento, produção de ácido lático e consumo do substrato com a cepa selvagem (não evoluída).

4.1 MEIOS DE CULTURA

4.1.1 Lysogeny Broth (LB)

O meio utilizado para a reativação dos microrganismos foi o *Lysogeny Broth* (LB) composto por (g/L): triptona bacteriológica- 10; extrato de levedura- 5; e cloreto de sódio- 10.

4.1.2 Meio xilose-extrato de levedura-peptona (XYP)

Este meio foi utilizado para o preparo do inóculo e para as fermentações, sua composição consiste em (g/L): xilose- 20; extrato de levedura- 10; peptona- 10; acetato de sódio-10; e solução de sais- 0,005. A solução de sais consiste em (g/L): MgSO₄.7H₂O- 40; MnSO₄.4H₂O- 1,6; FeSO₄.7H₂O- 2; e NaCl- 2, pH 6,8 (modificado de COELHO *et al.*, 2020).

4.2 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos de interesse foram isolados do bagaço de cana-de-açúcar da usina Granelli (22° 38 '75,34" S, 47° 54' 90,08" O), localizada no município de Charqueada, São Paulo, Brasil.

Para o isolamento dos potenciais microrganismos produtores de ácido láctico, aproximadamente 1 g de amostra de bagaço de cana-de-açúcar foi ressuspensa em 50 mL de meio XYP, descrito no item 4.1.2. mantido em banho-maria a 80° C por 10 min. Em seguida os frascos foram incubados por 24 horas a 50 °C e 150 rpm, seguido de incubação estática em estufa bacteriológica.

Após o período de incubação, foi realizada a diluição seriada em solução salina (0,85%) de 10^{-1} a 10^{-6} , desses adiciona-se 100 µL em placa de Petri contendo o meio ágar XYP com adição de 12 g/L de carbonato de cálcio. As alíquotas de solução salina foram submetidas a técnica de espalhamento com o auxílio da alça de Drigalski. As placas então foram incubadas por 48 horas a 50 °C.

Após, escolheram-se colônias com formação de halo, as quais foram purificadas pelo método do esgotamento por estria, em placa de Petri contendo meio ágar XYP com adição de carbonato de cálcio. Após 48 horas de incubação a 50 °C, os isolados foram obtidos.

Os isolados obtidos, foram conservados a -80°C, em tubos criogênicos contendo 1:1 de meio de cultura líquida (LB) e glicerol 40%, além do armazenamento a temperatura ambiente após liofilização dos microrganismos com 20% de leite desnatado.

4.2.1 Seleção dos microrganismos

Os isolados selecionados foram submetidos a fermentação por 48 h, com retirada de amostra no final do processo para determinar a produção de ácido láctico. O inóculo foi preparado a partir da cultura estoque, ativada em caldo LB, descrito no item 4.1.1. Após 24 horas, a cultura foi transferida para um pré- inóculo contendo 25 mL de meio XYP.

As fermentações foram realizadas em Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio XYP e 2,5 mL do inóculo. O cultivo foi mantido a 50 °C, 150 rpm e estáticos em estufa bacteriológica. Ao final das 48 horas retirou-se 1 mL de amostra do cultivo, centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 minutos a 20 °C, o sobrenadante foi armazenado para a posterior quantificação de ácido láctico.

4.2.2 Identificação por coloração de Gram

As linhagens isoladas que apresentaram uma maior produção de ácido láctico sem o agente neutralizante foram caracterizadas pela coloração de Gram. Amostras de 1 mL dos inóculo crescidos em meio XYP foram centrifugadas por 10 min a 12.000 x g obtendo o pellet de células.

O pellet foi então ressuspensa em água ultrapura, posteriormente 10 µL de biomassa foi pipetado em uma lâmina para a fixação de células por calor. Adicionou-se a solução de violeta

genciana por 1 min., seguido de lavagem com água destilada por 2 segundos e adicionou-se lugol por 30 segundos, por fim foi feita a descoloração com álcool por 10 segundos.

Depois a lâmina foi lavada com água destilada por 2 segundos, e foi adicionado ao fixado de células solução de fucsina por 1 minuto, por fim o excesso de corante foi retirado com água destilada e a lâmina seca com papel macio. As lâminas foram posteriormente observadas em microscópio óptico Primo Star (Carl Zeiss, Alemanha) em óleo de imersão, com aumento de 1000x.

4.2.3 Identificação molecular dos microrganismos

4.2.3.1 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA as linhagens foram cultivadas em meio LB e incubadas em agitador orbital por 24 horas, 50° C a 150 rpm. Posteriormente 1 mL do meio foi adicionado em tubos de polipropileno do tipo eppendorf, centrifugados a 12.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet utilizado para a extração do DNA utilizando o kit *Illustra Bacteria GenomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.3.2 Amplificação do gene 16S rDNA

A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram utilizados os *primers* universais para a detecção de 16S rDNA, o *primer* 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e o 1492RT (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (SANTOS *et al.*, 2019). Além disso, cada reação continha: tampão 1X + 2,5 mM de MgCl; 0,2 mM de dNTP's; 10 pM de cada *primer*; 1,0 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA); 5 µL da amostra de DNA; em uma solução com volume final de 50 µL.

A reação de amplificação foi realizada no termociclador MaxyGene II (Axygen, EUA), programado para realizar uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguido de 35 ciclos, sendo as etapas compostas por desnaturação a 95°C por 30 seg., anelamento a 60 °C por 30 seg. e extensão a 72°C por 1 min. Após a amplificação, 10 µL da reação de PCR das amostras foram avaliados por meio de eletroforese.

4.2.3.3 Eletroforese em gel de agarose 1%

A eficiência da extração do DNA e amplificação de 16S rDNA foi determinada por meio da visualização do material por eletroforese em gel de agarose 1%. O gel de agarose foi preparado

utilizando TAE 1x (Tris-acetato EDTA) contendo 0,01% de brometo de etídio para a visualização do DNA, em uma corrida de 100 V, utilizando como padrão para análise do tamanho dos *amplicons* obtidos o marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). O padrão de migração foi analisado mediante a exposição do gel à luz ultravioleta utilizando o transiluminador ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech, Inglaterra).

4.2.3.4 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR do 16S rDNA foi realizada utilizando Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, seguindo as instruções do fabricante (GE Healthcare, EUA). O DNA foi quantificado em equipamento Thermo Scientific Quibit 3 fluorometer, (Invitrogen) seguindo orientações do fabricante.

4.2.3.5 Reação de sequenciamento do gene 16S rDNA

Para a reação de sequenciamento foram utilizados aproximadamente 20 ng/μL do DNA purificado, 1,75 μL do tampão *Save-Money*, 0,5 μL de *BigDye*, 0,3 μL DMSO, 3,2 pM dos *primers* antisenso e senso, e completou-se o volume com água ultrapura para 10 μL. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador MasterCycle (Eppendorf, Alemanha) nas seguintes condições de tempo e temperatura: 1 ciclo a 96°C por 1 min., 30 ciclos, sendo 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 min.

Após o término do programa, para purificar as amostras utilizou-se um *mix* composto por 1 μL de solução EDTA 125 mM, 1 μL de solução de acetato de sódio 3 M e 25 μL de etanol 100%, mantendo à temperatura ambiente por 15 min., em ambiente escuro e após esse tempo foi centrifugado por 12 min, 16.000 x g. O sobrenadante foi removido e foram adicionados 35 μL de etanol 70% para lavar o *pellet*, que foi centrifugado novamente por 8 min., 15.000 x g e o sobrenadante foi removido, o *pellet* foi ressuspenso em 10 μL de Hi Di formamida, misturado em vórtex por 15 segundos e depois foi dado um *spin*.

As amostras foram transferidas para placas de 96 poços e posteriormente aplicadas em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, EUA).

4.2.3.6 Análise das sequências obtidas

O sequenciamento de Sanger forneceu as sequências *forward* e *reverse*, as quais foram alinhadas e usadas para gerar a sequência consenso. Estas sequências foram então aparadas e editadas conforme as recomendações *Nomenclature Committee of the International Union of*

Biochemistry (NC-IUB), para serem analisadas usando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) fornecido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

4.3 CURVA DE CRESCIMENTO

Uma curva de crescimento foi realizada para analisar o padrão de crescimento das duas espécies de *Weizmannia* isoladas, visando obter dados do tempo de cada fase do crescimento microbiano focando na fase estacionária, uma vez que esse resultado será útil nos experimentos de evolução adaptativa laboratorial (ALE) permitindo a realização das transferências no momento ideal. Para isto, os microrganismos que estavam condicionados em tubos criogênicos foram inoculados (1:100) em três frascos de 125 mL contendo 25 mL de LB. Após 24 horas foi mensurado a absorbância e padronizado para começar em uma densidade óptica (D.O.) de 0,1 (600 nm).

As bactérias foram então transferidas para frascos de 500 mL contendo 100 mL de meio XYP. Durante 14 horas, a cada uma hora, foram retiradas alíquotas de 1mL para mensurar o crescimento bacteriano.

4.4 FERMENTAÇÕES

4.4.1 Microrganismos

Foram selecionados os microrganismos que foram capazes de produzir maiores quantidade de ácido láctico para realizar a produção do ácido utilizando o neutralizante carbonato de cálcio. Os microrganismos estocados em ultrafreezer -80°C foram ativados em frascos de 125 mL contendo 250 µL da cultura estoque e 25 mL de meio LB. A incubação foi realizada em mesa agitadora, durante 24 horas à 50°C e 150 rpm.

4.4.2 Condições de cultivo

4.4.2.1 Preparo do inóculo

As bactérias crescidas em LB, foram então transferidas para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio XYP, descrito no item 4.1.2. A incubação foi realizada em mesa agitadora, por 24 horas à 50°C e 150 rpm.

4.4.2.2 Fermentação em aerobiose

Os experimentos onde se avaliou a produção de ácido láctico pelos isolados, foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio XYP, como descrito no item 4.1.2, e a adição de 12 g/L de carbonato de cálcio (60% da fonte de carbono) (Wang *et al.*, 2010). Os microrganismos foram inoculados com uma D.O. (600 nm) inicial de 0,1 e a fermentação realizada a 50°C e 150 rpm, e o experimento foi mantido por 48 horas, sendo retiradas alíquotas a cada 12 horas que foram analisadas quanto a produção de ácido láctico. Vale salientar que o cultivo foi realizado em triplicata.

4.4.2.3 Fermentação em anaerobiose

Os ensaios em anaerobiose foram conduzidos como descrito no item 4.4.2.2, no entanto os frascos Erlenmeyer eram vedados com uma rolha de silicone, a mesma possuía uma abertura para a injeção de nitrogênio e outra abertura para o ajuste de pressão. Em ambas as entradas havia filtros de PTFE de 0,22 µm para manter a esterilidade.

4.4.2.4 Planejamento experimental fatorial

Foi realizado um planejamento experimental a fim de selecionar as melhores condições para maximizar a produção de ácido láctico. As fermentações anteriores e a literatura estudada forneceram o embasamento necessário para estabelecer o melhor intervalo (15 a 50 g/L da fonte de carbono, e 1,5 a 4,5 g/L da fonte de nitrogênio) a ser utilizado.

Os experimentos onde se realizou o planejamento experimental foram conduzidos como descrito no item 4.4.2.3, no entanto por meio de testes preliminares notou-se que aumentar a proporção de carbonato de cálcio a medida que aumentava a quantidade de xilose estava sendo nocivo às células. Por tanto, padronizou-se em utilizar 1% de CaCO₃ nas fermentações.

Foram escolhidas 3 variáveis independentes, fonte de carbono (xilose), fonte de nitrogênio (extrato de levedura e peptona bacteriológica na proporção de 1:1) e acetato de sódio. Com isso, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e análise de superfície de resposta.

O DCCR foi do tipo 2³, realizado em 2 blocos, com duas réplicas no ponto central cada um, totalizando 18 ensaios. A Tabela 3 mostra os valores estudados e a tabela 4 o delineamento com as condições realizadas.

Tabela 1 - 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 2³ empregado no cultivo de *W. ginsengihumi* BMI a 150 rpm, 50 °C por 48 horas.

Variáveis (g/L)	Códigos	Níveis				
		-1,788	-1	0	+1	+1,788
Xilose	X_1	1,19	15	32,5	50	63,80
Fonte de nitrogênio	X_2	0,31	1,5	3	4,5	5,68
Acetato de sódio	X_3	1,05	5	10	15	18,94

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Tabela 2 - Matriz do planejamento DCCR 2³ contendo as condições de cultivo (X_1 - xilose, X_2 - fonte de nitrogênio e X_3 - acetato de sódio) em seus níveis codificados.

Ensaio	Bloco	Variáveis		
		X_1	X_2	X_3
1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1
3	1	-1	1	-1
4	1	-1	1	1
5	1	1	-1	-1
6	1	1	-1	1
7	1	1	1	-1
8	1	1	1	1
9	1	0	0	0
10	1	0	0	0
11	2	-1,788	0	0
12	2	1,788	0	0
13	2	0	-1,788	0
14	2	0	1,788	0
15	2	0	0	-1,788
16	2	0	0	1,788
17	2	0	0	0
18	2	0	0	0

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

4.4.2.5 Fermentação com resíduos

A composição e caracterização dos resíduos utilizados na fermentação estão descritos nas Tabelas 1 e 2. O hidrolisado da semente de goiaba (Tabela 1) foi cedido pelo laboratório do prof. Dr. Michel Brienzo do Instituto de Pesquisa em Bioenergia (IPBEN), e hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar (Tabela 2) foi caracterizado pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e

Materiais (CNPEM) e cedidos pela Dra. Ana Paula Jacobus também do IPBEN. Ambos os hidrolisados passaram por um pré-tratamento químico, a hidrólise ácida.

Tabela 3 – Composição do hidrolisado da semente de goiaba.

Componentes	Concentração (g/L)
Xilose	13,56
Ácido acético	4,40

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Tabela 4 – Composição do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	3,24 ± 0,22
Xilose	21,57 ± 0,11
Arabinose	2,59 ± 0,06
Celobiose	1,49 ± 0,08
Ácido fórmico	0,12 ± 0,01
Ácido acético	4,5 ± 0,09
Hidroximetilfurfural	0,093 ± 0,001
Furfural	0,17 ± 0,001
Fenolicos totais	2,89 ± 0,31
Vanilina	0,033 ± 0,004
Ácido fumárico	0,26 ± 0,01
Ácido siríngico	0,024 ± 0,005
Xilooligossacarídeos	0,12 ± 0,05

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A fermentação dos resíduos foi conduzida como descrito no item 4.4.2.2, no entanto para não alterar a concentração de xilose, os outros componentes do meio foram adicionados a solução de hidrolisado e então o material foi filtrado em membrana PTFE de 0,22 µm.

4.5 EVOLUÇÃO ADAPTATIVA LABORATORIAL

A evolução adaptativa laboratorial (ALE) foi realizada pela transferência subsequentes de cultivo das populações (o ensaio foi conduzido em triplicata). O experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio XYP, a fermentação foi realizada em mesa agitadora a 150 rpm e 50 °C. Diminuindo o pH gradualmente, começando pela concentração de 35 mM com um pH de 5,43 e encerrando o experimento em 90 mM com um pH de 4,66.

Para a transferência, que era realizada a cada 24 horas, todo o caldo era transferido para Falcon de 50 mL estéril, e então centrifugado a 5.000 x g, por 5 min a temperatura ambiente, após o sobrenadante era descartado e o pellet ressuspendido em solução salina 0,85%. Posteriormente, uma alíquota da solução foi utilizada para mensurar a densidade ótica. Para a transferência, foi utilizada uma D.O. inicial de 0,2 (600 nm).

4.5.1 Fermentação cepa selvagem e evoluída

Os experimentos onde se avaliou a produção de ácido láctico pelas cepas selvagem e a evoluída, foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio XYP, como descrito no item 4.4.2.3, sem a adição do agente neutralizante, com pH do meio de 6,8. Os microrganismos foram inoculados com uma D.O. (600 nm) inicial de 0,1 e a fermentação realizada a 50°C e 150 rpm, e o experimento foi mantido por 48 horas, sendo retiradas alíquotas a cada 12 horas que foram analisadas quanto a produção de ácido láctico, ácido acético, consumo do substrato e crescimento. Vale salientar que o cultivo foi realizado em triplicata.

4.6 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.6.1 Quantificação de ácidos orgânicos

Para a quantificação dos ácidos láctico e acético foi utilizada a metodologia de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) equipado com detector ultra-violeta a 210 nm. Foi utilizado a coluna Rezex ROA (300,00 x 7,80 mm) da Phenomenex, eluída em H₂SO₄ a 5 mM como fase móvel, em um fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 65 °C (BEITEL *et al.*, 2016).

4.6.2 Determinação da concentração celular

Para a determinação da biomassa bacteriana, o *pellet* resultante da centrifugação foi lavado inicialmente com solução de HCl 0,3 N 1:1 para a remoção do carbonato de cálcio residual, seguido de agitação em vórtex por 1 min., e centrifugado por 10 min. a 12.000 x g a temperatura ambiente. Posteriormente a biomassa foi lavada com solução salina 0,85% (mesmo volume que a amostra inicial), e repetido o processo em vórtex e centrífuga. A biomassa foi levada para estufa a 100 °C por 24 horas para secagem, obtendo assim a massa seca (BEITEL *et al.*, 2020).

4.6.3 Determinação do consumo da fonte de carbono

Para determinar a concentração da fonte de carbono ao longo do cultivo foi empregado a técnica *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), conforme descrito no item 4.6.1. equipado com detector de índice de refração (RID) em 210 nm (BEITEL *et al.*, 2020).

4.6.4 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados relacionados ao planejamento experimental foi realizado pelo programa *Statistica 7*, a partir da análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, para cada uma das respostas, tendo como parâmetros, os termos isolados, de interação e quadráticos das variáveis estudadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Todas as colônias obtidas apresentaram halo no cultivo em placas contendo o meio XYP ágar com CaCO_3 . O carbonato de cálcio adicionado no meio sólido é um agente neutralizante, sendo assim quando um ácido orgânico é produzido, ocorre uma reação com CaCO_3 havendo a formação de um halo (Figura 2).

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.



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Para trabalhar com um número reduzido de microrganismos, 14 colônias que formaram halo foram escolhidas e realizado o isolamento das mesmas pela técnica de estriamento.

Os resultados obtidos da quantificação de ácido lático dos 14 isolados estão apresentados na tabela 5

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.

Produção de ácido lático (g/L)		
Isolado	Crescimento estático	Crescimento em 150 rpm
B1	1,57	0,74
B03	4,87	0,76
BUSI	7,23	1,21
BLMI	9,90	0,33
B2L1	4,88	0,56
BGRA	2,26	0,97
B5G	2,58	0,32
BCHA1	2,26	0
BUGC	6,08	1,20
USI1	1,21	1,07
BCU	1,45	3
B07	5,09	1,34
BMI	5,82	2,12
BMAI	8,66	0,86

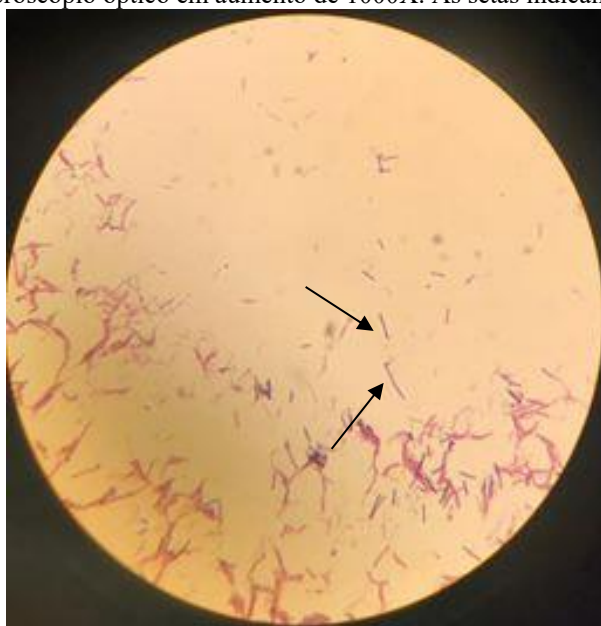
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os isolados produziram mais ácido lático em crescimento estático do que em crescimento em agitação (Tabela 5). Ohara e Yahata (1996), em seus estudos utilizando *Bacillus* sp SHO- 1, conduziram a cultura em aerobiose e em jarra de anaerobiose, e notaram que a cepa teve um menor crescimento em anaerobiose, mas a conversão da glicose em ácido lático foi maior. Se aumentar o nível de injeção de nitrogênio, aumenta a taxa de conversão da glicose em ácido lático gerando um maior rendimento (OHARA; YAHATA, 1996).

5.1.1 Identificação dos microrganismos

Das 14 colônias selecionadas, foram escolhidas 8 por apresentarem melhor produção de ácido lático em relação as demais. Foram selecionados os seguintes isolados BMI, BMAI, BLMI, B2L1, BUGC, BO7, B03 e BUSI, apresentando produção entre 4,8 g/Le 9,9 g/L. Os 8 isolados foram caracterizadas por coloração de Gram, morfologia e identificação molecular (16S rDNA). Quanto a caracterização fenotípica as 8 cepas foram identificadas como bacilos gram-positivos como pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 - Imagem representativa de um dos 8 isolados selecionados para a produção de ácido láctico após a coloração de Gram visualizada em microscópio óptico em aumento de 1000X. As setas indicam os bacilos corados.

