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

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUCCA MOREIRA BIGNELLI

Produção otimizada de ácido lático D(-) por *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada: estudo comparativo com *Lactobacillus delbrueckii*

Rio Claro - SP
2025

LUCCA MOREIRA BIGNELLI

Produção otimizada de ácido lático D(-) por *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada: estudo comparativo com *Lactobacillus delbrueckii*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador (a): Prof. Dr. Jonas Contiero

Coorientador (a): Me. Raphael Culim Neves

Rio Claro - SP
2025

B593p

Bignelli, Lucca Moreira
Produção otimizada de ácido lático D(-) por Saccharomyces cerevisiae geneticamente modificada : Estudo comparativo com Lactobacillus delbrueckii / Lucca Moreira Bignelli. -- Rio Claro, 2025
40 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Jonas Contiero
Coorientador: Raphael Culim Neves

1. Ácido Lático. 2. Fermentação. 3. Microbiologia. 4. Levedura (Fungos). I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

LUCCA MOREIRA BIGNELLI

Produção otimizada de ácido lático D(-) por *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada: estudo comparativo com *Lactobacillus delbrueckii*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jonas Contiero (Orientador)

Dr. Marcos André Moura Dias

Profa. Dra. Heloiza Ferreira Alves do Prado

Aprovado em: 10 de novembro de 2025

Documento assinado digitalmente
gov.br
LUCCA MOREIRA BIGNELLI
Data: 11/12/2025 15:03:39-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do discente

Documento assinado digitalmente
gov.br
JONAS CONTIERO
Data: 11/12/2025 15:45:39-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do (a) orientador (a)

Documento assinado digitalmente
gov.br
RAPHAEL CULIM NEVES
Data: 11/12/2025 15:12:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do (a) coorientador (a)

RESUMO

O ácido lático (AL), composto orgânico amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e de biopolímeros, pode ser obtido por processos químicos ou fermentativos. A rota microbiana, utilizando bactérias do grupo *Lactic Acid Bacteria* (LAB), representa uma alternativa mais sustentável e econômica, especialmente quando aplicada à conversão de resíduos agrícolas em produtos de alto valor agregado, como o poliácido lático (PLA). Este trabalho teve como objetivo otimizar a produção do isômero D(-) de ácido lático por linhagens modificadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comparando seu desempenho à produção pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii* Y15C, previamente isolada a partir de iogurte. As linhagens foram reativadas a partir de estocagem a -80ºC, em meio MRS para *L. delbrueckii* e meio YPS para *S. cerevisiae* modificada. A caracterização morfológica da bactéria foi realizada por coloração de Gram. A produção de ácido lático foi avaliada em fermentações em frasco agitado, variando-se a concentração de sacarose (1%, 2%, 2,5% e 3%) para otimização do meio. A metodologia incluiu ainda fermentações em batelada no reator laboratorial. Os parâmetros analisados foram biomassa, substrato restante e a concentração de ácido lático e ácido acético no fermentado final. A quantificação do ácido lático e identificação do isômero D(-) foram realizadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando detector UV a 210 nm, coluna Rezex ROA e ácido sulfúrico diluído como fase móvel e uma coluna quiral. Os resultados sugerem uma característica heterofermentativa da levedura geneticamente modificada, pois foi encontrada produção exacerbada de ácido acético. Ainda assim, foi observado uma melhor produção de ácido lático em biorreator com o controle total das variáveis, com concentrações finais de 5,73 g/L do ácido orgânico alvo da pesquisa. Esse estudo é parte da contribuição para o avanço na produção biotecnológica de ácido lático, visando aplicações sustentáveis na indústria de biopolímeros.

Palavras-chave: Ácido lático; Fermentação; Microbiologia; Levedura

ABSTRACT

Lactic acid (LA), an organic compound widely used in the food, pharmaceutical, cosmetic, and biopolymer industries, can be obtained through chemical or fermentative processes. The microbial route, using bacteria from the Lactic Acid Bacteria (LAB) group, represents a more sustainable and economical alternative, especially when applied to the conversion of agricultural waste into high-value-added products, such as polylactic acid (PLA). This study aimed to optimize the production of the D(-) isomer of lactic acid by modified strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, comparing their performance to that of the bacterium *Lactobacillus delbrueckii* Y15C, previously isolated from yogurt. The strains were reactivated by storage at -80°C in MRS medium for *L. delbrueckii* and YPS medium for modified S. cerevisiae. The morphological characterization of the bacteria was performed by Gram staining. Lactic acid production was evaluated in shake-flask fermentations, varying the sucrose concentration (1%, 2%, 2.5%, and 3%) to optimize the medium. The methodology also included batch fermentations in the laboratory reactor. The parameters analyzed were biomass, remaining substrate, and the concentration of lactic acid and acetic acid in the final fermentation. Lactic acid quantification and identification of the D(-) isomer were performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a UV detector at 210 nm, a Rezex ROA column, diluted sulfuric acid as the mobile phase, and a chiral column. The results suggest a heterofermentative characteristic of the genetically modified yeast, as increased acetic acid production was found. Nevertheless, improved lactic acid production was observed in a bioreactor with full control of the variables, with final concentrations of 5.73 g/L of the target organic acid. This study is part of the contribution to the advancement in the biotechnological production of lactic acid, aiming at sustainable applications in the biopolymer industry.