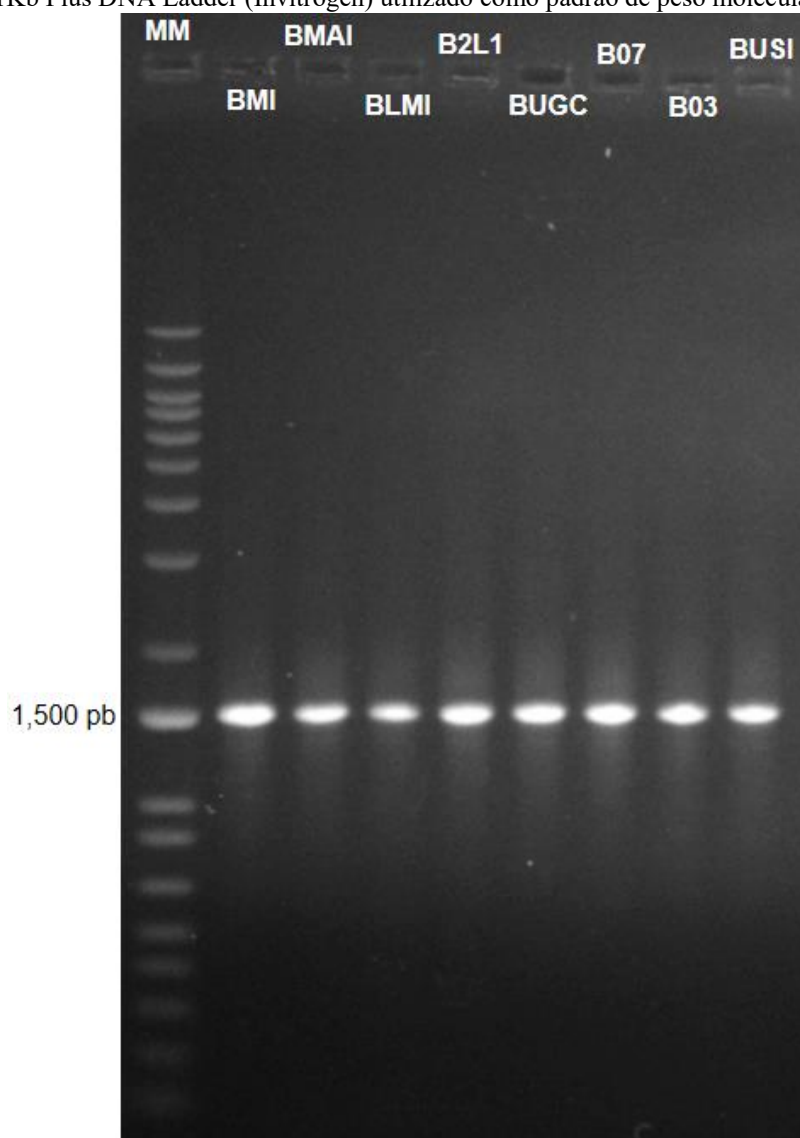


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.1.2 Extração, amplificação por PCR, purificação e sequenciamento do gene 16S rDNA

Foi realizada a identificação molecular dos 8 isolados promissores conforme descrito no item 4.2.3. A extração do DNA desses isolados foi considerada eficiente quando visualizada em gel de agarose 1%, após o sucesso na obtenção do DNA foi realizada a PCR (item 4.2.3.5) dos 8 isolados, a Figura 4 demonstra a amplificação do fragmento do tamanho esperado (1500 pares de base) por todos os isolados.

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.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Anteriormente à apresentação dos resultados obtidos do sequenciamento do 16S rDNA é importante salientar a condição atual de classificação das bactérias do gênero *Bacillus* que a partir de estudos filogenéticos foi criado um novo gênero denominado *Weizmania* que alberga bactérias de acordo com seu parentesco filogenético.

Inicialmente o gênero *Bacillus* albergava microrganismos do filo Firmicutes, que é um dos gêneros mais numerosos e diversos de bactérias, abrangendo espécies com importância em diferentes áreas, como por exemplo no estudo de microbioma humano. Usualmente, esse grupo é descrito tanto como bactérias gram-positivas como gram-negativas, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, formadores de esporos, e com morfologia de bastonete retas ou curvilíneas (ASH et al., 1991; LOGAN, DE VOS, 2009).

Mesmo com estas características atribuídas ao grupo, bactérias com outros padrões fenotípicos e moleculares também são incluídas nesse grupo (PATEL; GUPTA, 2020). A grande

diversidade entre as espécies do gênero *Bacillus* dificulta a capacidade de distingui-los de outros gêneros da família *Bacillaceae*, o que resultou na adição de muitas espécies a esse grupo, tornando esse táxon filogeneticamente incoerente (BHANDARI et al., 2013).

O táxon *Bacillus* conta com mais de 280 espécies, sendo que os diferentes integrantes não possuem histórias evolutivas em comum além de existir uma grande polifilia entre eles. Deste modo, as relações evolutivas das espécies foram reorganizadas, sendo reclassificadas em 17 gêneros, dessa forma há uma concordância filogenética e taxonômica dentro dos membros do gênero (GUPTA et al., 2020).

As linhagens identificadas nessa pesquisa pertencem ao clado Coagulans, que abrange três espécies, que são *W. coagulans*, *W. acidiproducens* e *W. ginsengihumi*. Existem dois Indels de Assinatura Conservada (CSIs) que são compartilhados exclusivamente entre esses membros, com esses resultados foi sugerido a transferência do clado Coagulans que estava no gênero *Bacillus* para o novo gênero *Weizmannia* (GUPTA et al., 2020).

Sendo assim, a seguir serão apresentados os dados obtidos do sequenciamento dos 8 isolados em relação ao gene 16S rDNA considerando o novo clado Coagulans.

A linhagem BMI e B03 apresentaram similaridade com *Weizmannia ginsengihumi* cepa SMR30 (nº de acesso no *GenBank* KF600778.1). As linhagens BMAI, BUGC e BUSI apresentaram similaridade com a cepa *Weizmannia coagulans* ASRS2017 (nº de acesso no *GenBank* CP058594.1). Enquanto a cepa BLMI apresentou uma similaridade com *W. coagulans* NBRC 12714 (nº de acesso no *GenBank* AB680332.1), B2L1 demonstrou similaridade com *W. coagulans* 3639 (nº de acesso no *GenBank* MT538507.1), e B07 mostrou similaridade com *W. coagulans* DSM 2314 (nº de acesso no *GenBank* CP033687.1). A similaridade percentual de cada isolado pode ser observada na Tabela 6. Foi observado uma alta cobertura entre 95 a 98% no comparativo dos isolados com as cepas do banco de dados do NBI (Tabela 6), demonstrando assim a acurácia da similaridade das sequências.

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.

Cepa	Nº de acesso	Cobertura (%)	Similaridade percentual (%)	Nome científico
BMI	KF600778.1	95	97,46	<i>Bacillus ginsengihumi</i>
BMAI	CP058594.1	99	96,81	<i>Weizmannia coagulans</i>
BLMI	AB680332.1	96	97,49	<i>Bacillus</i>

				<i>coagulans</i>
B2L1	MT538507.1	96	97,49	<i>Bacillus</i>
				<i>coagulans</i>
BUGC	CP058594.1	95	97,64	<i>Weizmannia</i>
				<i>coagulans</i>
B07	CP033687.1	98	97,27	<i>Weizmannia</i>
				<i>coagulans</i>
B03	KF600778.1	96	97,64	<i>Bacillus</i>
				<i>ginsengihumi</i>
BUSI	CP058594.1	96	97,92	<i>Weizmannia</i>
				<i>coagulans</i>

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Dessa forma, como as linhagens BMAI, BUGC e BUSI apresentaram similaridade com a mesma cepa do banco de dados (Tabela 6), essas foram consideradas como o mesmo clone, sendo assim como representante desse clone foi utilizada a cepa BMAI.

As sequências obtidas do gene de DNA ribossômico 16S das cepas BMI, BMAI, BLMI, B2L1 e B07 foram depositados no *GenBank* (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de acesso gerado para os isolados depositados na plataforma do NCBI.

Cepa	Nº de acesso	Espécie
BMI	ON376077.1	<i>W. ginsengihumi</i>
BMAI	ON303733.1	<i>W. coagulans</i>
BLMI	ON376264.1	<i>W. coagulans</i>
B2L1	ON376315.1	<i>W. coagulans</i>
B07	ON376723.1	<i>W. coagulans</i>

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

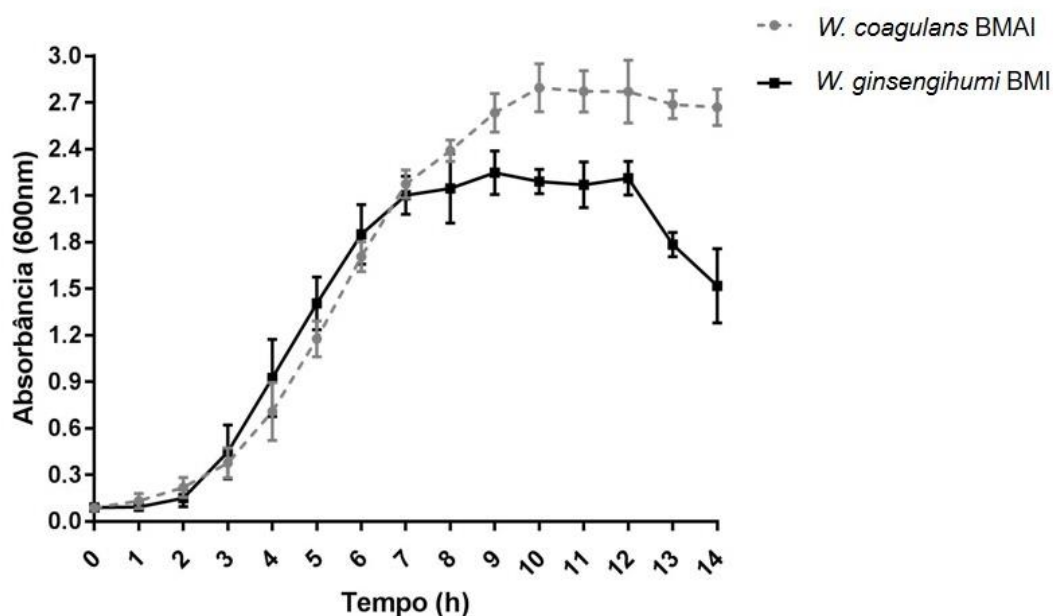
5.2 CURVA DE CRESCIMENTO

Dentre os isolados selecionados foram identificadas as espécies *W. coagulans* e *W. ginsengihumi* (Tabela 6), sendo assim um representante de cada espécie foi escolhido para realizar a curva de crescimento, a cepa *W. coagulans* BMAI e *W. ginsengihumi* BMI. Os dois isolados foram escolhidos para representam as respectivas espécies.

A fase exponencial de crescimento de ambas as espécies isoladas se iniciou após 2 horas e 30 min. do inóculo. Após 7 horas de cultivo a cepa BMI estava no fase exponencial e início da fase estacionária, enquanto BMAI atingiu o final da fase exponencial e início da fase estacionária

somente após 10 horas de cultivo (Figura 5). Em virtude a esses resultados, os microrganismos sempre foram inoculados durante sua fase exponencial, após 6 horas de crescimento.

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.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.3 FERMENTAÇÕES

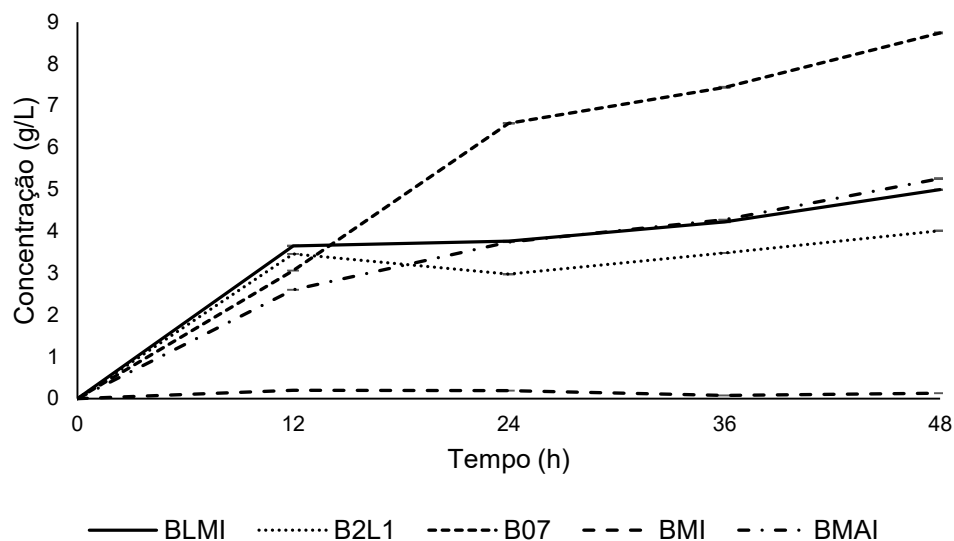
5.3.1 Fermentação em aerobiose

A seguir serão apresentados os resultados obtidos nos experimentos de produção de ácido láctico com os isolados *W. coagulans* BLMI, B2L1, B07 e BMAI, e *W. ginsengihumi* BMI. Onde foram avaliados o crescimento, produção de ácidos orgânicos e consumo de substrato.

Em relação a biomassa, a cepa B07 foi a que apresentou melhor crescimento (Figura 6) atingindo $8,74 \pm 0,01$ g/L em 48 horas de fermentação, enquanto a cepa BMI foi a que apresentou menor crescimento quando comparada aos outros isolados, sendo que seu crescimento foi de $0,2 \pm 0$ g/L em 12 horas de fermentação (Figura 6), vale salientar que essa cepa é a única entre esses isolados que pertence a uma espécie *W. ginsengihumi*.

As cepas BLMI, B2L1 e BMAI apresentarem um crescimento muito semelhante, a maior crescimento das cepas foi em 48 horas de fermentação atingindo uma concentração de $4,99 \pm 0$, $4,01 \pm 0$ e $5,26 \pm 0$ g/L, respectivamente. Convém ressaltar que essas 3 cepas também são da mesma espécie que a cepa B07, no entanto essa além de apresentar uma maior concentração de biomassa, demonstrou um perfil de crescimento diferente.

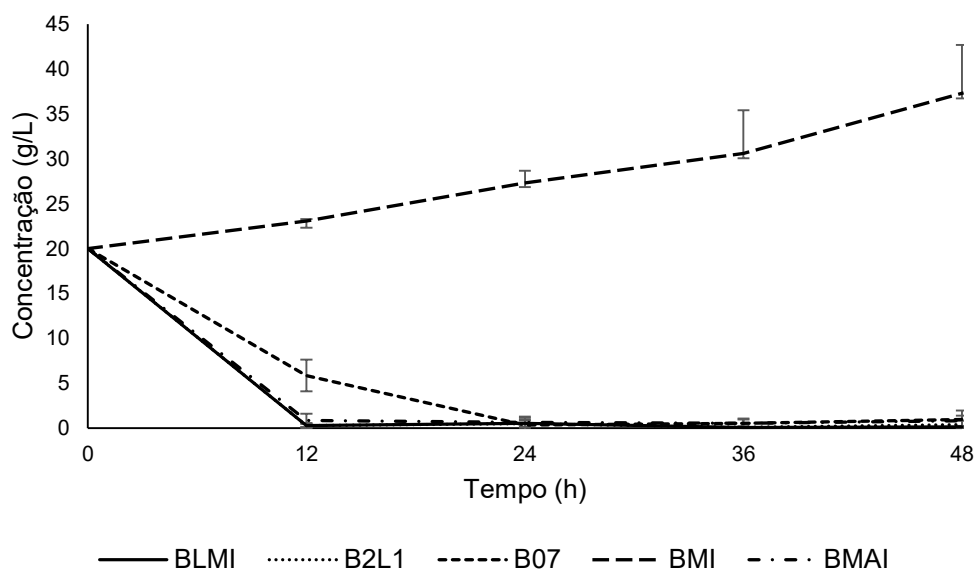
Figura 6 - Perfil de crescimento dos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Todos os isolados consumiram praticamente toda a fonte de carbono após 12 horas de fermentação (Figura 7), com exceção da cepa *W. ginsengihumi* BMI, mais uma vez demonstrando que há algo diferente no metabolismo desta espécie em comparação com *W. coagulans*. É provável que essa cepa esteja produzindo algum outro composto que identifica no mesmo tempo de retenção da xilose, pois a fermentação é iniciada com uma concentração determinada de xilose de 20 g/L e ao final do experimento a concentração observada foi de 37,29 g/L, fato que seria impossível já que a concentração inicial de xilose é menor do que a final (Figura 7). Mais estudos são necessários para que se possa determinar a identidade desse composto.

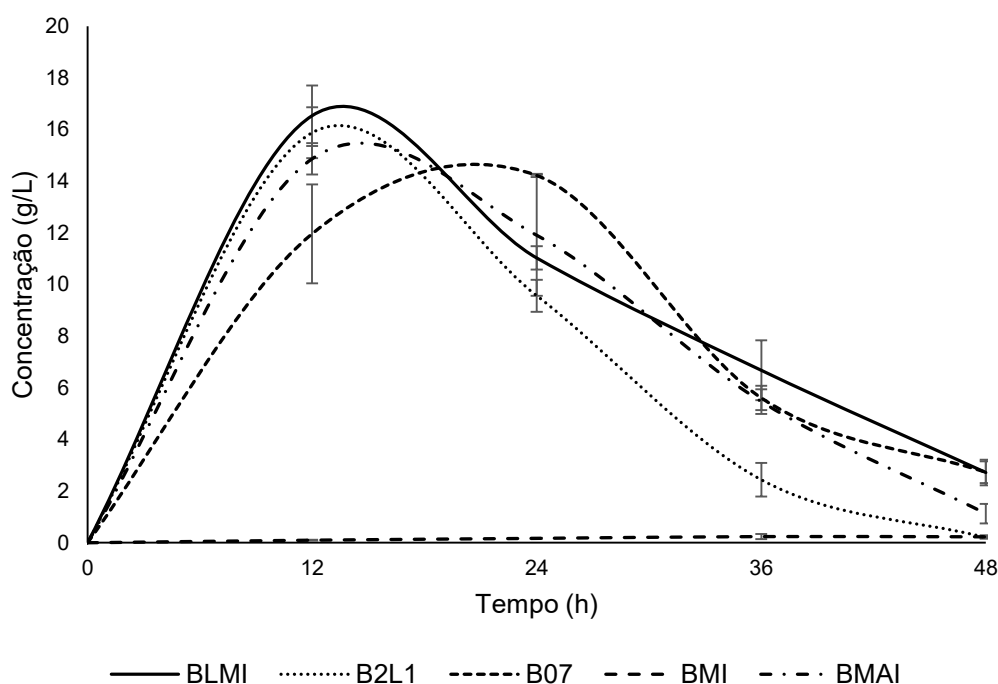
Figura 7 - Consumo da xilose pelos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Em relação a produção de ácido lático, a maior quantidade produzida foi de $16,54 \pm 1,1$ g/L pela cepa BLMI após 12 horas de fermentação, seguido da cepa B2L1 que produziu $15,88 \pm 0,9$ g/L, e a cepa BMAI que produziu $14,87 \pm 0,6$ g/L. Enquanto a cepa B07 alcançou a maior produção após 24 horas, produzindo $14,22 \pm 0,06$ g/L, e por fim a cepa BMI que atingiu $0,24 \pm 0,1$ g/L após 36 horas, (Figura 8).

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.

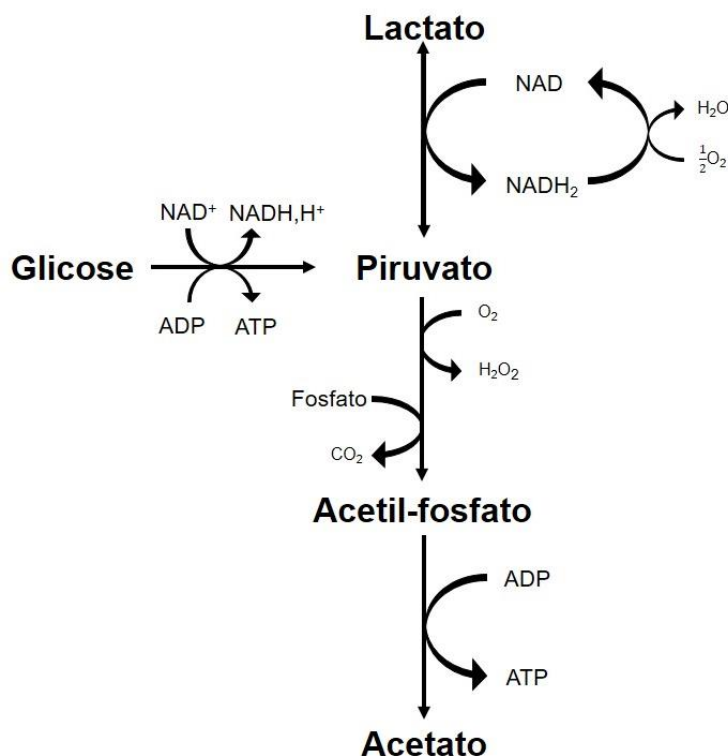


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

No entanto, a produção de ácido lático dos isolados diminuiu após o ápice de produção em 12 horas de cultivo pelas cepas BLMI, B2L1 e BMAI, e em 36 h pela cepa B07. Pode-se inferir que o esgotamento da xilose após 12 horas de fermentação, fez com que as bactérias utilizassem o lactato como fonte de carbono, e assim seu crescimento foi mantido até o final do processo de fermentação.

Em um estudo de Muphy *et al.*, (1985), os autores forneceram glicose para a bactéria *Lactobacillus plantarum* e lactato como substrato. Foi observado um lento aumento de biomassa quando a glicose foi completamente metabolizada, mas ao longo do cultivo notou-se um aumento de biomassa simultaneamente ao consumo de lactato, e produção de acetato. A rota sugerida pelos autores está representada na Figura 9.

Figura 9 - Via proposta para a conversão do lactato em acetato na presença de oxigênio.



Fonte: Modificado de Murphy et al., (1985).