Keywords: Lactic acid; Fermentation; Microbiology; Yeast

Title in english: Optimized production of D(-) lactic acid by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*: comparative study with *Lactobacillus delbrueckii*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 9
2.1. A bioquímica do ácido lático 9
2.2. O gênero *Lactobacillus* 11
2.3. O gênero *Leuconostoc* 12
2.4. *Saccharomyces cerevisiae* modificada por engenharia genética para produção de D(-) Ácido lático 13
2.5. Aspectos econômicos do ácido lático 14
2.6. Produção do ácido lático 15
2.6.1. Purificação do ácido lático 16
2.6.2. Aplicações industriais do ácido lático 18
3. OBJETIVO 20
3.1. Objetivo Geral 20
3.2. Objetivos Específicos 20
4. MATERIAIS E MÉTODOS 21
4.1. Reativação dos microrganismos 21
4.1.1. *Lactobacillus delbrueckii* Y15C em meio MRS 21
4.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente em meio "Yeast-peptone" 2% sacarose (YPS) 21
4.2. Registro morfológico bacteriano por coloração de Gram 21
4.3. Otimização de produção de ácido lático produzido por levedura 22
4.3.1. Ensaio fermentativo em frasco da levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente 22
4.3.2. Fermentação em biorreator utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada 23
4.3.3. Análise do isômero produzido pela fermentação com a levedura 25

4.4. Ensaio fermentativo em frasco com bactéria *Lactobacillus delbrueckii* linhagem Y15C 25
4.5. Fermentação em biorreator com bactéria *Lactobacillus delbrueckii* Y15C 25
4.6. Detecção de sacarose residual no fermentado 25
4.7. Quantificação de biomassa 26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 27
5.1. Influência da concentração de sacarose nos ensaios em frascos Erlenmeyer com a levedura geneticamente modificada 27
5.1.1. Produção de ácido acético por levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada 27
5.1.2. Produção de ácido lático por cepa bacteriana *Lactobacillus delbrueckii* Y15C em frascos Erlenmeyer 28
5.2. Identificação de isômero D(-) Ácido Lático produzido por levedura via análise HPLC 29
5.3. Bioprocesso em fermentador 30
5.3.1. Determinação de ácido lático no fermentado por *S. cerevisiae* geneticamente modificada em biorreator 30
5.3.2. Comparação com cepa bacteriana Y15C de *Lactobacillus delbrueckii* em biorreator 33
6. CONCLUSÃO 35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

1. INTRODUÇÃO

O ácido lático (AL), também conhecido como ácido 2-hidroxipropanoico, é uma molécula orgânica que apresenta dois isômeros óticos, D(-) e L(+), os quais podem ser obtidos tanto por processos petroquímicos quanto por fermentação bacteriana, sendo uma substância amplamente encontrada na natureza (Martinez *et al*., 2013). Conforme apontado por Wee, Kim e Ryu (2006), o método químico de obtenção foi desenvolvido na década de 1960 para atender à demanda da indústria de panificação por um componente lático termotolerante, e permanece em uso até os dias atuais. Esse processo ocorre pela reação entre acetaldeído e cianeto de hidrogênio em meio básico sob alta pressão (Martinez *et al.*, 2013).

O processo microbiano, por sua vez, explora a fermentação realizada por microrganismos do grupo artificial denominado "LAB", sigla para *Lactic Acid Bacteria* ou, em tradução livre, "Bactérias do Ácido Láctico" (Raman *et al*., 2022). Além de ser mais econômico, esse método pode utilizar diversas matérias-primas renováveis, como bagaço de mandioca, espiga de milho, celulose, entre outras fontes de carbono eficientes (Ou; Ingram; Shanmugam, 2011; Jiang; Xu; Tao, 2019; Chen *et al*., 2020; Ahmed; Banat; Taher, 2020).

Existem dois principais tipos de processos fermentativos para a produção de ácido lático: os homofermentativos e os heterofermentativos, que se distinguem pela proporção de produtos e subprodutos gerados, dependendo do microrganismo utilizado. Conforme descrito por Raman e colaboradores (2022), o processo homofermentativo é o mais adequado para fins industriais, uma vez que apresenta maior rendimento de ácido lático, em contraposição ao subproduto alcoólico, o etanol.

O ácido lático tem demonstrado crescente relevância na transformação de resíduos agrícolas e industriais em produtos sustentáveis para as indústrias médica, farmacêutica, cosmética e alimentícia. Nesse contexto, os avanços na pesquisa envolvendo a utilização de ácido lático para a produção de polímeros que se assemelham aos plásticos petroquímicos ocupam uma posição central nos debates sobre um futuro mais sustentável (Ahmed; Banat; Taher, 2020; Raman *et al*., 2022).

A linhagem Y15C, uma bactéria do gênero *Lactobacillus*, foi um isolado de iogurte realizado por Coelho (2011) no Laboratório de Microbiologia Industrial da Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro. Após demonstrar alta capacidade de sintetizar o isômero D(-) puro, a cepa vem sendo estudada amplamente, visando aumentar o volume de ácido lático produzido por diversas fontes de carbono sustentáveis (Coelho, 2011; Bernardo, 2011). Partindo da mesma ideia de otimizar a produção, a partir de pesquisas de Pedreira (2025), duas

linhagens de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* foram modificadas a fim de produzir o isômero D(-) ácido lático por meio da inserção de duas cópias do gene da lactato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* no genoma, com uso da técnica CRISPR/Cas9. Essa espécie de levedura já vem sendo modificada geneticamente dessa mesma forma na última década, para o mesmo objetivo de produção acelerada de AL (Mimitsuka et. al, 2015).

Dentro desse cenário, o biopolímero poliácido lático (PLA) emerge como um potencial substituto biodegradável e compostável para os plásticos de uso único convencionais. Suas propriedades: resistência térmica, maleabilidade, moldabilidade, segurança para o consumo humano e absorção pelo organismo animal, permitem sua aplicação em uma ampla gama de indústrias (Garlotta, 2001). O PLA pode ser utilizado tanto em peças plásticas convencionais e embalagens alimentícias (de uso único) quanto em soluções de alta tecnologia no campo médico e hospitalar. Um exemplo disso é apresentado no estudo de Dong e colaboradores (2024), no qual um derivado de PLA foi utilizado na elaboração de um *scaffold* biomimético para a regeneração da interface tendão-osso.

O trabalho a seguir visa alcançar uma forma mais prática, rápida e barata, via microrganismos facilitadores de processo (levedura geneticamente modificada da espécie *Saccharomyces cerevisiae*), de produzir ácido lático em duas escalas diferentes: analítica laboratorial em frascos Erlenmeyer e biorreator. Após isso, a pesquisa comparou as vantagens e desvantagens da produção usando levedura com um produtor mais comum do mesmo isômero, uma linhagem bacteriana de *Lactobacillus delbrueckii*.