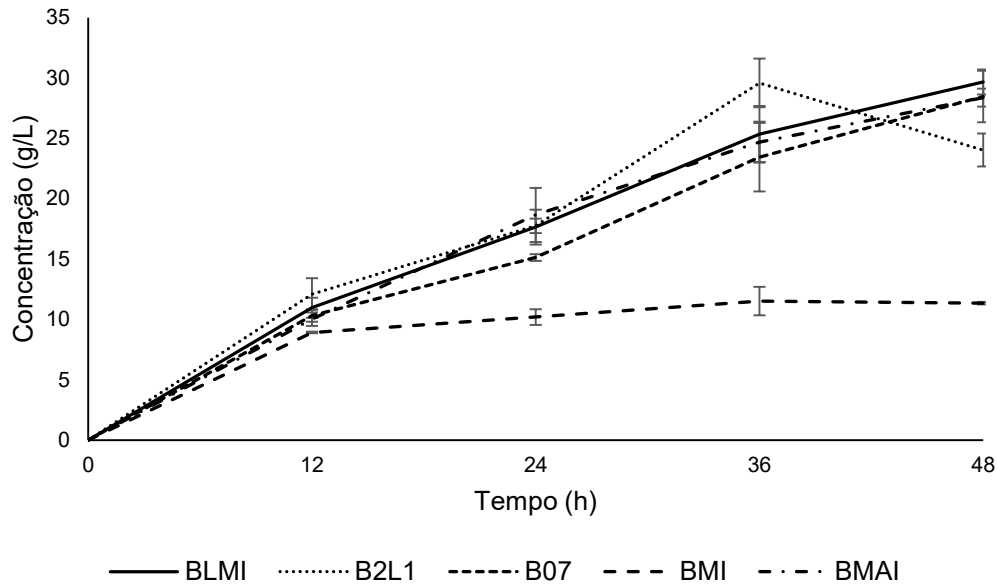
A via aeróbica da conversão de lactato em acetato começa com a oxidação do lactato em piruvato pela enzima lactato desidrogenase, com isso o carreador de elétrons NAD é reduzido formando NADH₂, além da liberação de uma molécula de água devido ao consumo de O₂. O piruvato então é catabolizado em acetil-fosfato, o complexo de piruvato desidrogenase, piruvato liase e piruvato oxidase podem ser responsáveis por esse processo, mas não se sabe ao certo quais enzimas estão envolvidas diretamente ou indiretamente nessa conversão. Por fim, na última etapa da conversão do lactato, o acetil-fosfato sofre a desfosforilação pela enzima acetato quinase formando o acetato (QUATRAVAUX *et al.*, 2006).

O consumo de lactato também foi observado nos estudos de Thomas, McKay e Morris (1985), com a bactéria *Pedococcus pentosaceus*, que utilizou 1 mol de O₂ para converter 1 mol de lactato em 1 mol de acetato, produzindo 1 mol de CO₂. Os pesquisadores também notaram que a melhor taxa de conversão foi em uma faixa de pH de 5 a 6.

Na análise dos dados obtidos por HPLC (item 4.6.1), foi visualizado no cromatograma um outro pico de alta intensidade, além do pico esperado para o ácido lático (tempo de retenção 13,7 min). Com base na literatura (PATEL *et al.*, 2006; SU; XU, 2014) foi suposto que este pico poderia ser a presença de ácido acético, com isso foi realizada uma nova análise em HPLC utilizando o padrão de ácido acético para o tempo de retenção e realizar a quantificação do produto. O isolado BLMI foi o que alcançou a maior produção de ácido acético, com 29,66±1 g/L após 48 horas de

fermentação (Figura 10). Por fim, foi determinado que todas as cepas além do ácido lático também estavam produzindo o ácido acético.

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.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Segundo Su e Xu (2014), *W. coagulans* são cepas homofermentativas que possuem uma via metabólica eficiente para hexoses, a via *Embden Meyerhof and Parmas* (EMP), que tem como produto primário da fermentação da glicose o ácido lático. No entanto, as pentoses, como a xilose podem ser metabolizadas por duas vias distintas, conhecidas como via fosfocetolase (PKP) e a via pentose fosfato (PPP). Portanto, se a xilose for metabolizada pela PKP não se espera um rendimento de ácido lático maior que 60%, em contrapartida se essa pentose for metabolizada através da PPP a fração de ácido lático será maior que 60% (PATEL *et al.*, 2006).

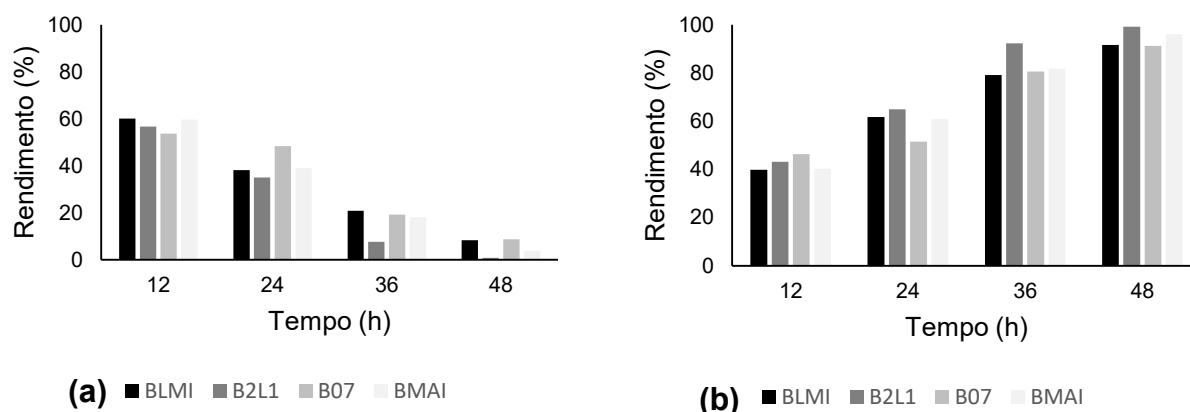
Realizando os cálculos de rendimento teórico pela equação 1:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (1)$$

Onde, $Y_{P/S}$ é o valor do rendimento do produto pelo substrato; P_f é o produto final; P_i é o produto inicial; S_i é o substrato inicial; e S_f o substrato final.

O rendimento de ácido lático das cepas foi próximo de 60%, no entanto, o rendimento foi diminuindo devido ao consumo do lactato, chegando a menos de 10% de rendimento no final da fermentação (Figura 11). Por outro lado, o ácido acético começou com um rendimento em torno de 40%, mas ao final do processo esse rendimento chega quase a 100% (Figura 11).

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.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Vale ressaltar que nesse cálculo não foram consideradas outras variáveis, como por exemplo, a utilização do substrato para o crescimento e manutenção celular.

Nossos resultados corroboram com os achados de Payot, Chemaly e Fick (1999), os pesquisadores investigaram a influência da aeração no crescimento e produção de ácido lático na bactéria *Weizmannia coagulans* TB/04, demonstrando que a biomassa aumenta sob condições aeróbicas, mas a produção de ácido lático é inferior quando comparado com as condições em que o meio não é aerado.

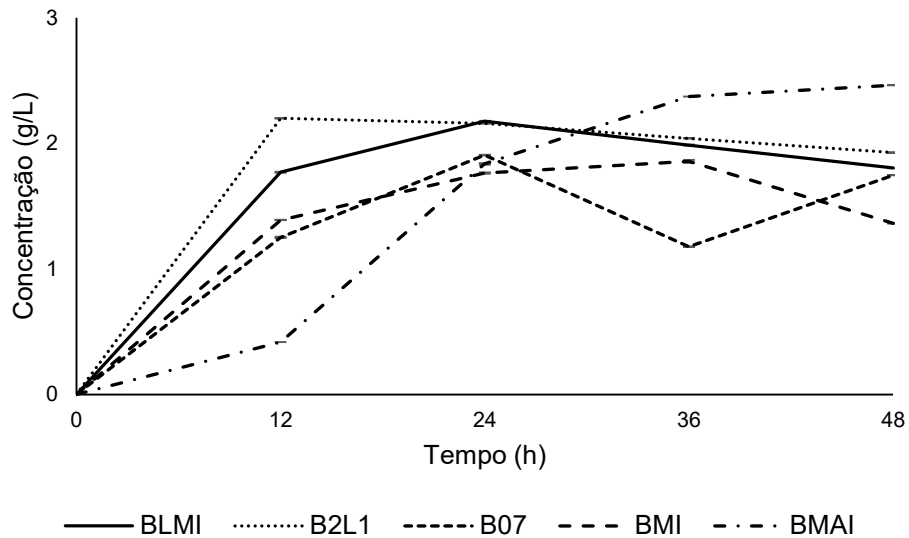
5.3.2 Fermentação em anaerobiose

Com base nos resultados obtidos e na literatura encontrada (PATEL et al., 2006; SU; XU, 2014), foi realizada uma fermentação com injeção de nitrogênio para criar uma atmosfera de anaerobiose. O experimento foi conduzido nos mesmos parâmetros descritos anteriormente (item 5.3.1).

No presente estudo os resultados obtidos corroboram com as pesquisas supracitadas (OHARA; YAHATA, 1996; PAYOT; CHEMALY; FICK, 1999), pois o crescimento microbiano foi menor em anaerobiose, quando comparado a aerobiose (Figura 12).

Em 48 h de fermentação a cepa que apresentou o maior crescimento foi a *W. coagulans* BMAI com $2,46 \pm 0$ g/L, enquanto o menor crescimento foi observado no isolado *W. ginsengihumi* BMI com $1,36 \pm 0$ g/L (Figura 12). As cepas BLMI e B07 apresentaram a maior concentração de biomassa em 24 horas de fermentação com uma concentração de $2,18 \pm 0$ e $1,91 \pm 0$ g/L, respectivamente. E a cepa B2L1 apresentou a maior concentração de biomassa em 12 horas de fermentação, com um valor de $2,20 \pm 0$ g/L (Figura 12).

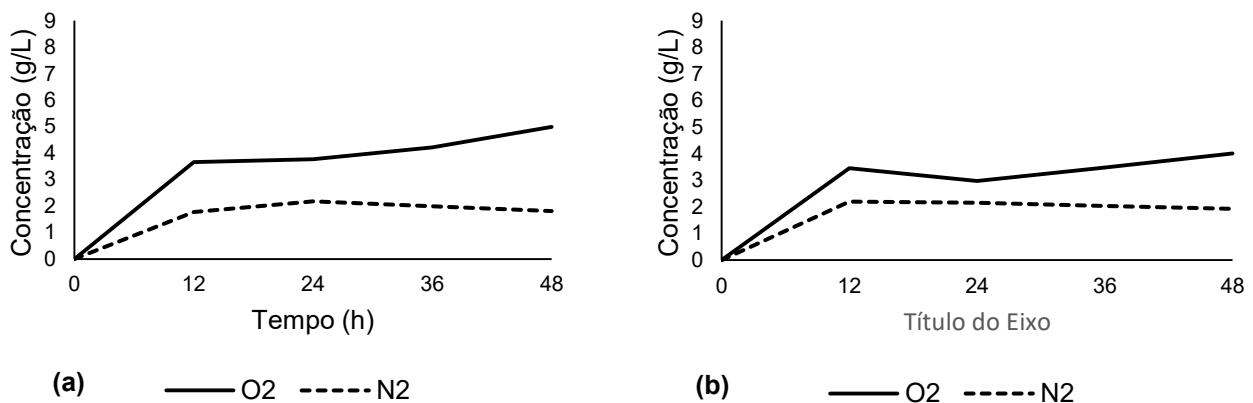
Figura 12 - Perfil de crescimento dos isolados *Weizmannia* sp. em meio XYP contendo 20 g/L de xilose, sob atmosfera de anaerobiose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação.

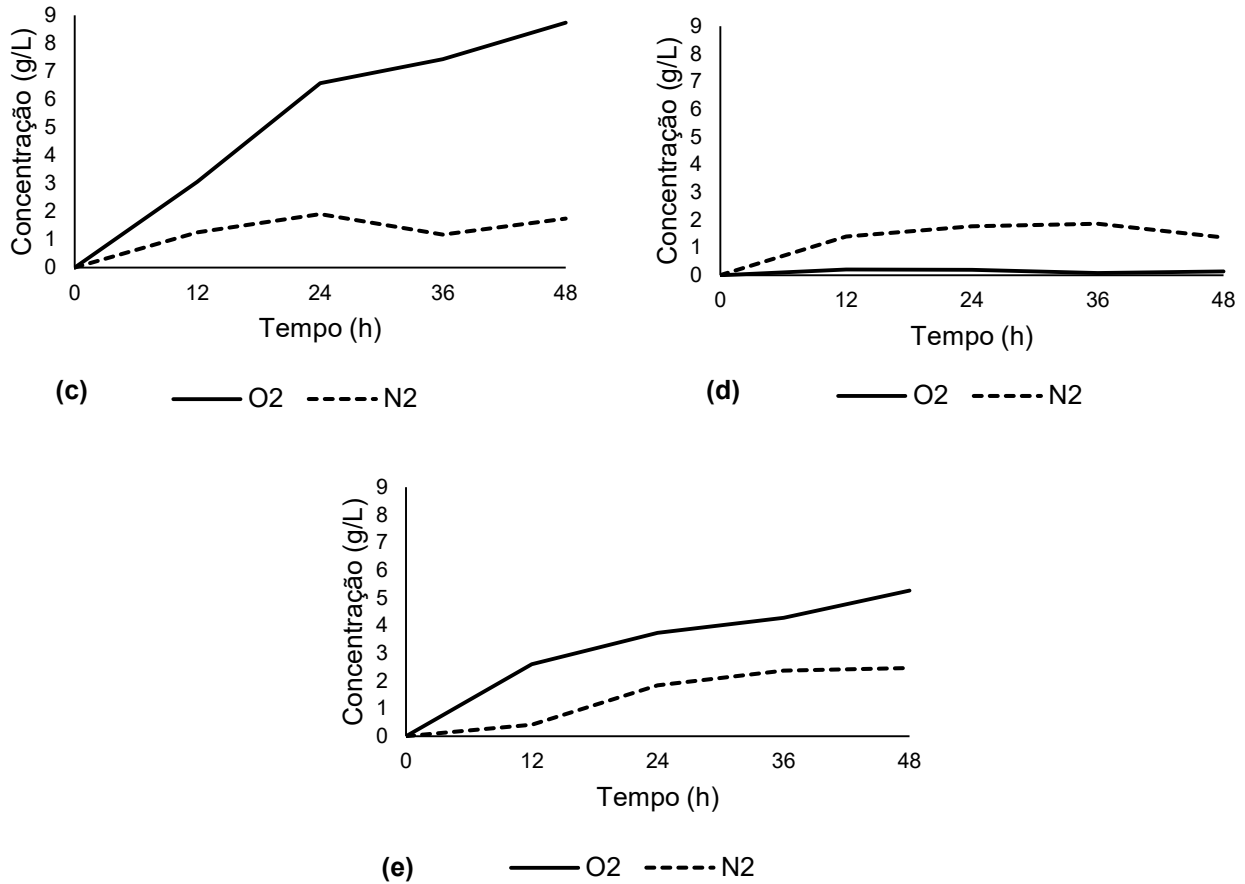


Fonte: Elaborada pela própria autora.

No entanto, *W. ginsengihumi* BMI foi a única que apresentou um maior crescimento quando cultivada em atmosfera de nitrogênio. Após 36 horas de fermentação em anaerobiose a concentração de biomassa foi $1,86 \pm 0,01$ g/L, enquanto que em aerobiose BMI após 36 horas de fermentação o crescimento foi $0,08 \pm 0$ g/L (Figura 13). As cepas da espécie *W. coagulans* apresentaram maior concentração de biomassa quando cultivadas na presença de oxigênio. Anteriormente a cepa B07 demonstrou maior crescimento (Figura 6) quando cultivada em sobre oxigenação, no entanto, cultivada em atmosfera de nitrogênio essa mesma cepa apresentou menor crescimento entre as cepas da espécie *W. coagulans* (Figura 12 e 13).

Figura 13 – Comparação do perfil de crescimento em aerobiose (O₂) e anaerobiose (N₂) 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.

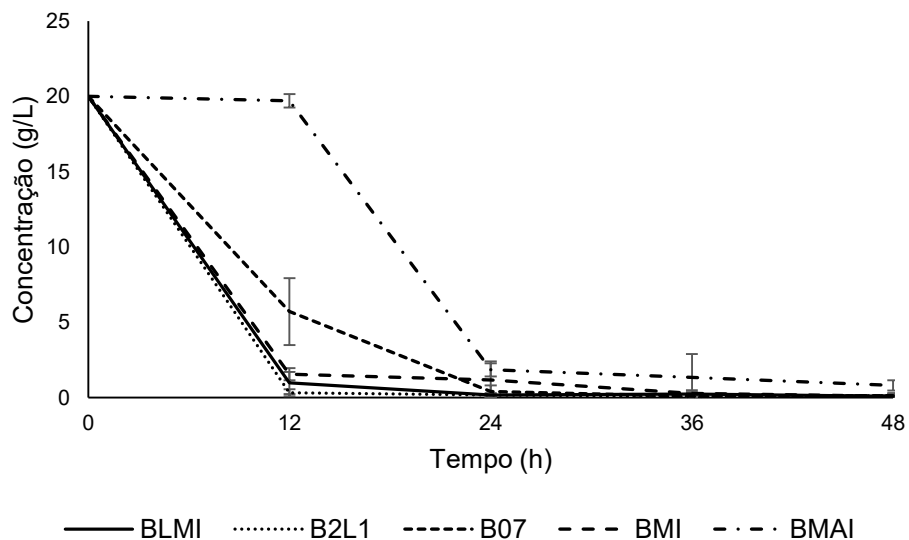




Fonte: Elaborada pela autora (2023).

O consumo da fonte de carbono foi muito similar ao crescimento aeróbico, os isolados consumiram quase toda a xilose (Figura 14) após apenas 12 horas de fermentação, exceto pela cepa BMAI, que apresentou uma quantidade de açúcar residual de $1,84 \pm 0,4$ g/L apenas após 24 horas de cultivo (Figura 14).

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.

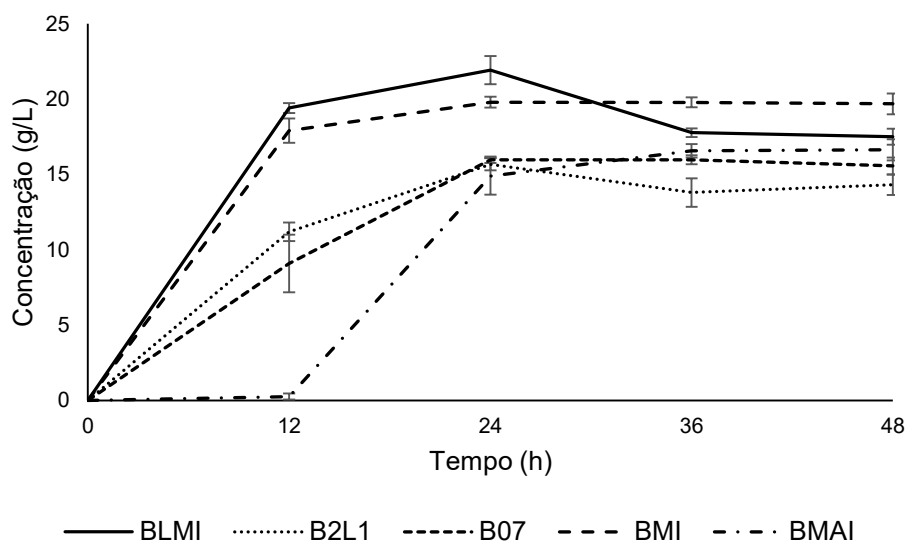


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Esses resultados sugerem a necessidade de aumentar a concentração de xilose e consequentemente gerar um aumento na produção da biomolécula de interesse, ou caso as cepas não suportem a aumento na concentração do açúcar devido as trocas que ocorrem no processo de osmose, realizar uma batelada alimentada mantendo a concentração em 20 g/L de xilose.

A consumo da fonte de carbono teve influência na produção do ácido láctico (Figura 15), com a maior produção entre 12 horas e 24 horas de fermentação das cepas *W. coagulans* BLMI e *W. ginsengihumi* BMI, com $21,93\pm 0,9$ g/L e $19,79\pm 0,3$ g/L após 24 horas, respectivamente.

Figura 15- Produção de ácido láctico 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.

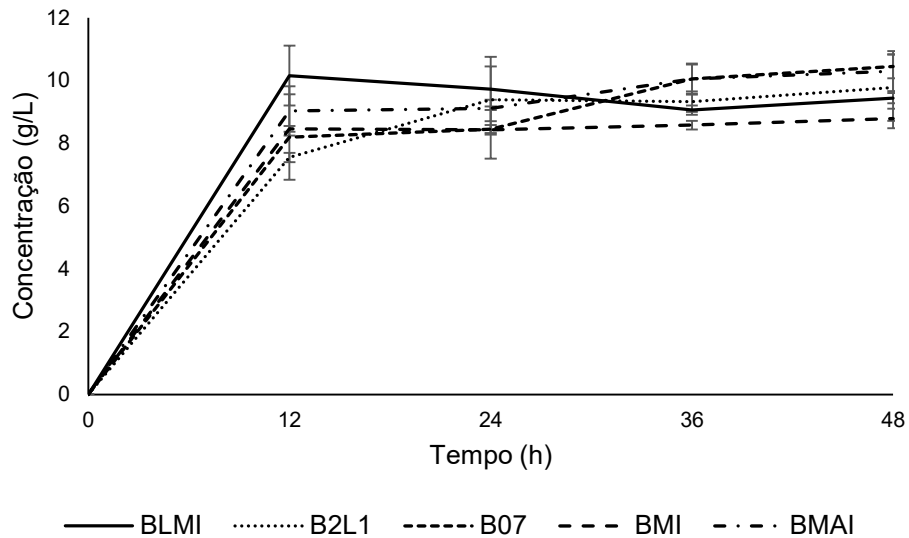


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Após o esgotamento da fonte de carbono, não há a mesma queda de produção de ácido láctico como a que foi observada no experimento em aerobiose. Elferink et al., (2001) verificaram a conversão do ácido láctico em ácido acético e 1,2-propanodiol em condições anóxicas. Com isso, é provável que a rota metabólica utilizada em anaerobiose também permite o consumo do ácido láctico quando a fonte de carbono é esgotada, mas em menores quantidades.

Mesmo o experimento sendo conduzido em anaerobiose, foi observado através do cromatograma gerado no *HPLC*, um pico no tempo de retenção do ácido acético (15,7 min), portanto, esse produto também foi quantificado (Figura 16).