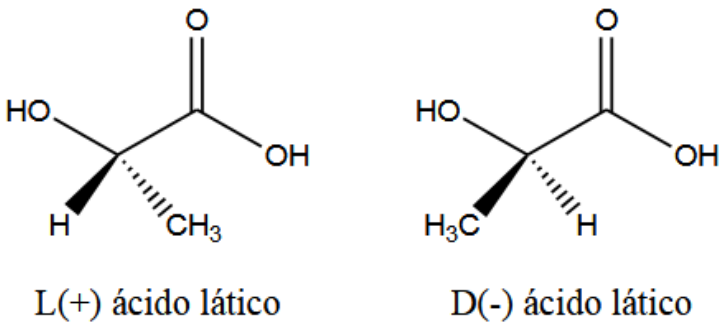
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A bioquímica do ácido lático

O ácido orgânico conhecido popularmente como ácido lático, tem molécula química descrita $CH_3CHOHCOOH$ e classificada como ácido 2-hidroxipropanoico. Sabe-se que a molécula possui dois estereoisômeros (Figura 1): D(-) e L(+), os quais são produzidos em quantidades diferentes em misturas racêmicas ou de isômeros ativos, dependendo do microrganismo utilizado na fermentação de onde deriva sua obtenção (Freire-Almeida; Maldonado-Alvarado, 2023).

Em geral, tanto as formas racêmicas como ativas são identificadas como um meio líquido incolor, possuindo característica higroscópica e ponto de fusão bastante baixo, porém a substância rica em isômero L(+) apresenta riscos à biota estomacal humana, enquanto seu isômero D(-) é instituído como seguro para consumo humano e usado amplamente na indústria alimentícia (Garcia; Paternina; Villadiego, 2010).

Figura 1 – Possibilidades isoméricas da molécula de ácido lático.



Fonte: (Beitel, 2022)

A carboxila e o grupo funcional alcoólico formam a cadeia assimétrica que enquadra um carbono assimétrico e gera uma isomeria. Sabe-se que ambas as formas isoméricas podem ser usufruídas em diversos campos da ciência e da indústria, tais como médico, alimentícia e de materiais (Ahmad; Banat; Taher, 2020; Raman *et al*., 2022).

Segundo a revisão de Freire-Almeida e Maldonado-Alvarado (2022), a busca por métodos mais sustentáveis para a produção de ácido láctico e sua subsequente polimerização tem avançado. Para alcançar uma produção eficaz, é crucial levar em conta diversos fatores abióti-

cos, como temperatura e pH, bem como fatores bióticos, incluindo a escolha da cepa microbiana, a fonte de carbono, o período de incubação e a reutilização de células por meio de técnicas de imobilização.

Nesse contexto, muitos estudos vêm sendo conduzidos para identificar substratos economicamente viáveis, gerando um crescente interesse na reutilização de subprodutos agroindustriais, como farelo de trigo, água de maceração de milho, resíduos de destilarias e resíduos da produção de cerveja, entre outros. Esses subprodutos, que muitas vezes são descartados por diferentes setores industriais, apresentam um potencial significativo para reduzir os custos de produção de ácido láctico. Isso ocorre porque, ao contrário de matérias-primas como amido e biomassa lignocelulósica que necessitam de tratamentos físicos, químicos ou enzimáticos prévios, as bactérias lácticas conseguem utilizar esses resíduos de forma direta. O gênero *Lactobacillus* destaca-se como um dos mais empregados nesse processo produtivo (Freire-Almeida; Maldonado-Alvarado, 2022).

As bactérias produtoras de ácido láctico são caracteristicamente Gram-positivas, em sua maioria não formam esporos e, embora sejam anaeróbicas, apresentam tolerância ao oxigênio. Elas podem ter formato de cocos ou bacilos. Embora muitas LABs sejam resistentes a ambientes ácidos, enfrentam inibição causada pelo próprio ácido láctico produzido, motivo pelo qual os processos de fermentação geralmente são conduzidos em pH entre 5 e 7. A faixa de temperatura ideal para o crescimento dessas bactérias varia conforme a espécie, oscilando entre 25 °C e 60 °C. As bactérias lácticas possuem exigências nutricionais complexas, pois apresentam uma capacidade limitada de sintetizar componentes essenciais ao seu crescimento, como aminoácidos e vitaminas. Além disso, elas necessitam de elementos como carbono, crucial para a geração de energia na fase de crescimento exponencial, nitrogênio e minerais, que são fundamentais para a manutenção celular, o crescimento e a produção de ácido láctico (Macedo *et al*., 2020).

Em processos de pequena e grande escala, contar com adição de fontes de nitrogênio, como extrato de levedura, peptona e extrato de carne, pode melhorar o processo de fermentação de ácido lático. Apesar de isso também levar a um aumento nos custos operacionais de produção, meios como o “Man, Rogosa e Sharpe” (MRS) são ideais, pois seguem tal composição (Macedo *et al*., 2020; A Kimmel; Roberts, 1998; Man; Rogosa; Sharpe, 1960).

A produção de ácido láctico por meio de fermentação a partir de recursos renováveis segue algumas etapas principais: primeiro, realiza-se o pré-tratamento do substrato, que inclui a conversão em açúcares por meio de hidrólise. Em seguida, ocorre a fermentação destes açú-

cares para formar ácido láctico e posteriormente, as bactérias e as partículas sólidas são separadas do meio fermentado. Por fim, o ácido láctico passa por um processo de purificação (Hofvendahl; Hahn–Hägerdal, 2000).

2.2. O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* é parte da família *Lactobacillaceae*, pertencendo à ordem *Lactobacillales*, classe *Bacilli* e filo *Firmicutes*, de acordo com a classificação de Garrity et al. (2004). Esses microrganismos apresentam uma diversidade significativa, com algumas espécies, como *Lactobacillus rhamnosus*, sendo capazes de produzir o isômero L(+) ácido lático, enquanto outras, como *Lactobacillus delbrueckii*, sintetizam o isômero D(-) ácido lático.

Os *Lactobacillus* são um grupo variado de bastonetes Gram-positivos, não formadores de esporos, que podem ser mesófilos ou termófilos, anaeróbios ou aerotolerantes, e catalase negativos (Ioannou *et al*., 2024). Esses microrganismos têm capacidade biossintética restrita e necessitam de um meio rico em nutrientes, com vitaminas e aminoácidos, para crescerem de forma eficiente. Eles prosperam em diversos habitats, como frutas, grãos, cereais, vegetais e alimentos fermentados, tal qual leite e carne, e até mesmo na cavidade oral e no trato intestinal de humanos (Marco *et al*., 2017).

A classificação clássica de Orla-Jensen (1919) divide o gênero *Lactobacillus* com base em suas características fermentativas em três grandes grupos: 1) homofermentativos obrigatórios, 2) heterofermentativos facultativos e 3) heterofermentativos obrigatórios. Essa divisão é particularmente relevante para os microbiologistas de alimentos, uma vez que espécies dos grupos 1 e 2, além de algumas do grupo 3, são amplamente empregadas em processos de fermentação de alimentos, enquanto outras do grupo 3 estão associadas à deterioração alimentar.

Enquadrados na pesquisa de Marco e colaboradores (2017) e na tese de Coelho (2011), no grupo 1 estão os homofermentativos obrigatórios, que convertem glicose exclusivamente em ácido lático e não fermentam pentoses nem gluconato. Esses microrganismos, como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*, são fundamentais na indústria de alimentos. O grupo 2, por outro lado, compreende os heterofermentativos facultativos, capazes de fermentar hexoses em ácido lático e produzir gás a partir de gluconato, mas não de glicose. Espécies como *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* estão presentes em produtos lácteos, silagem, e no trato humano, sendo este último utilizado como cultura iniciadora em embutidos e produtos fermentados. O subgrupo 2 inclui *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus sake*, relevantes em fermentações alimentares.

O grupo 3, por sua vez, abrange os heterofermentativos obrigatórios, que transformam hexoses em ácido lático, ácido acético ou etanol, e dióxido de carbono, com produção de gás a partir de glicose como traço característico. Espécies como *Lactobacillus sanfrancisco* desempenham papeis essenciais em processos como a fermentação de pães de massa azeda, agregando sabor e aroma. No entanto, alguns membros, como *Lactobacillus bifermentans*, podem provocar deterioração, resultando em "buracos" em queijos devido à produção de gás. Outros, como *Lactobacillus brevis*, podem comprometer a qualidade de bebidas fermentadas e frutas cítricas, enquanto *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri* são conhecidos por "estragar" produtos como a maionese.

A ampla gama de funções e aplicações dos Lactobacillus os torna indispensáveis no campo da fermentação e conservação de alimentos.

2.3. O gênero *Leuconostoc*

As LAB do gênero *Leuconostoc* são produtoras de isômero D(-) ácido lático, por via heterofermentativas a partir da glicose, O *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* é o principal isolado, conhecido por ser o primeiro a crescer em alimentos fermentados de origem vegetal, antes dos membros do gênero *Lactobacillus* (Coelho, 2011). Também podem ser encontradas na natureza, habitando as raízes e partes aéreas de plantas e até já foram isoladas de urina, leite materno, resíduos fecais e sangue humano. Devido a sua característica segura para consumo e tolerância em assimilar diversas fontes de carbono, as bactérias desse gênero são usadas amplamente na indústria, principalmente com fermentação de conservas (vegetais e animais, como picles e salsichas) e derivados do leite, além de fabricação de metabólitos como álcool, exopolissacarídeos, dióxido de carbono e dextran (Díaz-Montes et. al., 2021).

Segundo Hemme e Foucaud-Scheunemann (2004), as bactérias do gênero *Leuconostoc* são cocos Gram-positivos, de formato oval, não móveis e não formadores de esporos. Apresentam metabolismo facultativamente anaeróbios, são catalase-negativas e resistentes à vancomicina. Destacam-se pela capacidade de produzir gás a partir da fermentação da glicose e pela conversão dessa fonte de carbono em *D*-lactato, sem, no entanto, realizar a hidrólise da arginina. Quanto às suas características adicionais, essas bactérias conseguem se reproduzir a 8°C, mas não a 45°C, e não se desenvolvem em pH 4,8. Demonstram tolerância ao NaCl a uma concentração de 7% e não produzem sulfeto de hidrogênio (H_2S). A fermentação de açúcares varia entre espécies e subespécies, sendo a glicose metabolizada por todas as cepas, enquanto arabinose, arbutina, celulose, frutose, celobiose, frutose, sacarose, entre outros, apresentam fermen-

tação variável. Dentre as particularidades de algumas espécies e subespécies, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis* e *Leuconostoc argentinum* não produzem exopolissacarídeos a partir da sacarose. Além disso, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* (assim como algumas cepas de *L. argentinum*) não fermenta frutose, enquanto essa mesma subespécie e algumas cepas de *L. gelidum* não metabolizam maltose. Por fim, *Leuconostoc fallax* não realiza a descarboxilação do malato.

2.4. *Saccharomyces cerevisiae* modificada por engenharia genética para produção de D(-) Ácido lático

Segundo Pedreira (2025), leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* são amplamente utilizadas devido à sua resistência a ambientes ácidos, rápido crescimento e fácil manipulação genética. Descoberta há cerca de um século, já conta com mais de 1.500 espécies conhecidas e desempenha um papel essencial na produção de cerveja, pão, vinho e bioetanol. Além disso, foi o primeiro eucarionte com o genoma completamente sequenciado. O mercado de leveduras cresce rapidamente e deve atingir US$ 6,1 bilhões até 2025. *S. cerevisiae* se destaca na fermentação por suportar condições adversas como baixo pH, estresse osmótico e alta concentração de etanol. Sua aplicação como biofábrica permite a produção de compostos valiosos, como ácidos orgânicos e poliálcoois. Técnicas de engenharia genética, como a alteração do gene GSF2 para aumentar os níveis de ATP, ampliam seu potencial biotecnológico.