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.

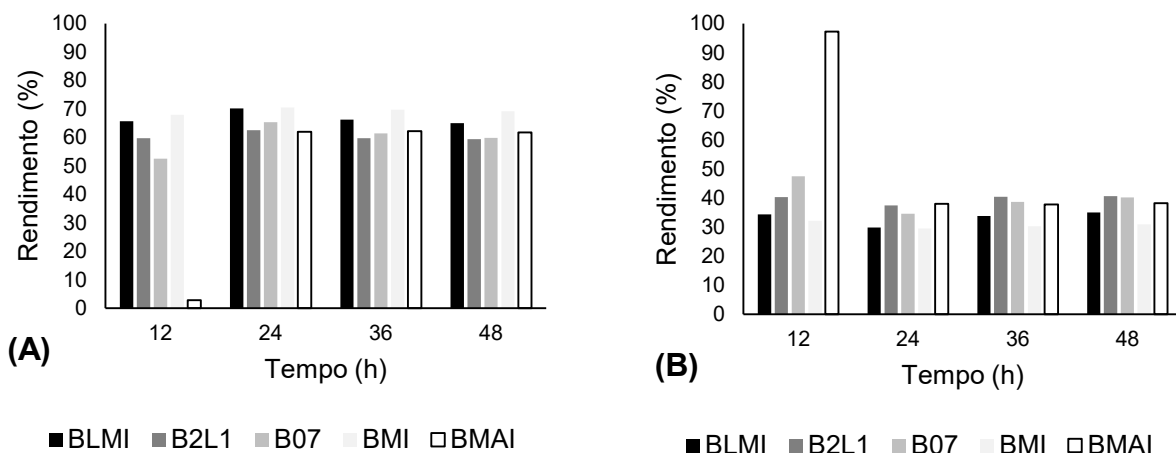


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A produção de ácido acético em anaerobiose foi menor quando comparado a produção em aerobiose, a maior concentração foi de $10,45 \pm 0,3$ g/L pela cepa *W. coagulans* B07 em 48 horas de fermentação (Figura 16). Enquanto, em aerobiose para essa mesma cepa e no mesmo tempo de fermentação a produção de ácido acético foi de 28,45 g/L (Figura 10).

Realizando o cálculo de rendimento, conforme a equação 1, obteve-se os resultados representados na Figura 16.

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.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os resultados do presente estudo sugerem que a partir de xilose a fermentação em anaerobiose é a melhor condição para a produção de ácido lático, devido ao esgotamento da fonte de carbono após 12 horas nas fermentações em aerobiose, por tal motivo houve o consumo de

lactato, a molécula de interesse do estudo, que causou a produção de acetato, (chegando a um rendimento de 100%).

5.3.3 Planejamento experimental

O planejamento foi realizado com a bactéria *W. ginsengihumi* BMI, pois não há dados na literatura referente a produção de ácido láctico utilizando essa espécie. Os artigos disponibilizados na plataforma *Science Direct* são referentes a temas como comunidade microbiana na área da ecologia e de alimentos (BOKULICH; MILLS, 2012; HUANG *et al.*, 2018; CALVO-GARRIDO *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022), produção de moléculas de interesse industrial, como hidrogênio verde e fitases (BANDO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2022) e probiótico (LEE *et al.*, 2022).

5.3.3.1 Resposta ácido láctico

Os ensaios realizados a partir do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com variação na concentração da fonte de carbono (xilose) fonte de nitrogênio (extrato de levedura e peptona bacteriológica) e acetato de sódio estão demonstrados na Tabela 8 com os valores reais da matriz do planejamento, assim como as repostas obtidas para produção e produtividade de ácido láctico.

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.

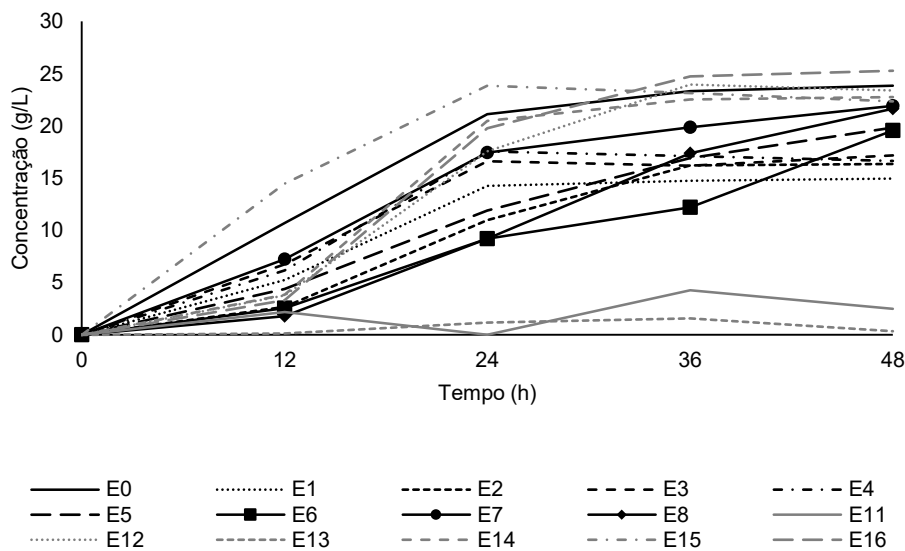
Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X1	X2	X3	Y1	Y2
	Xilose	Nitrogênio	A. sódio	Produção (g/L)	Produtividade (g/L/h)
1	15	1,5	5	14,96	0,31
2	15	1,5	15	16,36	0,34
3	15	4,5	5	17,18	0,36
4	15	4,5	15	16,66	0,35
5	50	1,5	5	19,84	0,41
6	50	1,5	15	19,56	0,41
7	50	4,5	5	21,92	0,46
8	50	4,5	15	21,64	0,45
9	32,5	3	10	23,02	0,48
10	32,5	3	10	22,94	0,48
11	1,19	3	10	2,5	0,05
12	63,805	3	10	23,38	0,49
13	32,5	0,31	10	0,34	0,01
14	32,5	5,68	10	22,76	0,47

15	32,5	3	1,05	22,34	0,47
16	32,5	3	18,94	25,28	0,53
17	32,5	3	10	24,22	0,50
18	32,5	3	10	25,2	0,53

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os resultados demonstrados são referentes a produção de ácido lático em 48 horas de fermentação, tempo no qual a produção foi máxima para a maioria dos ensaios (Figura 18). Nesse tempo, a produção de ácido lático variou de 0,34 a 25,28 g/L, ensaios 13 e 16, respectivamente (Tabela 8). Com isso, nota-se que a variação da concentração da fonte de nitrogênio influenciou na produção desse ácido orgânico.

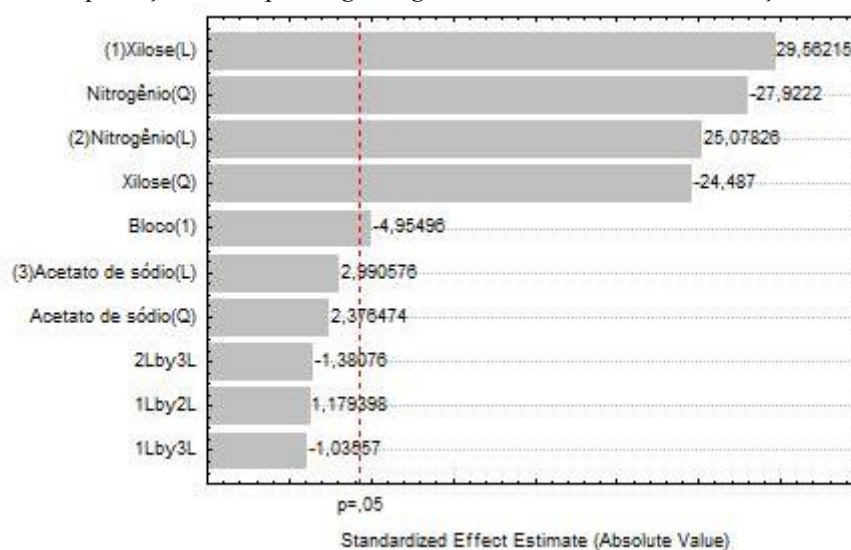
Figura 18 - Produção de ácido lático por *W. ginsengihumi* BMI em função do tempo para os ensaios (E) do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. Os ensaios do ponto central (9, 10, 17 e 18) estão representados pela média dos valores em E0.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre a produção do metabólito são apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 19). Foram considerados significativos os parâmetros com valores de p inferiores a 5%. Deste modo, tanto os efeitos quadráticos quanto lineares das variáveis fonte de nitrogênio e xilose exerceram efeitos significativos ao nível de confiança de 95%, sendo a fonte de carbono o efeito com maior influência. Percebe-se que a interação entre as variáveis X_1 e X_2 não tiveram influência na resposta, assim como a variável X_3 e suas respectivas interações (Figura 19).

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.



*Termos lineares estão associados à letra L, e termos quadráticos à letra Q.

*Os valores são considerados absolutos.

*nL by nL indica a interação entre os fatores.

Fonte: Elaborada pela própria autora.

A falta de significância do acetato de sódio pode ser comparada pelos ensaios 15 e 16 (Tabela 8), que apresentaram repostas muito próximas, mas ambos são pontos alfas da matriz.

Pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 9) é possível confirmar os dados do Diagrama de Pareto e também pode-se observar que o valor do coeficiente de correlação múltipla (r) para a produção de ácido lático foi de 0,805, o que indica que os experimentos se ajustam em 80,5% ao modelo proposto.

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para a produção de AL por *W. ginsengihumi* BMI empregando o delineamento composto central rotacional (DCCR).

ANOVA					
Fatores	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	P
Bloco	5,9341	1	5,9341	24,5516	0,038400
(1) Xilose (L)	211,2266	1	211,2266	873,9207	0,001142
Xilose (Q)	144,9267	1	144,9267	599,6140	0,001664
(2) Nitrogênio (L)	152,0098	1	152,0098	628,9192	0,001586
Nitrogênio (Q)	188,4410	1	188,4410	779,6482	0,001280
(2) A. sódio (L)	2,1617	1	2,1617	8,9435	0,095985
A. sódio (Q)	1,3650	1	1,3650	5,6476	0,140651
1L by 2L	0,3362	1	0,3362	1,3910	0,359531
1L by 3L	0,2592	1	0,2592	1,0724	0,409201

2L by 3L	0,4608	1	0,4608	1,9065	0,301407
Falta de ajuste	164,6389	5	32,9278	136,2341	0,007303
Erro puro	0,4834	2	0,2417		
Soma de quadrados total	850,1278	17			
$R^2 = 0,805$					

*Termos lineares estão associados à letra L, e termos quadráticos à letra Q.

*Valores em negrito são considerados estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

*1L by 2L; 1L by 3L e 2L e 3L indicam a interação entre os fatores.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

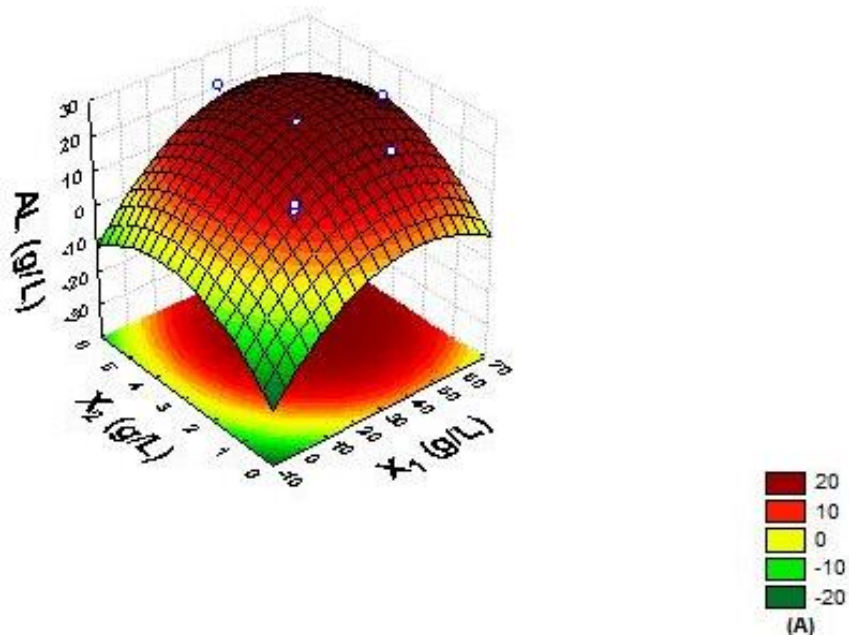
A partir da resposta produção de ácido láctico (y) foram realizadas as análises de regressão múltipla que geraram a equações de regressão apresentadas abaixo:

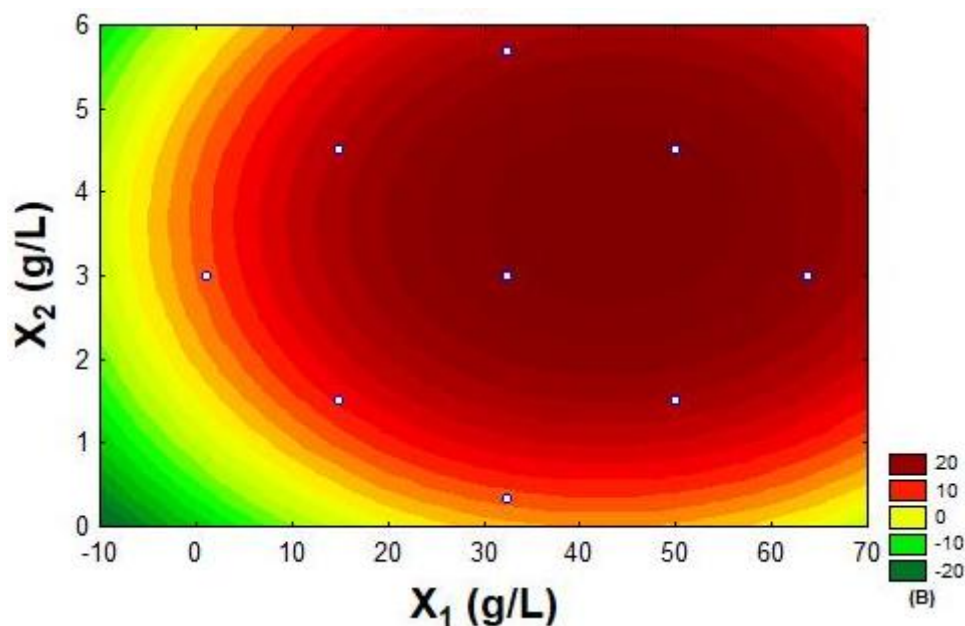
$$y = 23,95 + 3,82(X_1) + 3,24(X_2) + 0,38(X_3) - 3,09(X_1^2) - 3,53(X_2^2) + 0,30(X_3^2) + 0,20(X_1X_2) - 0,18(X_1X_3) - 0,24(X_2X_3) \quad (2)$$

Sendo que y é a resposta predita que é a concentração de ácido láctico, e X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas para xilose, fonte de nitrogênio e acetato de sódio, respectivamente.

Os gráficos de superfície de resposta e curva de contorno (Figuras 19, 20 e 21) geradas pelo modelo são capazes de demonstrar os efeitos de interação das variáveis e identificar os níveis ideais de cada uma. A finalidade foi identificar as melhores condições de cultivo para obtenção da produção máxima de ácido láctico pela cepa BMI.

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).





Fonte: Elaborada pela autora (2023).

As concentrações de 30 a 55 g/L de xilose, e 2,6 a 4,9 g/L de fonte de nitrogênio (a zona de vermelho intenso do gráfico) proporcionará a maior concentração do metabolito de interesse (Figura 20).

A espécie *Weizmannia coagulans* que pertence ao mesmo clado de *Weizmannia ginsengihumi* é vista na literatura como um candidato com características fascinantes para a produção de ácido láctico, no entanto ainda existe alguns problemas a serem resolvidos (ZHENG *et al.*, 2014). Nos estudos de Wang *et al.*, (2010) *W. coagulans* XZL9 foi um dos isolados capaz de consumir a xilose, mas apenas quando a concentração da fonte de carbono era inferior a 70 g/L. Concentrações acima de 100 g/L de xilose ocasionava em menores concentrações de ácido láctico e maiores quantidades de xilose residual.

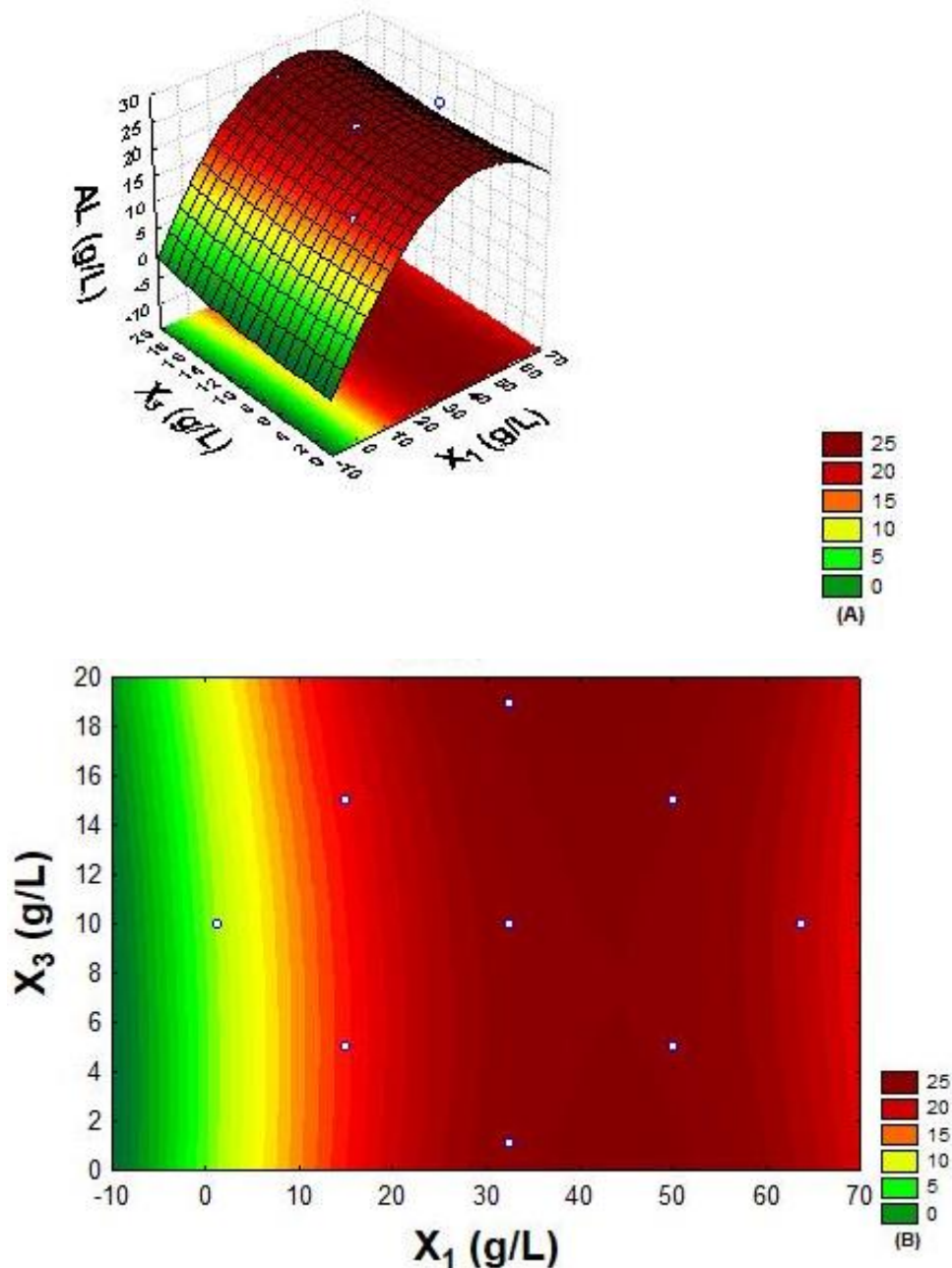
Conforme o gráfico de superfície de resposta na Figura 20, BMI apresentará um declínio na produção de ácido láctico, se a concentração da fonte de carbono for superior a 70 g/L. Ye *et al.*, (2013) observaram uma redução nas atividades de xilose isomerase e lactato desidrogenase quando o substrato estava em concentrações mais altas, sugerindo que a inibição do substrato é causada principalmente pela inibição da taxa de entrada do substrato nas células, mas o mecanismo detalhado ainda não está claro.

Por ser uma espécie relativamente nova (TEN *et al.*, 2006) e sem registros até o momento correlacionando essa espécie como produtora de ácido láctico, torna-se interessante realizar uma modificação para tornar essa cepa tolerante a alta concentração de xilose. Ou para desviar do problema relacionado a inibição do substrato, realizar uma fermentação alimentada (LEE *et al.*, 2007). Além disso, nos estudos de Cai *et al.*, (2014) e Zheng *et al.*, (2014) foi realizado uma

mutação de plasma atmosférico e temperatura ambiente (*Atmospheric and room temperature plasma- ARTP*) para solucionar problemas relacionados a inibição por alta concentração de xilose. Com isso, *W. coagulans* NL-CC-17 produziu 90,29 g/L de ácido láctico fermentando 100 g/L de xilose.

Os gráficos da Figura 21 evidenciam que a máxima produção de ácido láctico será atingida ao utilizar entre 35 a 50 g/L aproximadamente da fonte de carbono, pois são as concentrações que se encontram na zona de vermelho mais intenso. Já o acetato de sódio não tem influência na produção de LA(+), como pode ser observado pela zona em verde, (Figura 21), reposta que já foi comprovada pelo diagrama de Pareto (Figura 19) e análise de variância (Tabela 9).