Como a *Saccharomyces cerevisiae* não possui a via natural para produzir ácido lático, a pesquisa de Pedreira (2025) exigiu a introdução dessa capacidade. Para isso, a enzima D-lactato desidrogenase (D-Ldh) de *Leuconostoc mesenteroides* foi expressa heterologamente por inserção cromossômica via recombinação homóloga. Essa enzima foi escolhida por apresentar melhor desempenho cinético em comparação a proteínas homólogas de outros microrganismos e já ter sido usada com sucesso em estratégias de evolução adaptativa. O gene *lm.ldhA* foi otimizado para S. cerevisiae e expresso sob controle do promotor TEF1 e do terminador sintético Tsynth25t. A inserção do cassete pTEF-*Lm.ldhA*-Tsynth25t foi realizada por CRISPR/Cas9 em três genes, causando sua deleção simultânea. A primeira inserção ocorreu no gene *JEN1*, que codifica um transportador envolvido na recaptação do ácido lático, evitando um ciclo fútil de exportação e reabsorção. A segunda ocorreu no gene *DLD1*, responsável por uma lactato desidrogenase mitocondrial.

2.5. Aspectos econômicos do ácido lático

Considerando o enorme impacto do AL nas indústrias alimentícias, cosméticas e química geral, alguns exemplos de sua versatilidade e abrangência podem ser vistos na produção de acidulantes, preservantes, emulsificante, regulador de pH na produção de alimentos, área a qual está presente 70% da aplicação do ácido lático (Martinez *et al.*, 2013). Além disso, o ácido lático está em componentes de produtos esfoliantes, hidratantes e antienvelhecimento para empresas cosméticas e agentes desinfetantes, neutralizadores e descalcificantes para diversas indústrias químicas de produtos de limpeza. Em 2022, o mercado de ácido lático foi avaliado em 3,1 bilhões de dólares americanos (Cao *et al*., 2024), com uma estimativa de mercado para 2028 já estudada, a qual prevê que a demanda chegará em aproximadamente 5,02 bilhões de dólares americanos, com um aumento de 8% no uso de derivados, incluindo o bioplástico PLA, nos próximos 5 anos (Balasubramanian *et al.*, 2023).

A Monsanto, localizada no Texas, EUA, foi pioneira na produção de ácido láctico em larga escala por meio de síntese química, alcançando em 1963 cerca de 4.500 toneladas, o que representava 40% do consumo desse ácido nos Estados Unidos. Outra empresa que seguiu essa abordagem foi a Sterling Chemicals, que manteve a produção até o início dos anos 1990, quando decidiu interromper suas operações. No cenário asiático, a Musashino Chemical também adotou inicialmente essa tecnologia, mas, em um movimento recente, optou por modernizar sua produção e migrar para processos baseados em fermentação (Komesu *et al.*, 2017). Atualmente, as principais produtoras de ácido láctico no mercado incluem a Archer Daniels Midland Company e a NatureWorks LLC, ambas dos EUA, Purac, sediada na Holanda, e Galactic S.A., da Bélgica. Além disso, destacam-se as empresas chinesas e Musashino Chemical Co. Ltd, CCA (Changzhou) Biochemical Co. Ltd. e Henan Jindan Lactic Acid Co. Ltd., (Martinez *et al.*, 2013).

Segundo Cao e seus colaboradores em sua revisão (2024), nos dias de hoje, mais de 90% do ácido láctico é produzido por fermentação microbiana, processo que pode também gerar ácidos graxos voláteis, etanol e outros subprodutos. Por isso, os estudos vêm focando em formas de baratear o custo da produção do ácido lático, usufruindo de biomassa renovável e de baixo valor, incluindo resíduos alimentares e biomassa lignocelulósica, como alternativas para a produção de AL, afinal é estimado que a quantidade de resíduos alimentares gerada anualmente por residências, estabelecimentos comerciais e serviços de alimentação seja de 931 milhões de toneladas com o aproveitamento de resíduos como matéria-prima, já que os principais

precursores desse processo são o amido (como milho, mandioca e batata) e substratos açucarados (como cana-de-açúcar e beterraba), os quais representam aproximadamente 30% do custo total.

2.6. Produção do ácido lático

Descrito por Benninga (1990) e revisado por Komesu *et al.* (2017), a síntese química de ácido láctico pela rota do lactonitrilo, um subproduto da tecnologia de acrilonitrilo, foi descoberta por Wislicenus em 1863. O processo envolve etapas importantes: inicialmente, cianeto de hidrogênio (HCN) é adicionado ao acetaldeído líquido (CH_3CHO) sob alta pressão e na presença de um catalisador básico, resultando na formação de lactonitrilo. Posteriormente, esse lactonitrilo é recuperado, purificado por destilação e submetido à hidrólise com ácido sulfúrico (H_2SO_4), gerando ácido láctico ($CH_3CHOHCOOH$) e sal de amônio ($(NH_4)_2SO_4$). Na etapa seguinte, o ácido láctico é esterificado com metanol (CH_3OH), formando metil lactato ($CH_3CHOHCOOCH_3$), que passa por uma nova purificação por destilação e é hidrolisado com água acidificada para produzir ácido láctico e metanol. Por fim, o metanol é separado por destilação e reutilizado no processo, fechando o ciclo de produção de forma eficiente.

Devido ao alto custo, a característica racêmica das misturas resultados diante da necessidade de produtos com isômeros ativos e aos resíduos exorbitantes do processo de síntese química, principalmente aqueles derivados do consumo de combustíveis fósseis, a fermentação microbiana toma a indústria do ácido lático como processo mais utilizado (Komesu *et al.,* 2017).

No Brasil, dois resíduos bem presentes nas indústrias alimentícias são o melaço de cana-de-açúcar e o soro de leite. Ambas as misturas são ricas em fontes de carbono, mas o melaço se destaca ainda mais, pois tem sido estudado como um subproduto abundante, com aproximadamente 17,9 milhões de toneladas produzidas anualmente no país. Apesar de abundante, o melaço necessita de um processo denso e custoso de separação, já que apresenta concentração de metais pesados, os quais interagem negativamente no produto final (Coelho *et al.*, 2012).