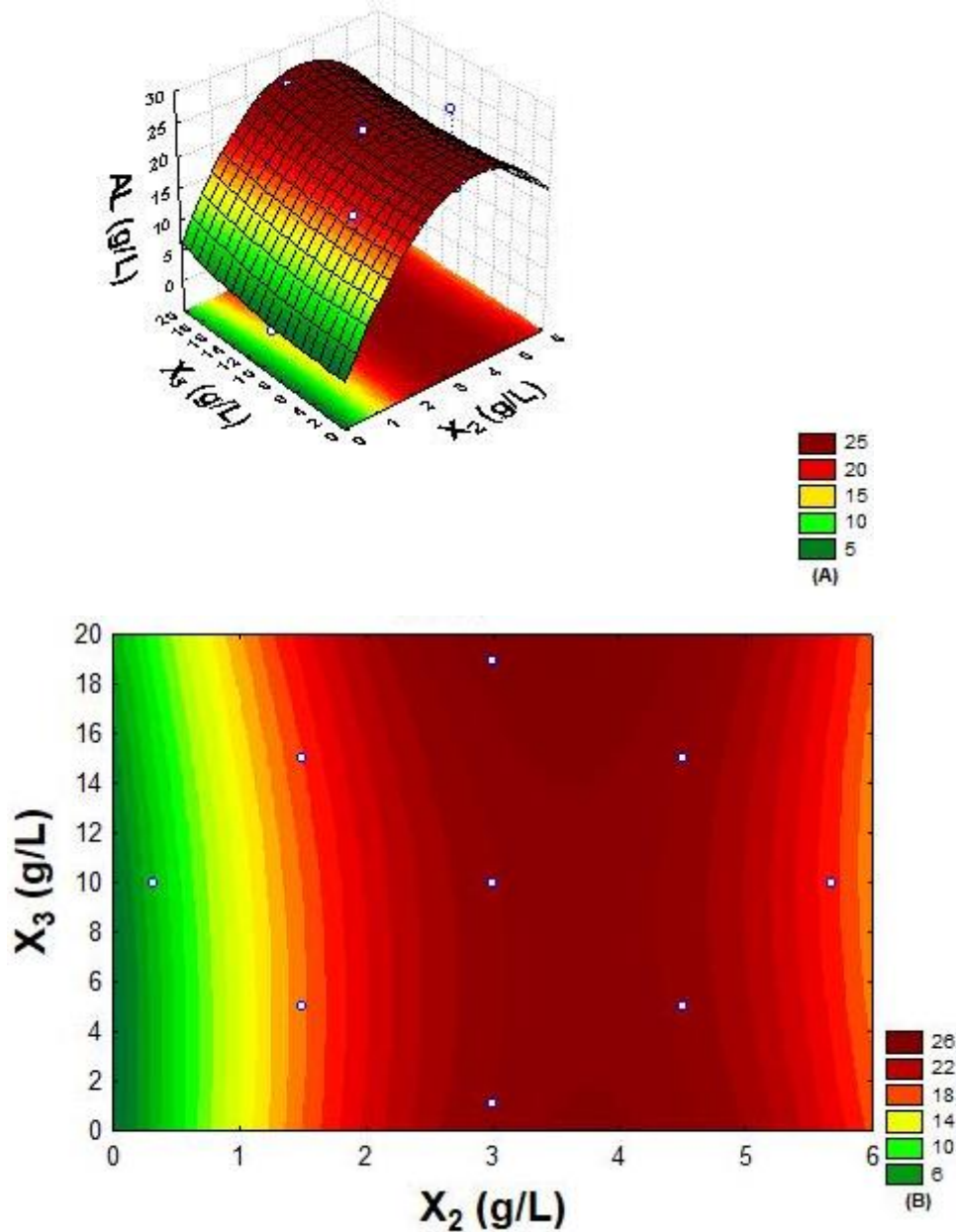
Figura 21 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a produção de AL por *W. ginsengihumi* BMI em função das variáveis xilose (X_1) e acetato de sódio (X_3).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A faixa de concentração de nitrogênio que está na zona em vermelho para a maior produção de ácido láctico é de 3,5 a 4,2 g/L de nitrogênio. Novamente, a variável acetato de sódio corrobora com os resultados apresentados até o momento, não apresentando influência na produção de AL, mesmo variando a concentração de 0 a 20 g/L (Figura 22).

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).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.3.3.2 Resposta ácido acético

A Tabela 10 demonstra os ensaios realizados a partir do DCCR com variação na concentração da fonte de carbono (xilose) fonte de nitrogênio (extrato de levedura e peptona bacteriológica) e acetato de sódio com os valores reais da matriz do planejamento, assim como as

repostas obtidas para produção e produtividade de ácido acético. As respostas apresentadas na Tabela 10, são referentes a produção de ácido acético após 48 horas de fermentação e a produtividade nesse mesmo tempo de fermentação.

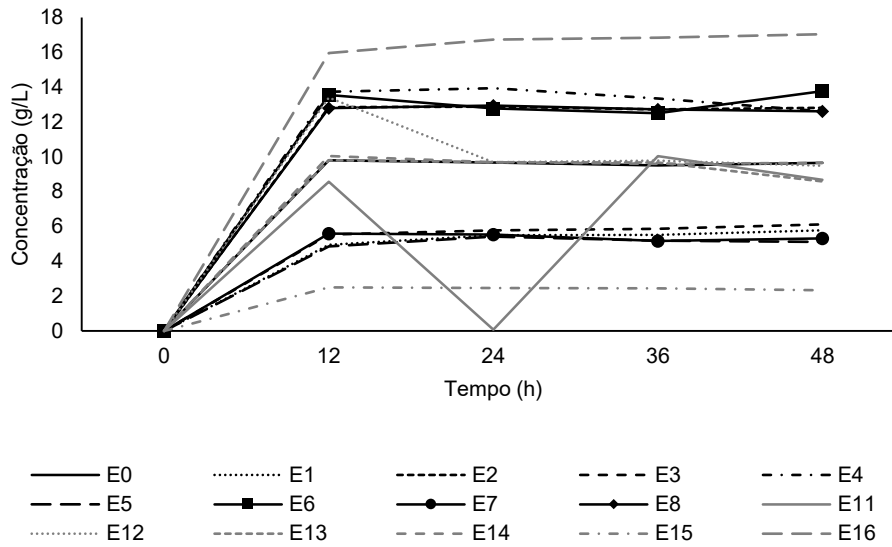
Tabela 10 - Delineamento composto central rotacional empregado no cultivo de *W. ginsengihumi* BMI. Os meios foram compostos por xilose como fonte de carbono, extrato de levedura e peptona como fonte de nitrogênio, e acetato de sódio. As variáveis independentes estão representadas pelos níveis reais. As repostas correspondem a produção e produtividade de ácido acético em 48 horas de fermentação.

Ensaio	Variáveis			Respostas	
	X1	X2	X3	Y1	Y2
	Xilose (g/L)	Nitrogênio (g/L)	A. sódio (g/L)	Produção (g/L)	Produtividade (g/L/h)
1	15	1,5	5	5,78	0,12
2	15	1,5	15	12,82	0,27
3	15	4,5	5	6,12	0,13
4	15	4,5	15	12,62	0,26
5	50	1,5	5	5,12	0,11
6	50	1,5	15	13,78	0,29
7	50	4,5	5	5,32	0,11
8	50	4,5	15	12,62	0,26
9	32,5	3	10	9,1	0,19
10	32,5	3	10	8,98	0,19
11	1,19	3	10	8,68	0,18
12	63,805	3	10	9,48	0,20
13	32,5	0,31	10	8,58	0,18
14	32,5	5,68	10	9,66	0,20
15	32,5	3	1,05	2,34	0,05
16	32,5	3	18,94	17,04	0,36
17	32,5	3	10	9,76	0,20
18	32,5	3	10	10,74	0,22

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Nesse tempo a produção de ácido acético variou de 2,34 até 17,04 g/L (ensaio 15 e 16, respectivamente) (Figura 23). Nota-se que novamente são os ensaios que apresentam valores alfas discrepantes para a variável X₃.

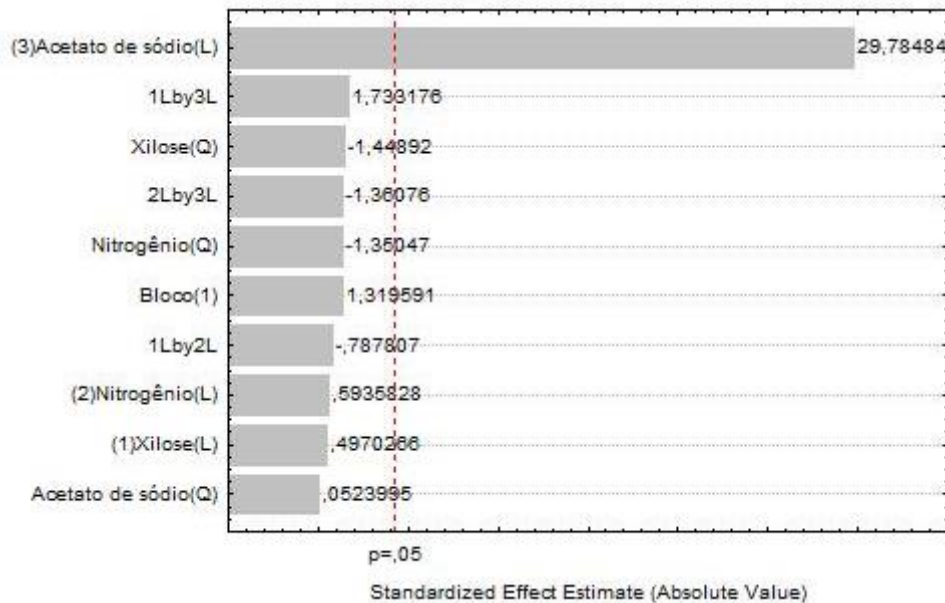
Figura 23 - Produção de ácido acético por *W. ginsengihumi* BMI em função do tempo para os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. Os ensaios do ponto central (9, 10, 17 e 18) estão representados pela média dos valores em E0.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre a produção do metabólito são apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 24). Deste modo, apenas acetato de sódio em nível linear foi considerado significativo, com valor de *p* inferior a 5%. As demais variáveis, assim como a interação entre elas não apresentaram influência sobre a produção de ácido acético.

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.

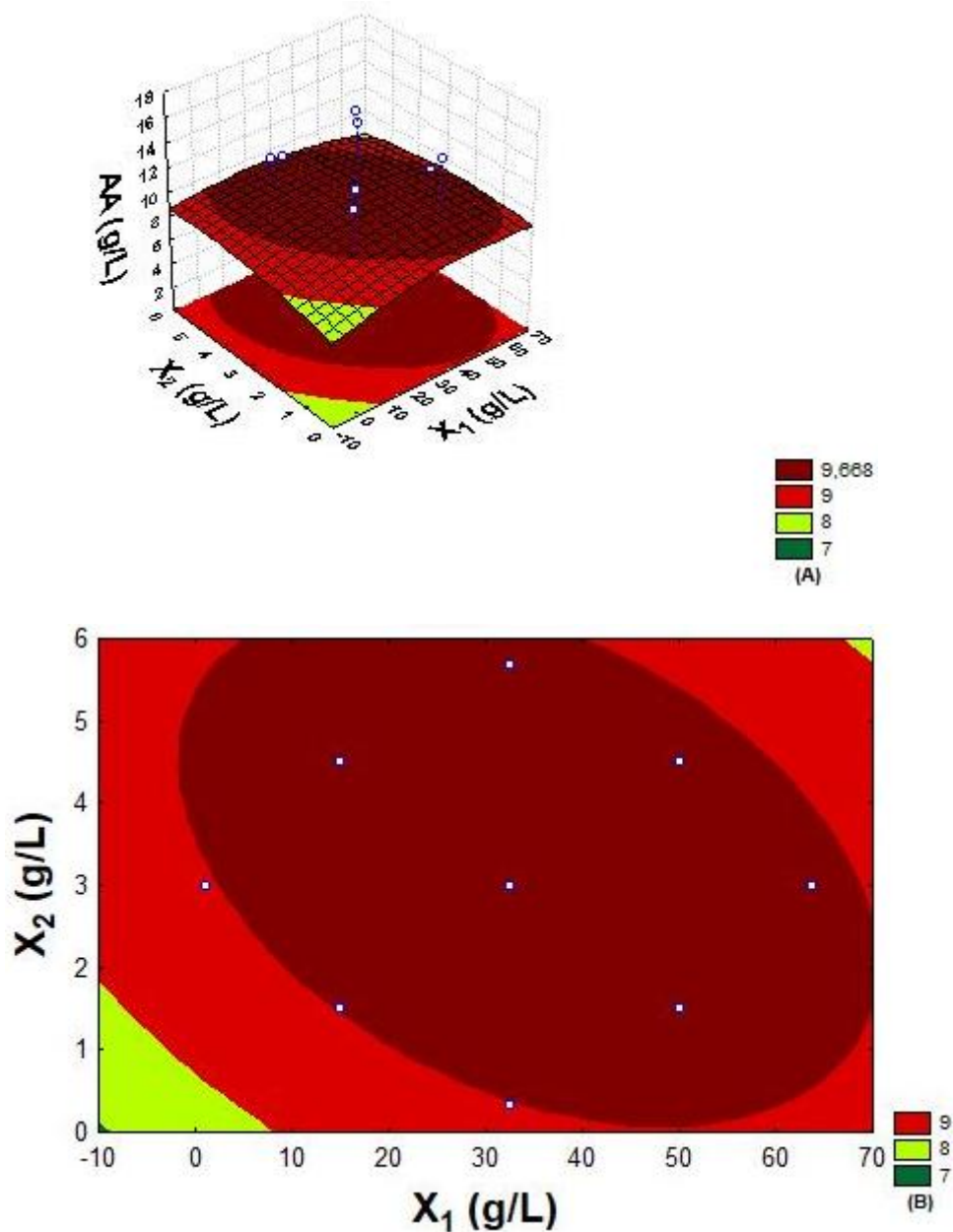


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

As representações gráficas das respostas, dispostas nas Figuras 25, 26 e 27, são relativas as análises realizadas sobre as interações das variáveis independentes. A finalidade foi identificar as

melhores condições de cultivo para obter uma concentração mínima de ácido acético produzida pela cepa BMI.

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).



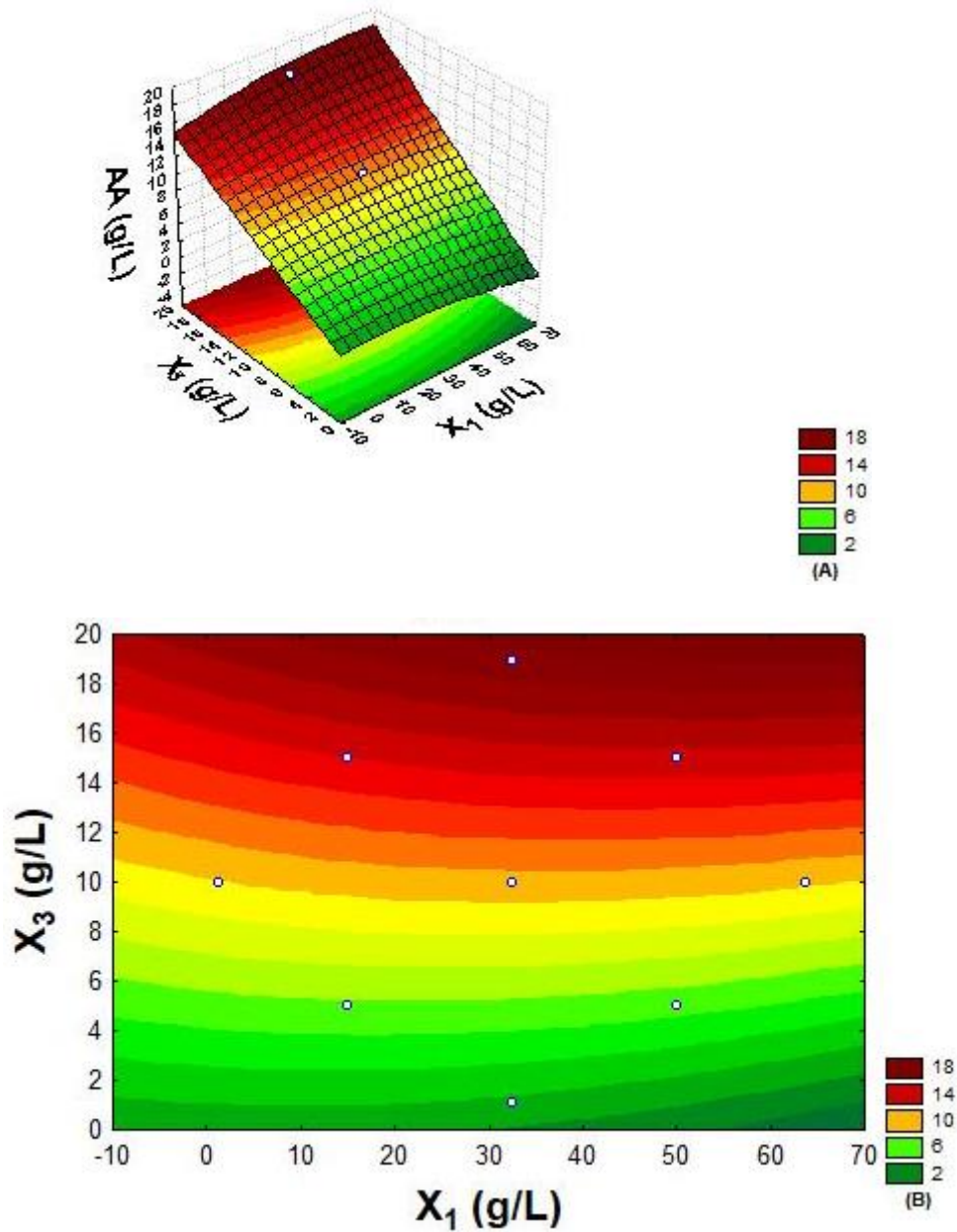
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

As faixas de concentrações tanto da fonte de carbono quanto da fonte de nitrogênio utilizadas nesse estudo já atingiu o máximo da produção de ácido acético, uma vez que no gráfico de superfície de resposta e curva de contorno (Figura 25) estão mostrando apenas a zona em vermelho.

O acetado de sódio foi o único componente do meio estudado nesse planejamento que apresentou influencia na produção de ácido acético. As Figuras 26 e 27 validam o diagrama de

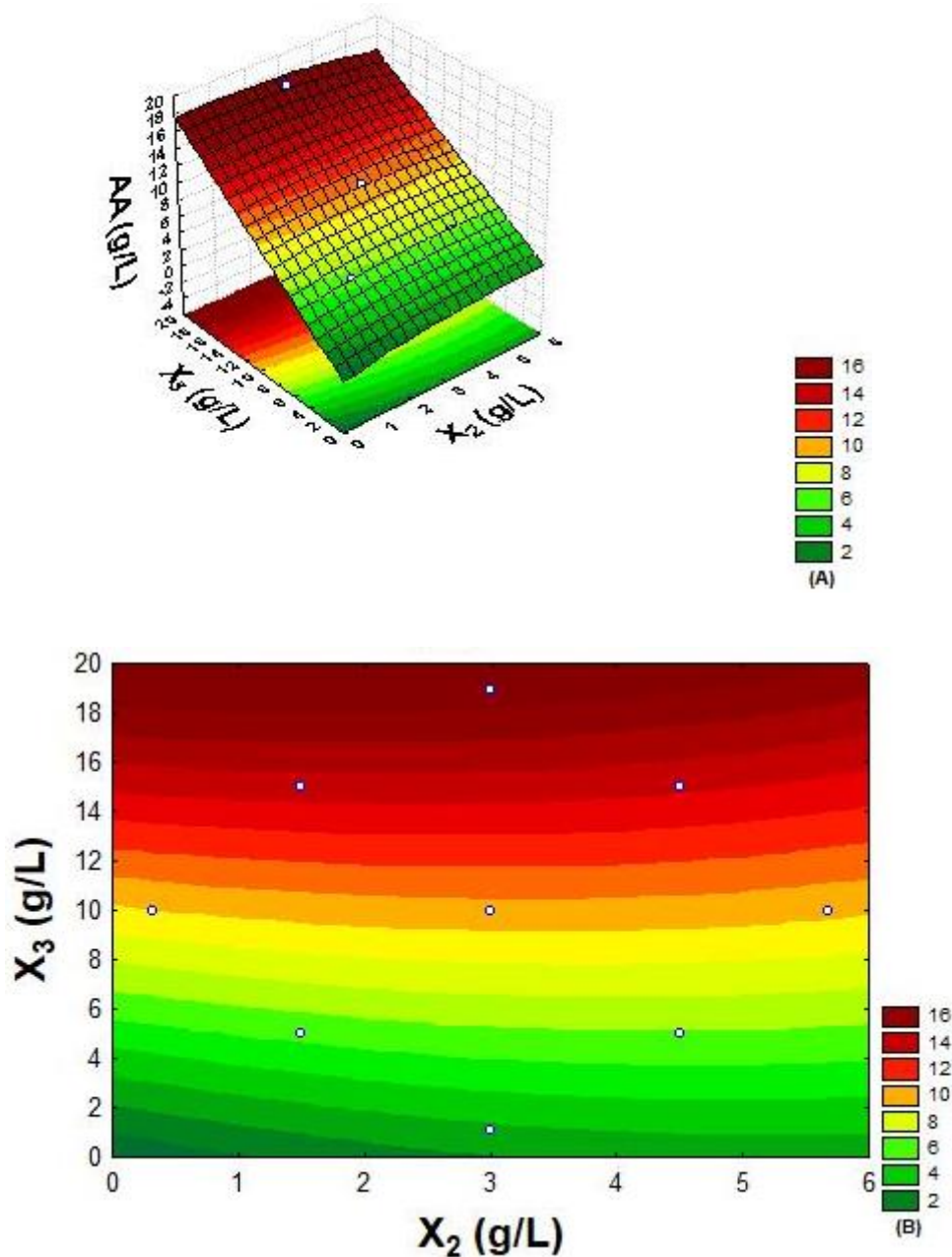
Pareto (Figura 24), nota-se que ao utilizar 10 g/L de acetato de sódio (zona em amarelo) já teremos uma alta produção de um ácido orgânico que não é de interesse nessa pesquisa.