Os resultados mais significativos na fermentação em batelada de ácido lático, usando glicose como substrato, indicam que é possível atingir uma concentração final de 150,2 g L^{-1} de ácido lático e uma eficácia de 1,34 g L^{-1} h^{-1}. Segundo Hujanen e companhia (2001), a técnica de cultura em batelada alimentada envolve a incorporação de um ou mais nutrientes ao meio de fermentação. Esse método se mostra produtivo ao reduzir a inibição provocada pelo substrato, incrementar a concentração do produto e melhorar o índice de crescimento celular. Há várias

estratégias de alimentação disponíveis, com fluxo constante ou variável, que incluem a alimentação em pulsos, bateladas alimentadas com uma concentração residual de fonte de carbono constante e a batelada alimentada de forma exponencial.

Diversas referências na literatura destacam as razões para a utilização de processos de batelada alimentada (Hujanen *et al.*, 2001; Korz *et al.*, 1995; Keller; Dunn, 1978; Ding; Tan, 2006). Um dos principais aspectos positivos é a diminuição da repressão catabólica que ocorre em fontes de carbono que são facilmente metabolizadas, as quais podem interferir na expressão dos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo. Além disso, esses processos ajudam a evitar a formação de produtos tóxicos oriundos do metabolismo.

As culturas alimentadas em batelada mostraram-se mais eficazes na produção de ácido lático em relação às culturas convencionais, especialmente em sistemas que utilizam misturas de *L. casei*, tanto em sua forma livre quanto imobilizada. A maior concentração de ácido láctico obtida (46 g L^{-1}) foi alcançada em uma cultura alimentada, usando uma combinação de células livres e co-imobilizadas, com uma concentração de substrato de 100 g L^{-1} e uma taxa de alimentação de 250 mL h^{-1}.

Outra abordagem para aumentar a produtividade envolve a reciclagem celular, permitindo a obtenção de uma elevada massa celular sem afetar o rendimento. A imobilização das células tende a elevar a densidade celular, resultando em melhorias tanto na produtividade quanto no rendimento; por exemplo, células co-imobilizadas em grânulos de alginato de cálcio mantiveram a capacidade de produzir ácido láctico por até 20 dias. Além disso, a recirculação celular levou a concentrações mais altas de ácido láctico, com rendimentos iguais ou até superiores, e vários estudos indicam que o uso de células livres frequentemente proporciona resultados mais satisfatórios.

Um outro método de fermentação é a fermentação em estado sólido (SSF), caracterizada pela proliferação de microrganismos em materiais sólidos umedecidos, sem água livre. Diversas investigações foram realizadas visando à produção de enzimas industriais por meio de SSF (Hetényi; Németh; Sevella, 2011). Nesse sentido, o substrato sólido não só oferece os nutrientes necessários, mas também funciona como suporte para as células microbianas.

2.6.1. Purificação do ácido lático

A purificação ou recuperação do produto é uma fase crucial no processo de produção de ácido láctico e é considerada parte do processamento *downstream*. Essa etapa envolve a separação e a purificação do ácido láctico presente no caldo de fermentação, que contém diver-

sas impurezas, incluindo açúcares não consumidos, corantes, nutrientes e outros ácidos orgânicos, além dos resíduos celulares. Para se conseguir um ácido lático de maior pureza, é imprescindível eliminar essas impurezas (Ghaffar *et al.*, 2014).

A revisão de Ghaffar e colaboradores (2014) expõe as operações de purificação. A cromatografia de troca iônica é opção frequentemente relacionada ao ácido lático. Este método destaca-se por sua alta seletividade e permite a recuperação do produto de forma econômica e em um tempo reduzido. Além disso, a técnica é utilizada para avaliar a pureza do AL obtido, estudar os mecanismos de adsorção e dessorção, e verificar sua viabilidade para aplicações industriais.

Tecnologias de membranas, como nanofiltração e microfiltração, têm avançado significativamente para aprimorar a purificação do ácido láctico, oferecendo benefícios como a simplificação das etapas de processamento, menor uso de produtos químicos e maior eficiência energética. O design modular desses sistemas permite uma flexibilidade que atende às exigências da produção industrial moderna, que frequentemente opera com margens de lucro reduzidas. Estudos mostram que a aplicação contínua dessas técnicas pode resultar em uma taxa de fluxo de 76 a 77 $L/m^2\ h^{-1}$ e alcançar uma pureza superior a 95% (Pal; Dey, 2012).

Estudos também apontam a nanofiltração como uma solução para aumentar a eficiência da recuperação do ácido láctico, especialmente quando combinada com processos de eletrodiálise bipolar. Por exemplo, o uso de membranas de nanofiltração DK mostrou-se eficaz na eliminação de íons de magnésio e cálcio de um caldo de lactato de sódio antes da etapa de concentração por eletrodiálise, resultando em uma maior eficiência sob pressão transmembrana. Essa técnica também conseguiu remover parcialmente íons de fosfato e sulfato, com uma taxa de rejeição de cerca de 40% (Ghaffar *et al.*, 2014).

A utilização de resinas de troca catiônica de ácido forte como catalisadores sólidos é outra abordagem eficaz na produção comercial de ácido láctico, auxiliando na remoção de íons e impurezas do meio fermentativo, promovendo um produto mais puro. Por outro lado, a separação por espuma se destaca como uma técnica econômica e simples para isolar moléculas bioativas, como proteínas e enzimas, em soluções aquosas. Essa técnica foi investigada na purificação parcial do caldo de ácido láctico e na recuperação de componentes valiosos a partir de resíduos industriais, demonstrando sua eficácia em substratos como extrato de levedura e resíduos de cervejarias (Ghaffar *et al.*, 2014; Zhang; Ma; Yang, 2004).