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).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

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).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.3.3.3 Resposta biomassa

Os ensaios realizados a partir do DCCR com variação na concentração da fonte de carbono (xilose) fonte de nitrogênio (extrato de levedura e peptona bacteriológica) e acetato de sódio estão demonstrados na Tabela 11 com os valores reais da matriz do planejamento, assim como a resposta concentração de biomassa.

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 resposta corresponde a concentração de

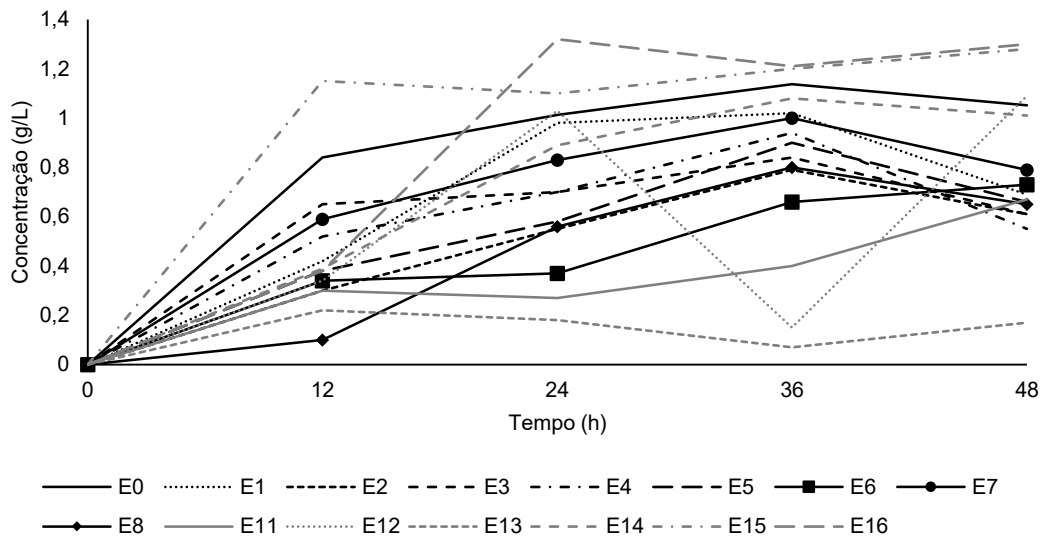
biomassa em 48 horas de fermentação, e também os resultados referentes a conversão do produto em biomassa para os ácidos orgânicos.

Ensaio	Variáveis			Resposta	Fator de conversão produto/biomassa (g/g)	
	X1	X2	X3	Y1	LA(+)	AA
	Xilose	Nitrogênio	A. sódio	Biomassa (g/L)		
1	15	1,5	5	0,69	21,68	8,38
2	15	1,5	15	0,61	26,82	21,02
3	15	4,5	5	0,61	28,16	10,03
4	15	4,5	15	0,55	30,29	22,95
5	50	1,5	5	0,66	30,06	7,76
6	50	1,5	15	0,73	26,79	18,88
7	50	4,5	5	0,79	27,75	6,73
8	50	4,5	15	0,65	33,29	19,42
9	32,5	3	10	0,81	28,42	11,23
10	32,5	3	10	0,92	24,93	9,76
11	1,19	3	10	0,67	3,73	12,96
12	63,805	3	10	1,09	21,45	8,70
13	32,5	0,31	10	0,17	2,00	50,47
14	32,5	5,68	10	1,01	22,53	9,56
15	32,5	3	1,05	1,28	17,45	1,83
16	32,5	3	18,94	1,3	19,45	13,11
17	32,5	3	10	1,28	18,92	7,63
18	32,5	3	10	1,2	21,00	8,95

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os resultados apresentados na Tabela 11 são referentes ao crescimento bacteriano em massa seca (g/L) em 48h de fermentação, onde a maioria dos ensaios apresentaram maior crescimento (Figura 28). Após a concentração de biomassa variou de 0,17 a 1,30 g/L, que são referentes aos ensaios 13 e 16, respectivamente. Vale salientar que o ensaio 13 é o meio que apresenta a menor concentração de fonte de nitrogênio, fator essencial para o crescimento de microrganismos.

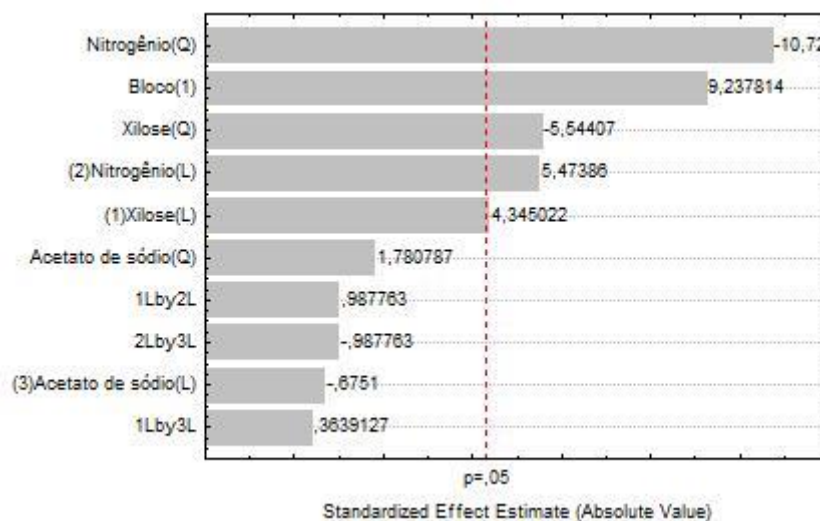
Figura 28 - Perfil de crescimento de *W. ginsengihumi* BMI em função do tempo para os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR). O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação. Os ensaios do ponto central (9, 10, 17 e 18) estão representados pela média dos valores em E0.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os efeitos que cada variável e suas interações exerceram sobre crescimento bacteriano são apresentados no Diagrama de Pareto (Figura 29). Os efeitos tanto quadráticos quanto lineares das variáveis xilose e fonte de nitrogênio foram significativos ($p < 0,05$), sendo que fonte de nitrogênio foi a variável com maior influência sobre o crescimento bacteriano. A interação entre as variáveis X_1 e X_2 não teve influência na resposta, assim como a variável X_3 e suas respectivas interações.

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.



*Termos lineares estão associados à letra L, e termos quadráticos à letra Q.

*Os valores são considerados absolutos.

*nL by nL indica a interação entre os fatores.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 12) é possível confirmar os dados do Diagrama de Pareto e também pode-se observar que o valor do coeficiente de correlação múltipla (r) para a produção de ácido láctico foi de 0,837, o que indica que os experimentos se ajustam em 83,7% ao modelo proposto.

Tabela 12 - Análise de variância (ANOVA) para o crescimento de *W. ginsengihumi* BMI empregando-se delineamento composto central rotacional (DCCR).

ANOVA					
Fatores	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	P
Bloco	0,394685	1	0,394685	85,3372	0,011516
(1) Xilose (L)	0,087316	1	0,087316	18,8792	0,049100
Xilose (Q)	0,142157	1	0,142157	30,7367	0,031028
(2) Nitrogênio (L)	0,138580	1	0,138580	29,9631	0,031791
Nitrogênio (Q)	0,532000	1	0,532000	115,0271	0,008582
(2) A. sódio (L)	0,002108	1	0,002108	0,4558	0,569200
A. sódio (Q)	0,014667	1	0,014667	3,1712	0,216902
1L by 2L	0,004513	1	0,004513	0,9757	0,427389
1L by 3L	0,000612	1	0,000612	0,1324	0,750793
2L by 3L	0,004513	1	0,004513	0,9757	0,427389
Falta de ajuste	0,251096	5	0,050219	10,8582	0,086471
Erro puro	0,009250	2	0,004625		
Soma de quadrados total	1,599844	17			
R ² = 0,837					

*Termos lineares estão associados à letra L, e termos quadráticos à letra Q.

*Valores em negrito são considerados estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p < 0,05).

*1L by 2L; 1L by 3L e 2L e 3L indicam a interação entre os fatores.

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A partir da resposta crescimento bacteriano (y) foram feitas as análises de regressão múltipla que geraram as equações de regressão apresentadas abaixo:

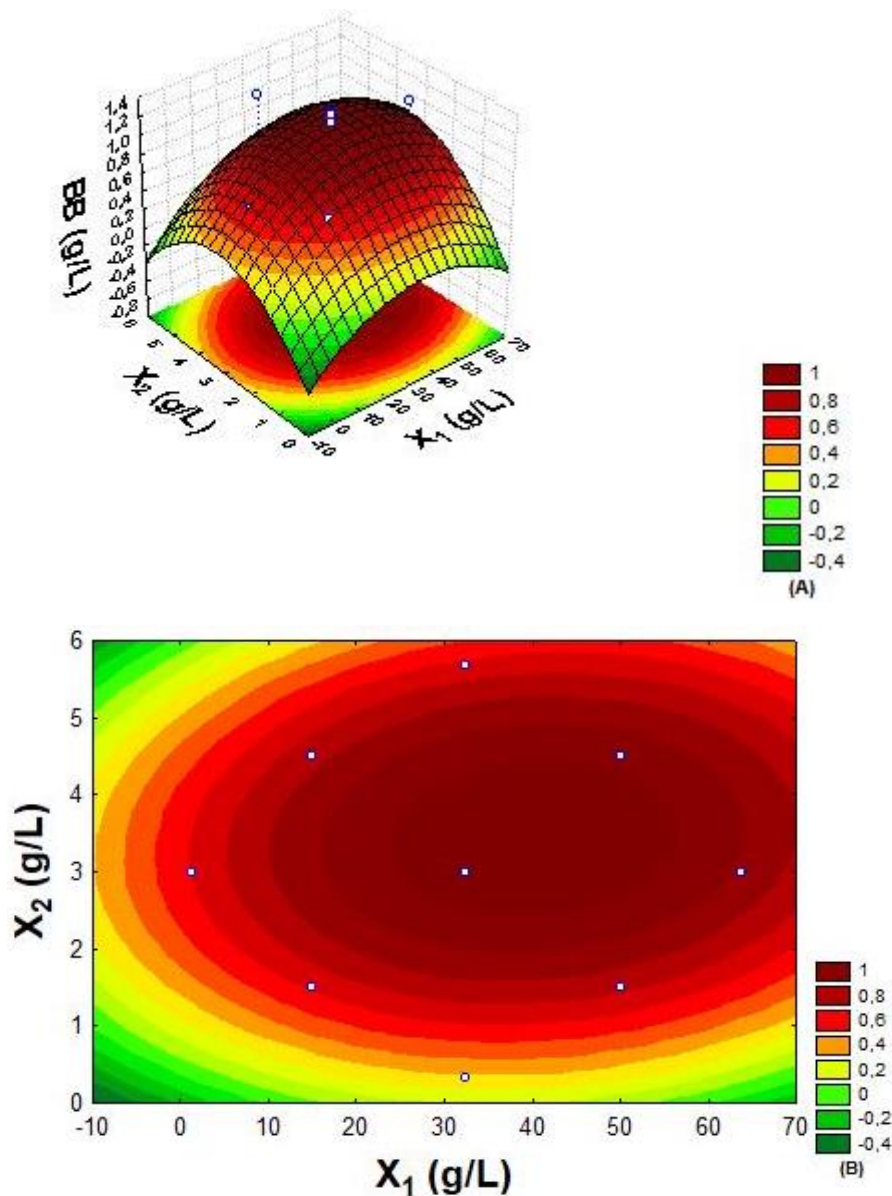
$$y=1,25+0,03(X_1)+0,04(X_2)+0,08(X_3)-0,14(X_1^2)+0,02(X_2^2)+0(X_3^2)-0,14(X_1X_2)-0,23(X_1X_3)-0,02(X_2X_3) \quad 3$$

Sendo que Y é a resposta predita que é a concentração de ácido láctico, e X₁, X₂ e X₃ são as variáveis codificadas para xilose, fonte de nitrogênio e acetato de sódio, respectivamente.

Os gráficos de superfície de resposta e curva de contorno apresentados nas Figuras 29, 30 e 31 geradas pelo modelo são capazes de demonstrar os efeitos de interação das variáveis e identificar os níveis ideais de cada uma. A finalidade foi demonstrar que a variável acetato não teve atuação sobre o crescimento de BMI, ou seja, corroborar os resultados da análise de variância (ANOVA) (Tabela 12) e o diagrama de Pareto (Figura 29).

As concentrações de 40 g/L de xilose e 3,5 g/L de fonte de nitrogênio proporcionará um maior crescimento da bactéria BMI (Figura 30). A fonte de carbono e a fonte de nitrogênio são as variáveis que se espera que possua influencia no crescimento bacteriano, uma vez que são nutrientes essenciais para a composição celular e energia para o crescimento (MADIGAN *et al.*, 2016)

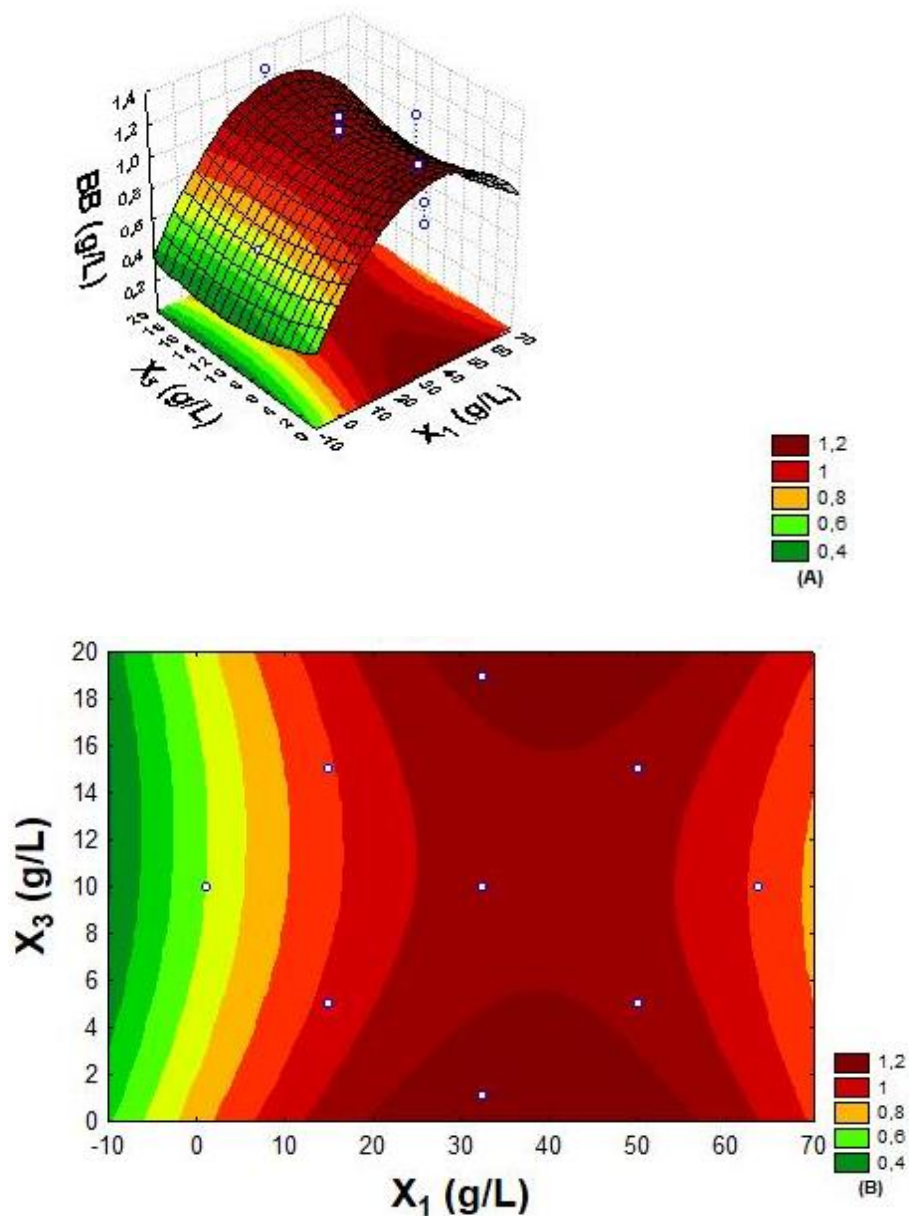
Figura 30 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a concentração de biomassa bacteriana (BB) em 48 horas de fermentação, em função das variáveis xilose (X_1) e nitrogênio (X_2).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

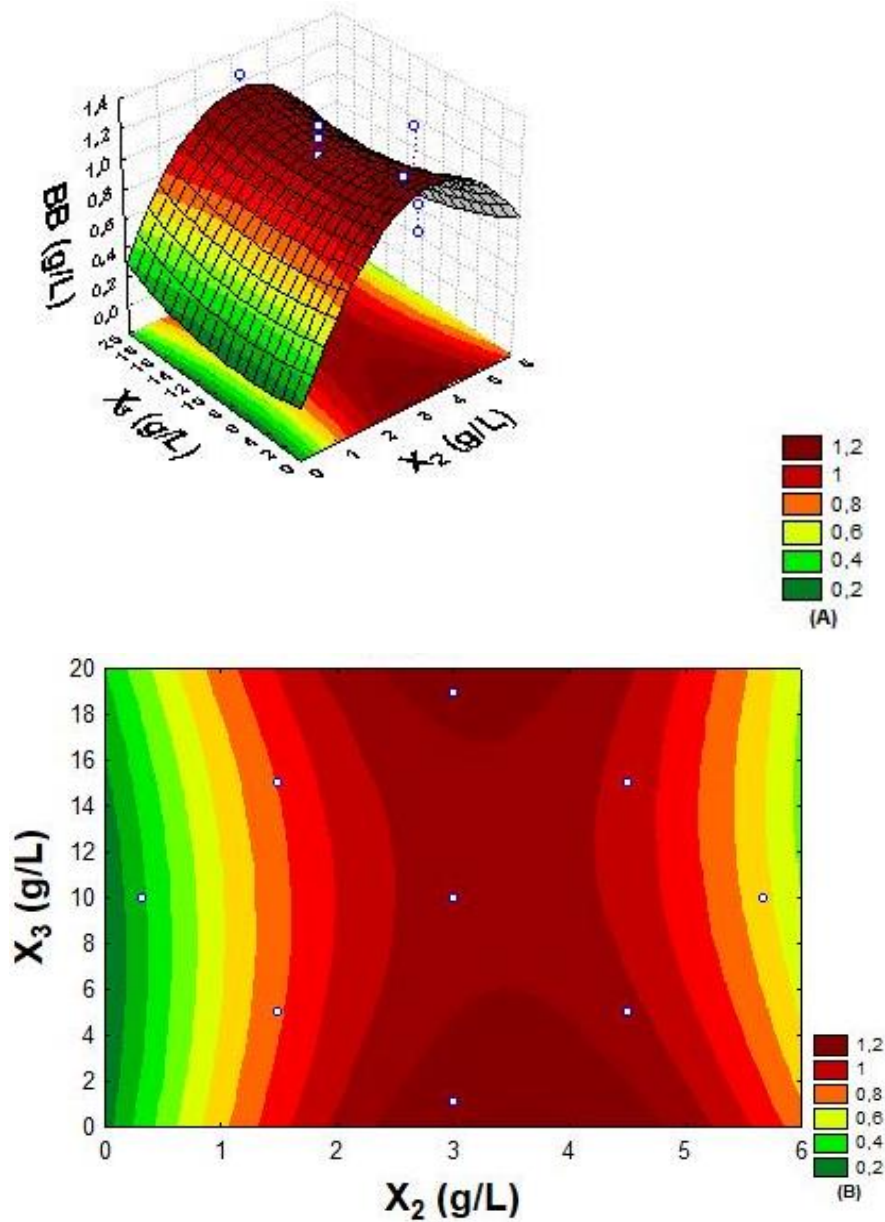
Assim como a resposta ácido láctico, o acetato de sódio não teve influência no crescimento da cepa BMI mesmo variando na faixa de 0 a 20 g/L. Pode se observar pelas Figuras 31 e 32 que quando as variáveis X_1 e X_2 , respectivamente, quando estão na zona em vermelho, representando o máximo de crescimento bacteriano (1,2 g/L) o acetato de sódio permanece na zona verde, onde há uma baixa concentração de biomassa (0,4 g/L).

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).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

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).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.3.3.4 Açúcar residual

Os ensaios realizados a partir do DCCR com variação na concentração da fonte de carbono (xilose) fonte de nitrogênio (extrato de levedura e peptona bacteriológica) e acetato de sódio estão demonstrados na Tabela 13 com os valores reais da matriz do planejamento, assim como a resposta obtida para a concentração de açúcar residual.

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 resposta corresponde a concentração de açúcar residual em 48 horas de fermentação.

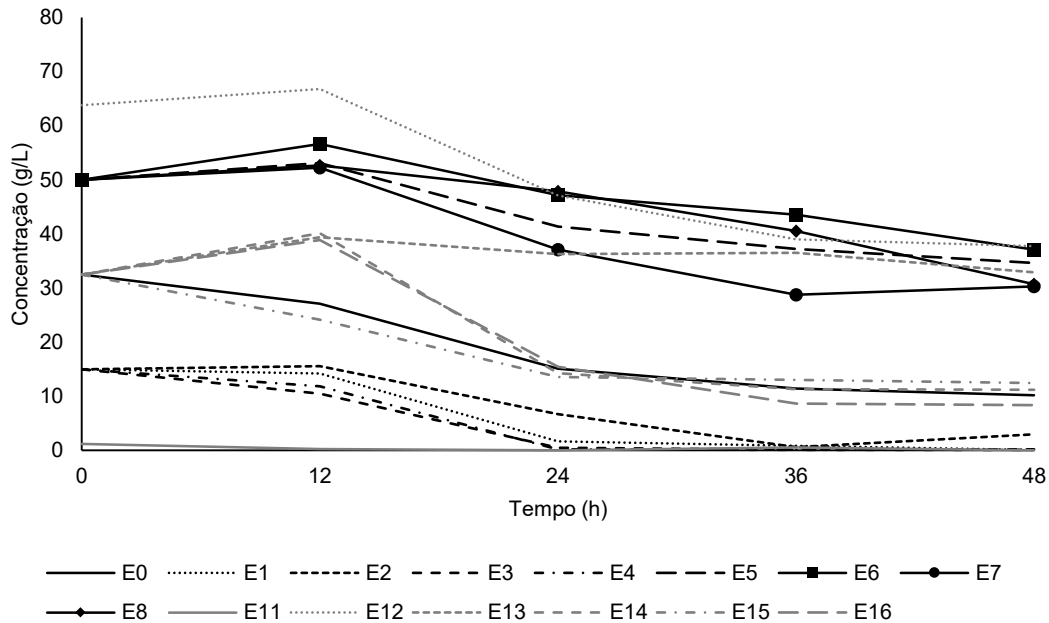
Ensaio	Variáveis			Resposta
	X1	X2	X3	Y
	Xilose	Nitrogênio	A. sódio	Açúcar residual
1	15	1,5	5	0,1
2	15	1,5	15	2,96
3	15	4,5	5	0,22
4	15	4,5	15	0,12
5	50	1,5	5	34,64
6	50	1,5	15	37,1
7	50	4,5	5	30,32
8	50	4,5	15	30,7
9	32,5	3	10	11,86
10	32,5	3	10	13,36
11	1,19	3	10	0,04
12	63,805	3	10	37,76
13	32,5	0,31	10	32,9
14	32,5	5,68	10	11,22
15	32,5	3	1,05	12,46
16	32,5	3	18,94	8,38
17	32,5	3	10	9,16
18	32,5	3	10	6,34

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Os resultados demonstrados são referentes ao açúcar residual, ou seja, a xilose não consumida após 48 horas de fermentação (Figura 33), que é o último tempo de retirada de amostra e o que apresentou a maior produção de ácidos lácticos e acéticos. Os ensaios que apresentaram uma concentração de xilose residual inferior a 3 g/L são os ensaios em que a concentração de açúcar trabalhada foi de 15 g/L (ensaios 1 a 4) e 1,19 g/L referente ao ensaio 11 (Tabela 13).

Já os ensaios onde foi trabalhado com uma concentração de 50 g/L (ensaios 5 a 8) e 63,80 g/L (ensaio 12) apresentaram uma grande quantidade de açúcar residual (Tabela 13), ou seja, a cepa BMI não utilizou nem para o crescimento e nem para a produção de ácidos, já que ambos os resultados apresentaram maiores valores em outros ensaios.

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.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

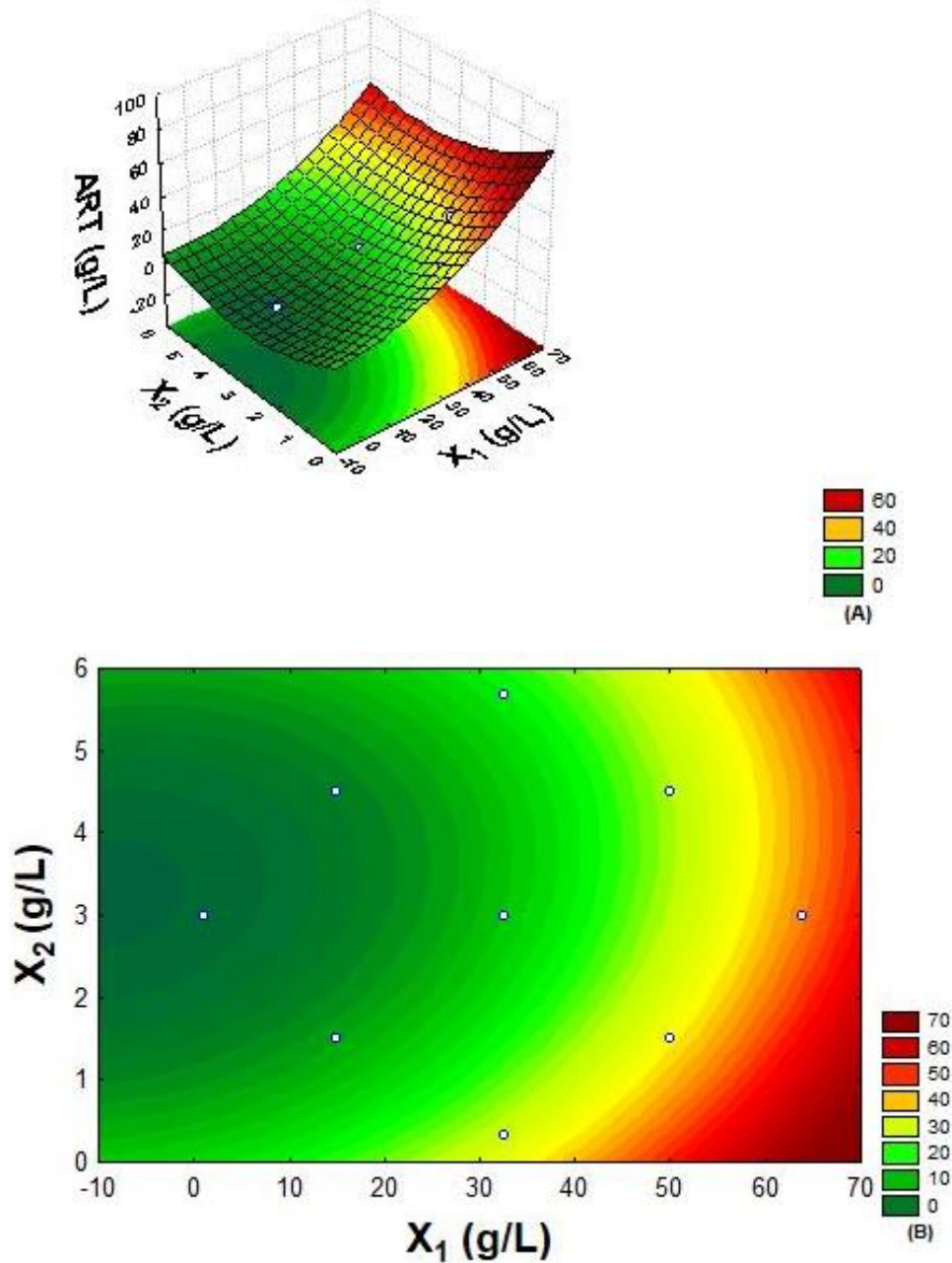
A partir da resposta açúcar residual (y) foram feitas as análises de regressão múltipla que geraram as equações de regressão apresentadas abaixo:

$$y = 10,19 + 13,66(X_1) - 3,62(X_2) - 0,11(X_3) - 2,77(X_1^2) + 3,76(X_2^2) + 0,12(X_3^2) - 1(X_1X_2) + 0,01(X_1X_3) - 0,63(X_2X_3) \quad (3)$$

Sendo que y é a resposta predita que é a xilose residual, e X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis codificadas para xilose, fonte de nitrogênio e acetato de sódio, respectivamente.

Os gráficos de superfície de resposta e curva de contorno (Figuras 34, 35 e 36) geradas pelo modelo são capazes de demonstrar os efeitos de interação das variáveis e identificar os níveis ideais de cada uma. A finalidade foi identificar as melhores condições para se obter uma menor quantidade de açúcar residual possível e mesmo assim ter uma alta produção de ácido lático.

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).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

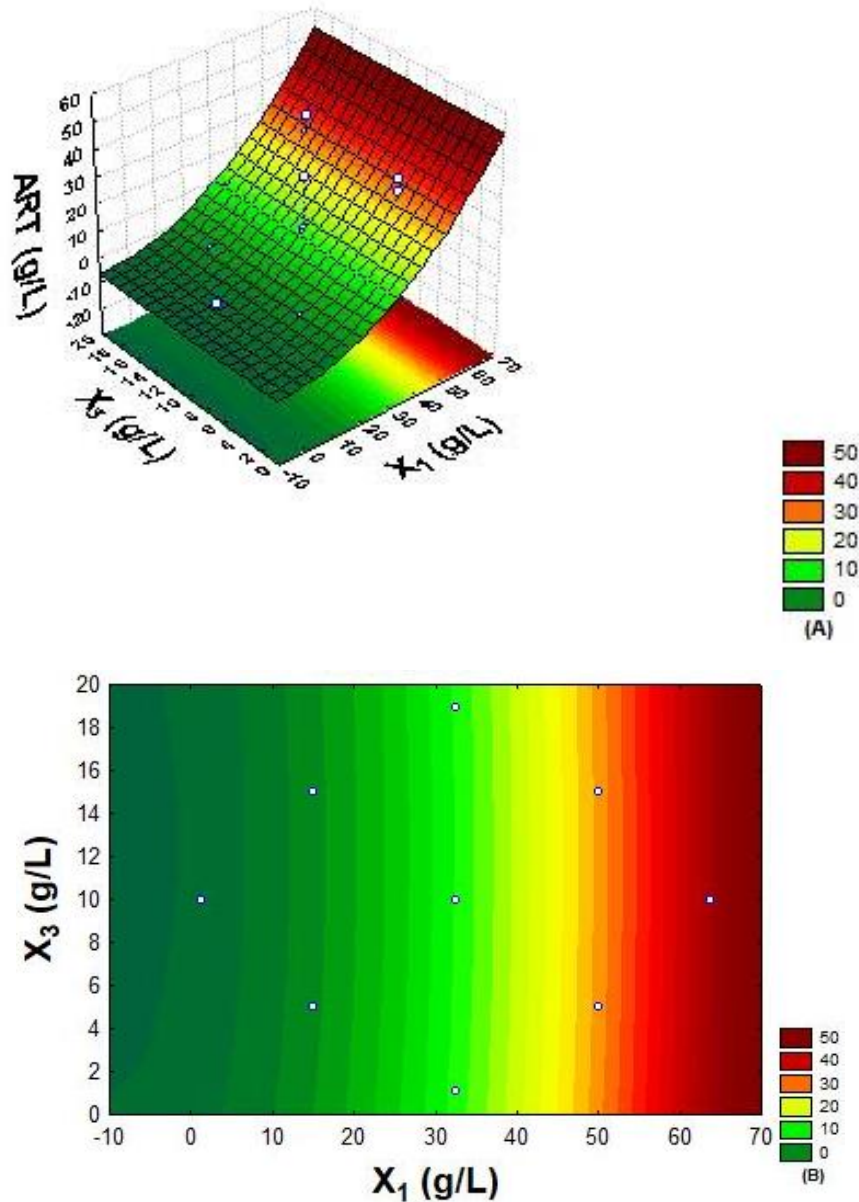
Como observado na Figura 34, para que tenha menos açúcar residual no meio de fermentação, a concentração de xilose deve ser abaixo de 45 g/L e a concentração da fonte de nitrogênio deve estar em 3,5 g/L.

Ouyang et al., (2012), ao utilizarem 80 g/L de xilose como fonte de carbono para a cepa *Weizmannia coagulans* NL01, obtiveram 60,8 g/L de ácido lático e entorno de 7,5 g/L de açúcar residual. Com 100 g/L de xilose a produção alcançou 75 g/L, mas a quantidade de açúcar residual foi de 15 g/L.

A quantidade máxima de xilose utilizada no planejamento foi de 63,80 g/L, a qual resultou 37,76 g/L de xilose residual, no entanto não foi com essa concentração em que se atingiu a maior concentração de ácido lático e nem de biomassa. Sendo assim, o aumento da concentração de xilose pode estar ocasionando uma inibição para o crescimento e consequentemente a produção do metabólito de interesse.

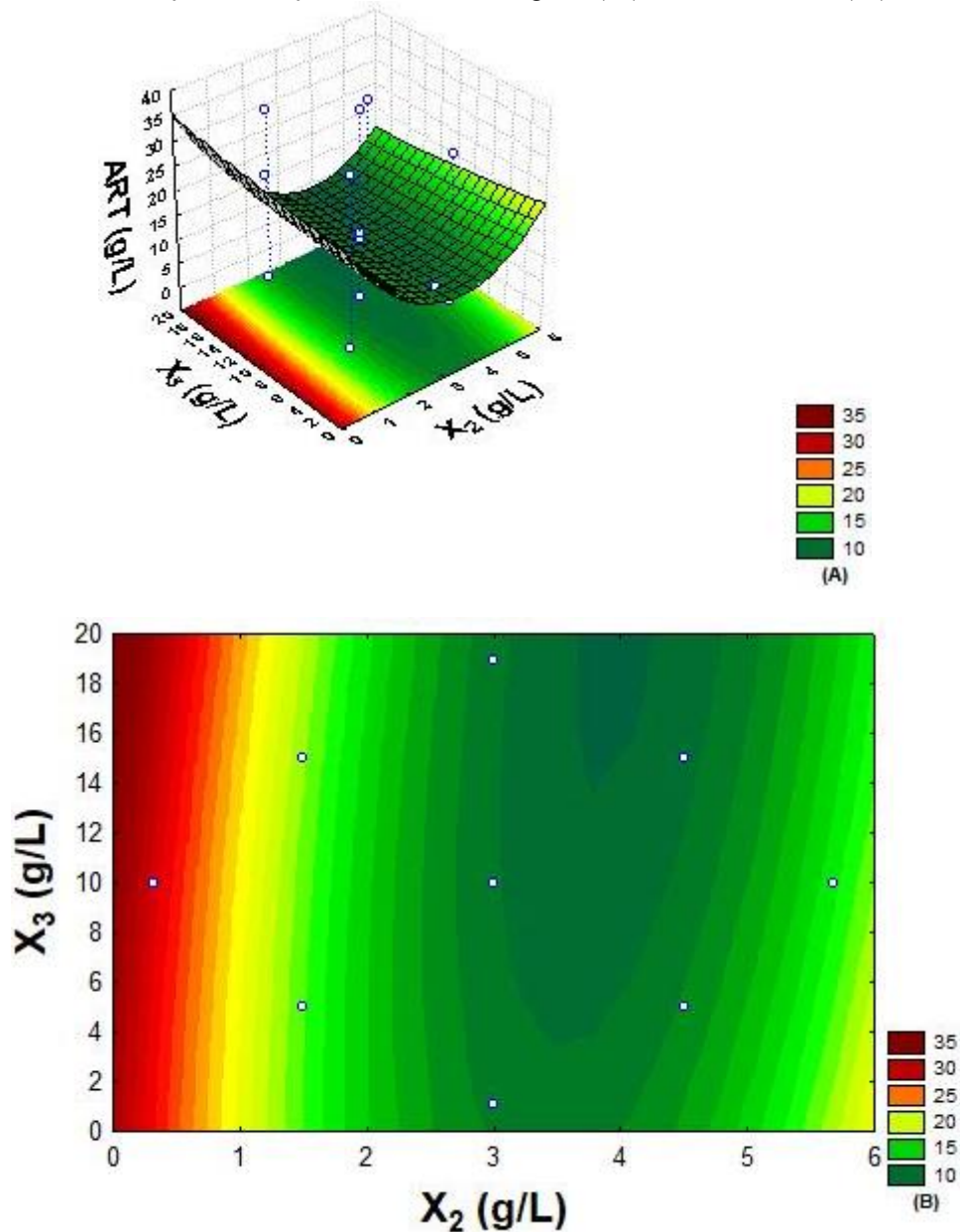
Uma outra hipótese é que seria necessário realizar uma alimentação com CaCO_3 , já que após 36h de fermentação o agente neutralizante estava praticamente esgotado no meio, com isso a formação de ácidos estava atrapalhando o metabolismo bacteriano, dificultando o consumo da xilose e consequentemente impossibilitando uma maior produção de ácido lático e uma menor quantidade de açúcar residual.

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).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

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).



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

O resultado observado nas Figuras 35 e 36 são os resultados esperados, como o acetato de sódio não possui influencia nem na produção de ácido lático e nem no crescimento de *W. ginsengihumi* BMI, conseqüentemente não haveria influencia na repostagem açúcar residual.

5.3.3.5 Validação do ponto escolhido como ótimo e cinética da fermentação em shaker

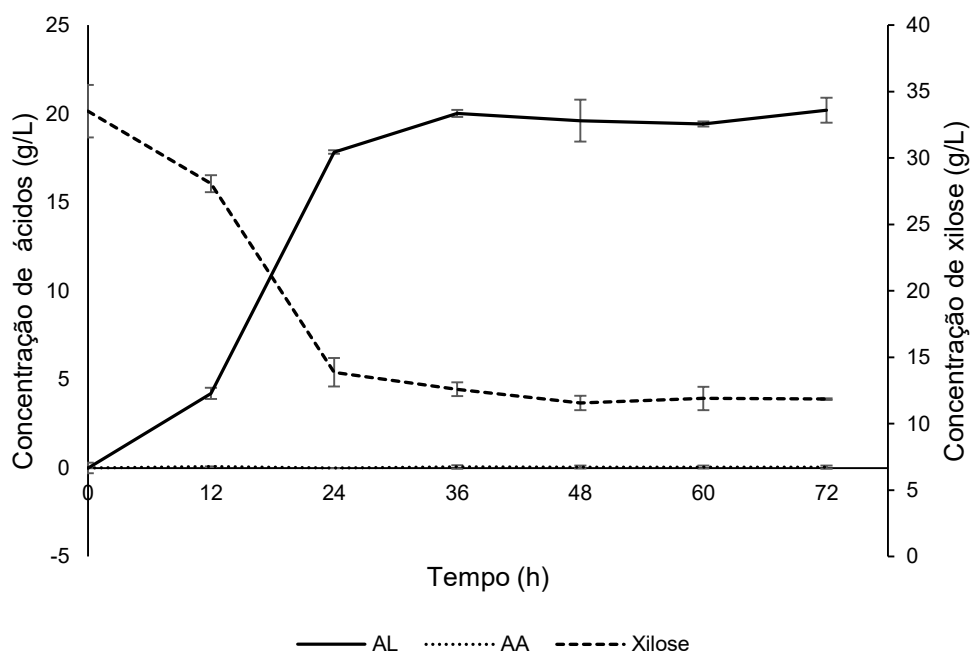
Com os resultados apresentados anteriormente, e considerando que uma ótima fermentação deve apresentar concentração máxima de ácido lático e uma menor concentração possível de açúcar residual, os parâmetros escolhidos foram 32,5 g/L de xilose e 3,5 g/L de fonte de nitrogênio, como

o acetato de sódio não apresentou influências sobre as respostas de interesse, como o metabolito produzido e o crescimento bacteriano, o mesmo foi retirado do meio de fermentação.

Dessa forma, a concentração de ácido acético será reduzida apresentando uma vantagem, devido à coprodução de ácido acético o custo de separação e purificação do ácido láctico presente no caldo de fermentação têm um aumento significativo (YE *et al.*, 2013).

Foi feito então uma cinética de fermentação, com o objetivo de visualizar o comportamento do microrganismo BMI em relação a produção de ácidos orgânicos e o consumo da pentose ao longo do tempo (Figura 37). A fermentação foi conduzida por 72 horas para observar se o crescimento, produção continuaria ao longo do tempo, e consequentemente reduziria a quantidade de xilose residual.

Figura 37 - Cinética da produção de ácido láctico (AL) e ácido acético (AA), e consumo de xilose por *W. ginsengihumi* BMI. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 72h.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Como pode ser visualizado na Figura 37, em 12 horas *W. ginsengihumi* BMI inicia a fase exponencial de produção de ácido láctico. A produção total de ácido láctico em 72 h foi de 20,20 g/L, e também a maior produção. A produtividade foi de 0,28 g/L/h, e a quantidade de açúcar residual foi de 11,85 g/L. No entanto, em 36 horas de fermentação a produção foi de 20,02 g/L, mas a produtividade foi maior, chegando a 0,55 g/L/h, e uma quantidade de açúcar residual de 12,59 (Figura 37).

O maior valor de velocidade instantânea de produção de ácido láctico ocorreu no intervalo de tempo entre 12 e 24 horas, obtendo 1,13 g/L/h. E nesse mesmo intervalo ocorreu a maior velocidade instantânea no consumo de xilose, com um valor de 1,18 g/L/h. O fato de as velocidades

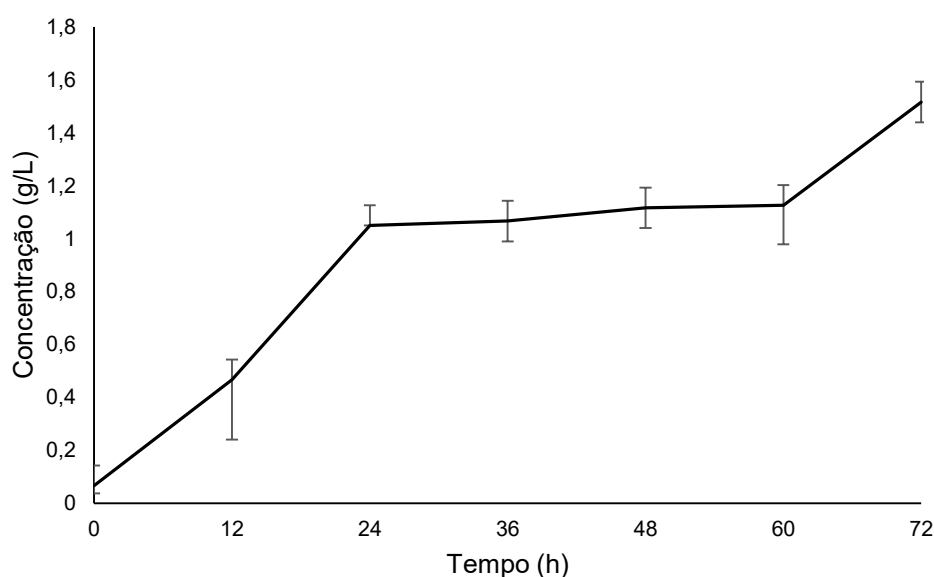
instantâneas de produção e consumo ocorreram no mesmo intervalo de tempo pode indicar que o microrganismo consumiu o substrato para a produção da biomolécula.

Nota-se que a concentração do ácido acético foi baixa, não chegando nem a 0,5 g/L, ou seja, esse resultado valida que não é necessário a adição de acetato de sódio no cultivo da cepa BMI, uma vez que o ácido de interesse nessa pesquisa é o ácido lático que continuou sendo produzido e em uma boa concentração.