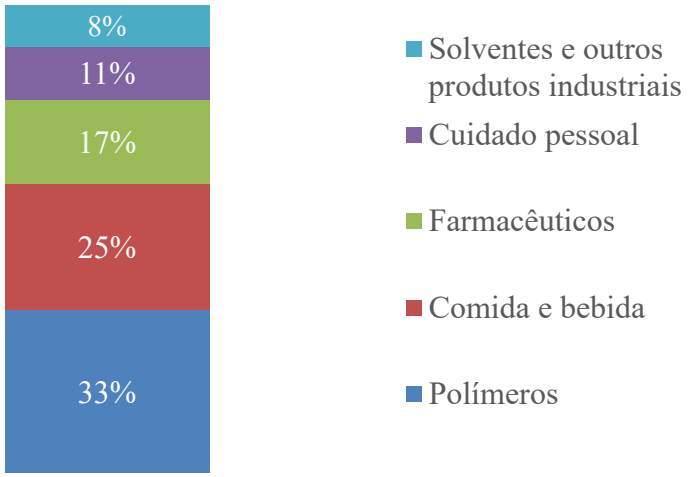
A extração de ácido láctico com n-butanol é um método baseado em solvente que depende de variáveis como pH, tempo de mistura e a proporção de volumes entre as fases aquosa e orgânica. A eficiência desse processo aumenta conforme o pH da solução é reduzido, sendo

particularmente relevante quando o pH é inferior a 1. A concentração inicial de ácido e a proporção entre as fases influenciam positivamente o grau de extração e o coeficiente de distribuição, apesar da miscibilidade parcial do n-butanol em água, que requer uma integração cuidadosa das fases para otimizar a recuperação (Chawong; Rattanaphanee, 2011).

2.6.2. Aplicações industriais do ácido lático

Como citado anteriormente, o ácido lático participa de diversos setores industriais, como produto final ou precursor desse (Figura 2). Um dos mais significativos é o mercado alimentício, ocupando aproximadamente 25% da manufatura do ácido lático mundialmente. Nessa indústria, a molécula é aplicada principalmente como acidulante, devido ao gosto acidificado que ela intensifica, mas também é amplamente utilizado como conservante e emulsificante. Como observado em alimentos de fermentação própria como o chucrute, o ácido lático também serve como inibidor de crescimento bacteriano. Além disso, também pode ser usado como regulador de pH e aromatizante para diversas bebidas, doces e enlatados (Komesu *et al.,* 2017; Fortune Business Insights, 2025).

Figura 2 – Representação gráfica dos setores industriais que mais geram produtos derivados do ácido lático no ano de 2023.



Fonte: (Fortune Business Insights, 2025)

Segundo as informações revisadas por Komesu e companhia (2017) e Balasubramanian e colaboradores (2024), o campo têxtil e químico também usufrui do ácido lático como substituto mais barato de substâncias fixadoras de tintas, anticongelantes, solventes “verdes” e precursores da produção de etanol. A farmácia também participa do mercado de ácido lático, já

que seu derivado plástico bioabsorvível, o PLA, já é utilizado em próteses, implantes temporários, sistema de entrega de medicamentos e pílulas. Atualmente, esse polímero ocupa a maior porcentagem da aplicação de ácido lático. Os cosméticos, por sua vez, aproveitam da característica microbiana, rejuvenescedora e hidratante da molécula para produtos estéticos variados, principalmente para a pele.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Otimização de produção de D(-) ácido lático por levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada através de engenharia metabólica e comparação da produção por *Lactobacillus delbrueckii* linhagem Y15C.

3.2. Objetivos Específicos

- Otimização do meio de cultura para *Saccharomyces cerevisiae* visando produção máxima de ácido lático;
- Produzir o ácido lático em frasco agitado e em biorreator laboratorial;
- Quantificação de biomassa celular, volume de ácido lático e consumo de substrato em biorreator.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reativação dos microrganismos

Ambas as linhagens, bacteriana e de levedura, se encontravam no ultra freezer do Laboratório de Microbiologia Industrial da UNESP, campus Rio Claro. A temperatura de conservação estava padronizada em -80ºC com 20% (v/v) de glicerol.

4.1.1. *Lactobacillus delbrueckii* Y15C em meio MRS

A linhagem de *Lactobacillus delbrueckii* Y15C foi reativada com o uso do meio de cultura MRS esterilizado em autoclave vertical a 121°C por 20 minutos, como é apropriada para o gênero. Segundo Bernardo (2011) e Man, Rogosa e Sharpe (1960), o composto de cultivo adaptado para a cepa é formado por (g/L): sacarose (20,0), peptona (10,0), extrato de carne (10,0), extrato de levedura (5,0) acetato de sódio (5,0), K_2HPO_4 (5,0) citrato de amônio (2,0), $MgSO_4.7H_2O$ (0,1) e $MnSO_4.4H_2O$ (0,05). A amostra reativada após incubação em placa de Petri a 45 ± 1ºC por 24h, foi usada nos consequentes experimentos.

4.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente em meio "Yeast-peptone" 2% sacarose (YPS)

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente por Pedreira (2025) foi reativada em meio YPS 2% sacarose, citado por Yen e companhia (2018) e padronizado em 2% por Pedreira (2025), o qual consiste em (g/L): extrato de levedura (10), peptona bacteriológica (20) e sacarose (20). O meio, então, foi esterilizado em autoclave vertical a 121°C por 20 minutos.

4.2. Registro morfológico bacteriano por coloração de Gram

As amostras de Y15C foram submetidas a esfregaço em lâmina laboratorial para análise em microscópio óptico. O método para primeira observação morfológica usado será o Gram, conquistando assim informações sobre a característica da membrana e a possível formação de esporos, descartando em caso de contaminação.

4.3. Otimização de produção de ácido lático produzido por levedura

4.3.1. Ensaio fermentativo em frasco da levedura *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente

O ensaio fermentativo de 5 mL de inóculo em frascos Erlenmeyer 250 ml foi feito em triplicata, sob padrão *overnight* em 50 mL de meio "Yeast-peptone", variando a concentração de fonte de carbono (sacarose) entre 1%, 2%, 2,5% e 3% com fim de otimização (Figura 2). A fermentação ocorre sob agitação rápida, 180 rpm a 28 ± 1ºC.

A concentração de ácido lático nas amostras foi realizada em experimentos através de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em cromatógrafo da marca Shimadzu, portando detector ultravioleta a 210 nm e coluna Rezex ROA (300 por 7,8 mm) da Phenomenex, com 0,005 M de Ácido sulfúrico como fase móvel, em fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 65 °C.

Figura 3 – Frascos Erlenmeyer contendo meios de cultura YPS com diferentes concentrações de sacarose para fermentação em pequena escala, posteriormente agitados em *shaker* a 180 rpm, 28ºC.