O planejamento experimental é uma importante ferramenta, uma vez que a diminuição da concentração de um metabólito pode acarretar em menores desafios na extração e purificação da molécula de interesse.

A Figura 38 mostra a curva de crescimento da cepa BMI. A maior concentração de massa seca foi gerada após 72 horas de fermentação, com um valor de 1,5 g/L, com base nesse resultado, considera-se que a fermentação possa ser estendida além das 72 horas de fermentação para a completa metabolização da xilose que ainda estava presente no meio e conseqüentemente aumentar a concentração de ácido lático.

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.



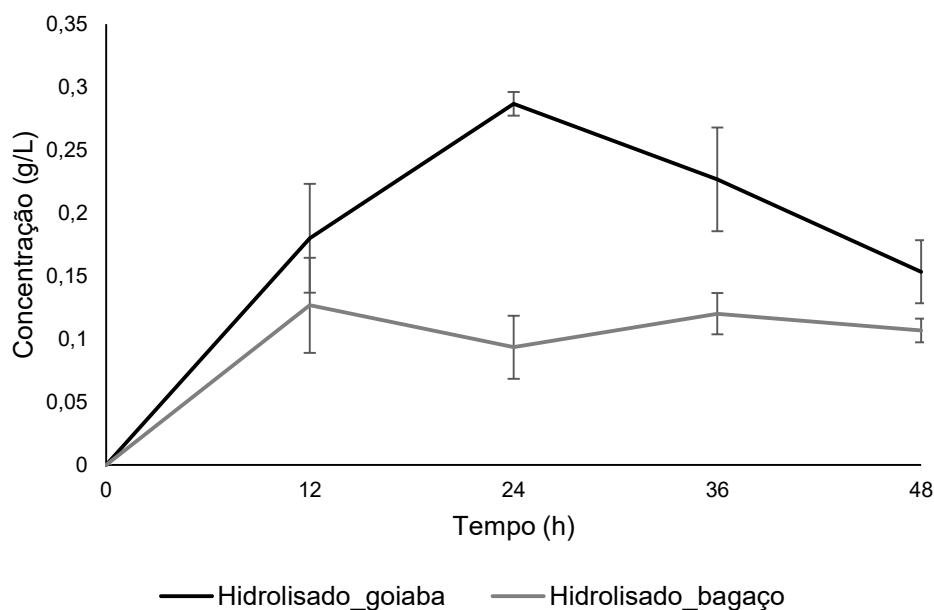
Fonte: Elaborada pela autora (2023).

5.3.4 Fermentação resíduos

A seguir serão apresentados os resultados de crescimento, consumo do substrato e produção de ácido lático pela bactéria BMI utilizando o hidrolisado de goiaba e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Em relação a biomassa a cepa BMI apresentou um maior crescimento quando foi utilizado o hidrolisado de goiaba como fonte de carbono, atingindo $0,28 \pm 0,009$ g/L após 24 horas de fermentação (Figura 39), enquanto que utilizando o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar foi observada uma maior concentração após 12 horas de fermentação com um valor de $0,12 \pm 0,03$ g/L (Figura 39).

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.

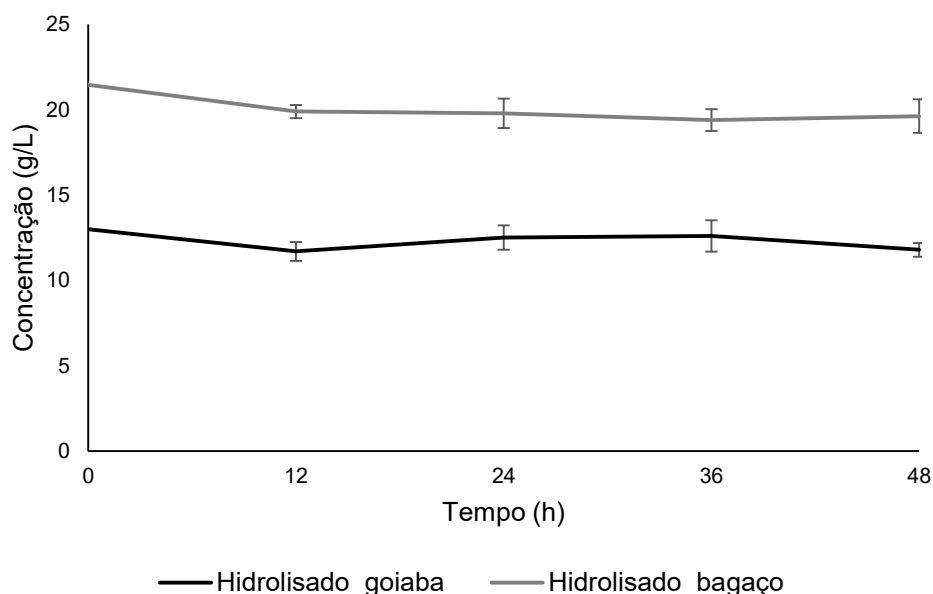


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Nota-se que houve uma redução em 80% do crescimento quando foi utilizado a xilose pura como fonte de carbono (item 5.3.2). Isso pode ocorrer por conta da presença de inibidores provenientes do tratamento da biomassa lignocelulósica, como furano, ácidos orgânicos e compostos fenólicos que reduzem a taxa de crescimento das células (VAN DER POL *et al.*, 2014). O furfural é um composto formado durante a hidrólise, causado pela desidratação da xilose em pH ácido e alta temperatura. A presença desse inibidor pode gerar espécies reativas de oxigênio que podem danificar o DNA e as membranas de microrganismos (VAN DER POL *et al.*, 2016).

Consequentemente, como o crescimento foi baixo, a xilose presente nos resíduos quase não foi consumida (Figura 40). A concentração inicial de xilose no hidrolisado de semente de goiaba foi de 13 g/L e o maior consumo foi após 48 horas de fermentação, consumindo 1,2 g/L, ou seja, ainda havia $11,8 \pm 0,4$ g/L de xilose disponível no meio. Enquanto que no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar havia uma concentração inicial de 21,57 g/L, e após 36 horas de fermentação a quantidade de xilose residual foi de $19,4 \pm 0,6$ g/L, ou seja, a bactéria consumiu cerca de 2 g/L.

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.

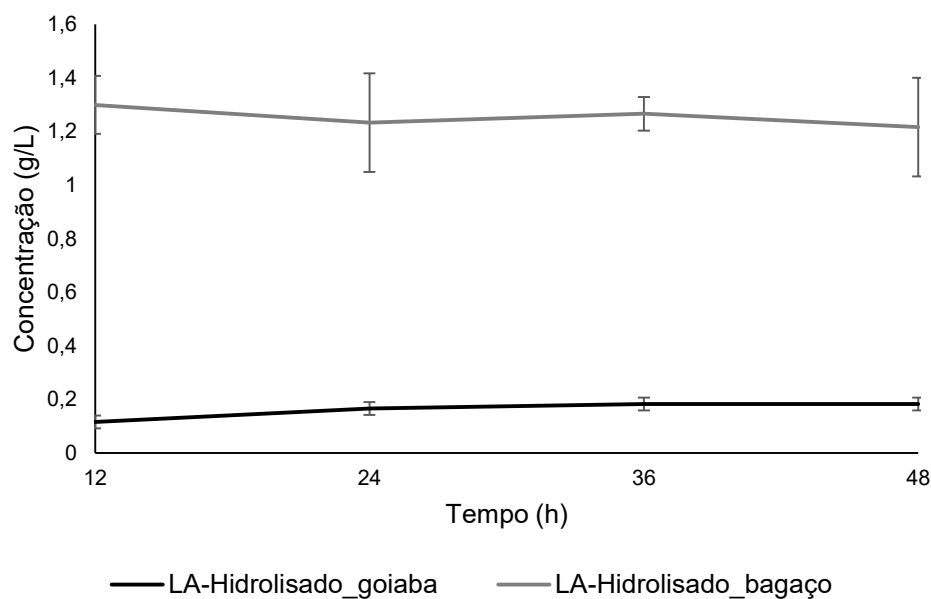


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Na metabolização da xilose, as bactérias utilizam a enzima xilose isomerase para a conversão da xilose em xilulose, a qual é então fosforilada pela xilulose quinase para formar a xilulose 5-fosfato. Esta por sua vez será metabolizada ou pela via das pentoses fosfato ou via da fosfoacetolase (ZHANG *et al.*, 2019). Como o furfural inibe o ciclo da glicólise, inibindo as enzimas necessárias na metabolização do substrato em *Saccharomyces cerevisiae* (MODIG *et al.*, 2002), pode-se inferir que o furfural é um composto que conseguiria impedir o funcionamento de enzimas-chave envolvidas no processo de metabolização da xilose.

Pelo fato da cepa BMI não ter um consumo eficiente da xilose presente nos resíduos, a produção de ácido láctico não foi a mesma quando comparado aos resultados obtidos utilizando xilose pura. Se obteve a máxima produção do ácido orgânico de interesse utilizando o hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, com uma concentração de $1,26 \pm 0,06$ g/L após 36 horas de fermentação (Figura 41). Enquanto que a produção máxima de LA utilizando o hidrolisado da semente de goiaba foi um valor de $0,18 \pm 0,02$ g/L após 48 horas de fermentação (Figura 41).

Figura 41 – Produção de ácido láctico 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.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Em muitos estudos na literatura *W. coagulans*, demonstra ser uma espécie bastante robusta, conseguindo consumir o substrato, crescer e produzir ácido láctico mesmo na presença de inibidores lignocelulósicos. *W. coagulans* MXL-9 foi capaz de fermentar 20 g/L de xilose e realizar uma conversão de 90% em ácido láctico mesmo na presença de 30 g/L de ácido acético, o único ponto foi que a fermentação foi realizada por 2 dias, enquanto que o controle foi capaz de metabolizar a xilose após 14 horas de fermentação (WALTON *et al.*, 2010).

No estudo de Abdel-Rahman *et al.*, (2021) a bactéria *W. coagulans* Azu-10 demonstrou potencial de crescimento, completa metabolização da xilose e alta produção de ácido láctico mesmo na presença de compostos inibidores. O ensaio controle apresentou um crescimento em densidade óptica de 9,42 (562 nm), enquanto que o ensaio com a presença de 5 g/L de ácido acético foi observado uma D.O. de 2,1. Em relação ao consumo da xilose, o controle metabolizou completamente o substrato, e o ensaio com furfural foi verificado 6,14 g/L de açúcar residual.

A produção de ácido láctico foi de 20 e 15,9 g/L para o ensaio controle e ensaio com 5 g/l de furfural, respectivamente. Mas surpreendentemente, a cepa Azu-10 foi capaz de degradar o furfural, pois não foi detectado ao longo da fermentação (ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2021).

Esses resultados demonstram que mesmo as bactérias *W. coagulans* e *W. ginsengihumi* pertencerem ao mesmo clado, são bactérias que apresentem fitness metabólicos diferentes, dessa forma apresentando sensibilidade diferentes aos inibidores de crescimento citados anteriormente, sendo que a cepa BMI é sensível ao contrário da cepa Azu-10.

5.4 EVOLUÇÃO ADAPTATIVA LABORATORIAL

A espécie *W. coagulans* BLMI foi escolhida para realizar a evolução adaptativa laboratorial, pois foi a maior produtora de ácido láctico e também porque BLMI apresentou uma maior D.O. em atmosfera de anaerobiose, além de ser uma espécie pouco conhecida e sensível.

Inicialmente BLMI passou por 21 transferências, onde já estava na concentração de 80mM de ácido láctico em pH 4,8, no entanto a população 2 parou de se multiplicar, e foi dada continuidade no ensaio com a população 1 e 3. Porém, a população 1 também parou de crescer, porém na 24ª transferência, mesmo estando na mesma concentração de 80 mM de ácido láctico. Com isso, optou-se por prosseguir com a ALE derivando a população 3, a única sobrevivente, em outras 2 populações. Dessa forma, as populações de agora em diante serão tratadas como população 3.1, 3.2 e 3.3.

A população 3.2 não se multiplicou mais na 60ª transferência, totalizando 239 gerações, nesse momento a concentração de ácido láctico era de 87 mM (pH 4,67). As populações 3.1 e 3.3 foram mantidas até a 71ª transferência, a uma concentração de ácido láctico de 90 mM (pH 4,65). Foi possível obter 280 gerações com a população 3.1, e 279 gerações com a população 3.3.

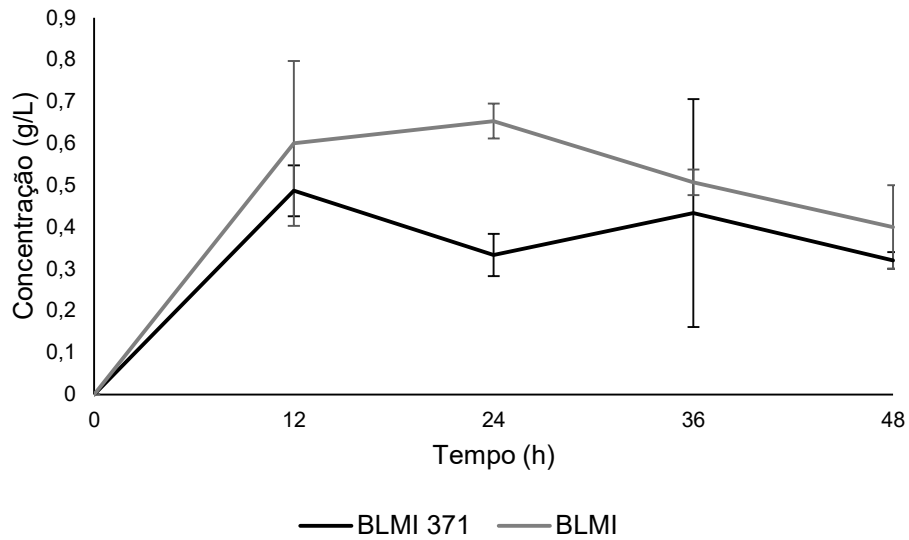
A inibição do crescimento bacteriano neste caso foi dada devido a permeabilidade do ácido através das membranas plasmáticas, e com o aumento da transferência de prótons há um distúrbio no pH intracelular. A diminuição do pH intracelular causa simultaneamente o impedimento da propagação celular e a viabilidade (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

5.4.1 Fermentação *W. coagulans* BLMI – Selvagem X evoluída

A seguir serão apresentados os resultados obtidos nos experimentos de produção de ácido láctico com a cepa BLMI e a população 3.1 da evolução, denominada como BLMI 371. Onde foram avaliados o crescimento, produção de ácidos orgânicos e consumo do substrato.

Em relação a biomassa (Figura 42) a cepa selvagem BLMI apresentou um maior crescimento após 24 h de fermentação, com uma concentração de $0,65 \pm 0,04$ g/L. Enquanto que a cepa evoluída BLMI 371 apresentou o maior crescimento após 12 h de fermentação, chegando a uma concentração de $0,48 \pm 0,06$ g/L.

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.

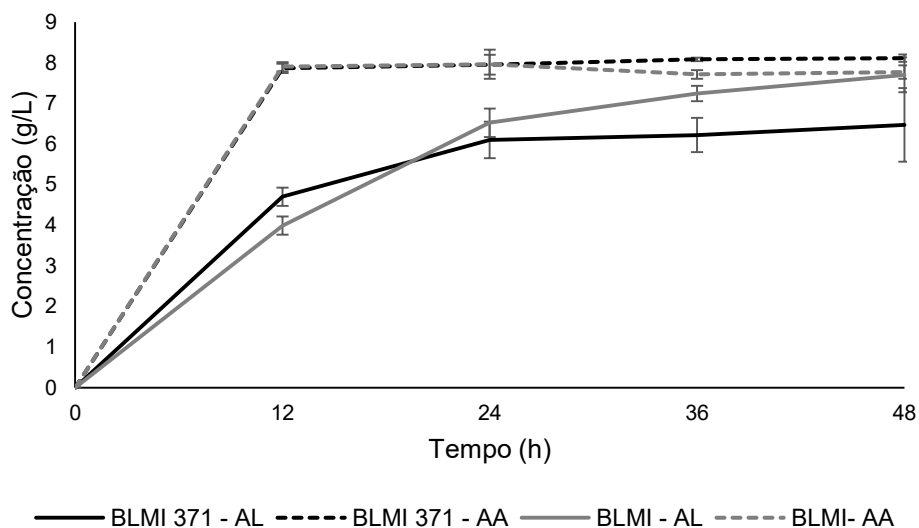


Fonte: Elaborada pela autora (2023).

A produção de ácidos orgânicos pela cepa selvagem e evoluída pode ser observado na Figura 43. Mesmo o ensaio sendo conduzido em condições de anaerobiose tanto para cepa BLMI quanto para a cepa BLMI 371, a produção de ácido acético foi superior a produção de ácido láctico. BLMI atingiu a máxima concentração de ácido acético de $7,96 \pm 0,35$ g/L após 24 horas de fermentação (Figura 43), enquanto que BLMI 371 atingiu a maior produção desse mesmo ácido após 48 horas de fermentação, com uma concentração de $8,11 \pm 0,08$ g/L (Figura 43).

Em relação a produção de ácido láctico, o ácido de interesse nessa pesquisa, a cepa selvagem BLMI produziu $7,70 \pm 0,4$ g/L após 48 h de fermentação, enquanto que a cepa evoluída BLMI 371 produziu uma concentração de $6,47 \pm 0,9$ g/L também após 48 h de fermentação.

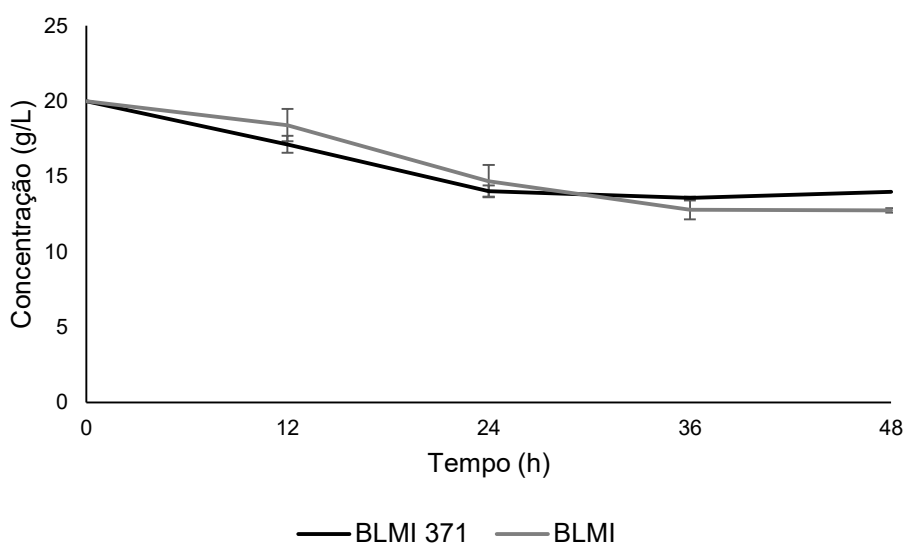
Figura 43 - Produção de ácido láctico pelas cepas *W. coagulans* BLMI e *W. coagulans* BLMI 371 em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

O consumo da fonte de carbono (Figura 44) foi bastante similar entre as duas cepas, ao final do processo, após 48 h de fermentação a concentração de xilose consumida pelas cepas BLMI e BMLI 371 foi de $12,75 \pm 0,1$ g/L e $13,97 \pm 0$ g/L, respectivamente. Ambas apresentaram um maior consumo da fonte de carbono em até 24 h de fermentação, resultado que coincide com o crescimento principalmente da cepa BLMI (Figuras 43 e 44).

Figura 44 - Consumo da xilose pelas cepas *W. coagulans* BLMI e *W. coagulans* BMLI 371 em meio XYP contendo 20 g/L de xilose. O cultivo ocorreu a 150 rpm, 50 °C durante 48 horas de fermentação.



Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Realizando a fermentação sem o agente neutralizante com a cepa evoluída, esperava-se conseguir uma concentração de ácido lático superior a cepa selvagem, pois no decorrer das transferências foi possível chegar a concentração de 90 mM de ácido lático, no entanto BLMI 371 produziu a quantidade de ácido lático equivalente a uma concentração de 71 mM, com um pH de 4,97.

Acredita-se que as 71 transferências (200 gerações) não foram o suficiente para que ocorresse alguma mudança relacionada a produção de ácido lático, e que a bactéria apenas foi capaz de sobreviver, ou seja, as mais resistentes foram selecionadas. Para tentar obter uma cepa que além de resistente produza o ácido lático, seria necessário intervenções genéticas, como por exemplo a utilização de plasma atmosférico à temperatura ambiente (*Atmospheric pressure room temperature plasma* – ARTP), que é uma ferramenta de mutagênese de célula inteira recém desenvolvida baseada em plasma de descarga de luz de pressão atmosférica de radiofrequência que apresenta taxa de mutação mais altas que a radiação Ultra Violeta (UV) ou agentes mutagênicos (OTTENHEIM; NAWRATH; WU, 2018; LIU *et al.*, 2020).

Outra estratégia seria obter uma cepa com resistência ao pH ácido, e excelente produtora de ácido lático pela técnica de edição de genes CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short*

Palindromic Repeats)/Cas9 (CRISPR- associated protein 9) (JINEK *et al.*, 2012), que nada mais é do que um mecanismo de defesa encontrado naturalmente em 40% das bactérias, pois é um sistema imunológico adaptativo (TIAN *et al.*, 2021; EBRAHIMI; HASHEMI, 2020). No estudo de Tian *et al.*, (2021), os autores desenvolveram uma cepa de *Lactobacillus paracasei* resistente a altas temperatura por meio da ALE, e um excelente produtor de ácido lático de alta pureza por meio da engenharia metabólica. Os resultados obtidos no estudo foi a obtenção de uma cepa de *Lactobacillus paracasei* que fermenta a 45 °C e produz 221 g/L de L(+) ácido lático com uma pureza óptica de 99% (TIAN *et al.*, 2021).

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 láctico 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 láctico. 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-productividade-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 production from 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 resources I. **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 from potato peel waste by anaerobic sequencing batch fermentation using undefined mixed culture. **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 and Markets. Poly lactic 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.