Fonte: Autoria própria

4.3.2. Fermentação em biorreator utilizando levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada

No método adaptado de Mimitsuka e colaboradores (2015), os experimentos de bioprocessos em batelada foram conduzidos em quatro fermentadores (marca Infors Multifors, 0,75L). O meio de cultura YPS varia em 1%, 2%, 2,5% e 3% como estabelecido no método em frasco, mas agora em um volume inicial de 0,3 L, e as condições operacionais foram mantidas a 30°C, com uma agitação de 400 rpm. Para garantir condições microaeróbicas, ar foi injetado no meio a 50 mL/min. A neutralização do pH foi realizada por bombas peristálticas com uma suspensão de NaOH (equivalente a 4 M), mantendo o pH em 4,5, seguindo as recomendações de estudos de fermentação utilizando *S. cerevisiae*. Amostras foram coletadas periodicamente para análise de ácidos orgânicos, açúcares residuais e concentração celular.

Figura 4 – Fermentador Infors Multifors contendo meio de cultura nas concentrações determinadas para o experimento. Controle de temperatura de 30ºC, pH 4.5, aeração de 50 ml/min e agitação de 400 rpm para levedura e temperatura de 35ºC, pH 5.5, aeração de 50 ml/min e agitação de 200 rpm para a bactéria.



Fonte: Autoria própria

4.3.3. Análise do isômero produzido pela fermentação com a levedura

Para identificação do isômero produzido, foi utilizado o HPLC da marca Shimadzu com detector UV de 254 nanômetros, portando coluna Chirex 3126 Phenomenez (150 x 4,6). Fase móvel de 1mM de Sulfato de Cobre II e fluxo monitorado de 1mL/min a 30ºC de temperatura do forno.

4.4. Ensaio fermentativo em frasco com bactéria *Lactobacillus delbrueckii* linhagem Y15C

Com a produção de ácido lático já anteriormente otimizada desses microrganismos, foi adaptado o método de fermentação em frascos proposto por Coelho (2011), no qual é preparado o caldo de cultura em meio líquido MRS de sacarose como fonte de carbono. Em seguida, 2,5 ml do estoque é inoculado em 25 ml de meio de cultura e incubada em mesa agitadora sob agitação de 150 rpm a 35ºC por 24 horas. Tendo o material, 5 ml é transferido para 50 ml de meio de cultura para fermentação por 48h a 35ºC. O fermentando então foi centrifugado em tubo falcon sob amostra de 20 ml, para posterior centrifugação a 7000 rpm por 10 minutos a 10ºC.

4.5. Fermentação em biorreator com bactéria *Lactobacillus delbrueckii* Y15C

As fermentações ocorreram em quatro fermentadores (marca Infors Multifors, 0,75L). Para a bactéria, o meio de cultura é o MRS variando em 1%, 2%, 2,5% e 3% em um volume inicial de 0,3 L, e as condições operacionais foram mantidas a 35°C, com uma agitação de 200 rpm. O ar foi injetado no meio a uma taxa de 50 mL/min. A neutralização do pH foi automaticamente feita por injeção da suspensão de NaOH (equivalente a 4 M), mantendo o pH em 5,5. Amostras foram coletadas em triplicata para análise de ácidos orgânicos, açúcares residuais e concentração celular por pesagem de biomassa seca.

4.6. Detecção de sacarose residual no fermentado

Partindo da aproximação de determinar o rendimento de carbono da amostra, a quantidade total de sacarose no final do processo de todas as fermentações realizadas será calculada usando o aparelho HPLC equipados com detectores UV/Vis e RID-10A (Shimadzu, Japão), portando uma coluna *RCMMonosaccharide* Ca+2 (8% de forma iônica de cálcio de resina reticulada/estireno-divinilbenzeno sulfonado; 300 × 7,8 mm; Phenomenex, EUA), enquanto a fase móvel é água ultra-pura sob vazão de 0,6 mL/min. A temperatura do forno da

coluna foi de 65ºC. Após determinação do valor final, a quantidade de sacarose restante no meio será considerada no valor da altura do pico (mV) correspondente no gráfico de cromatografia.

4.7. Quantificação de biomassa

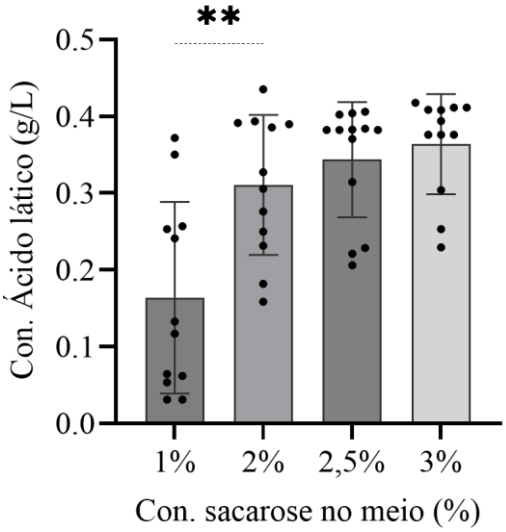
Houve a separação da biomassa do sobrenadante por centrifugação do material a 10000 rpm por 15 minutos a 10ºC em todas as análises em frasco e reator, o conteúdo celular foi seco em pellet de alumínio em estufa a 60 ± 5ºC por período *overnight* ou até a secagem total dos líquidos, visando pesagem de massa seca.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Influência da concentração de sacarose nos ensaios em frascos Erlenmeyer com a levedura geneticamente modificada

A correlação estatística ANOVA (Realizada no programa GraphPad Prism 10.6.0) descreve a relação de resultados de HPLC da concentração de ácido lático como congruentes, por volta de 0,41 g/L, nas amostras de frasco Ernlenmeyer onde as concentrações iniciais de sacarose no meio de cultura eram de 2%, 2,5% e 3%, porém indica uma relação inferior na concentração 1% sacarose quando comparada a todas as outras (Figura 5). Essa eficiência superior em concentrações inferiores é citada brevemente em trabalhos anteriores com esta mesma cepa de levedura, a qual trabalhou idealmente em 2% de sacarose no meio e apresentou ótimo potencial de resistência a acidificação do substrato em momentos avançados do bioprocesso fermentativo (Pedreira, 2025).

Figura 5 – Concentração de ácido lático obtida através de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada nas concentrações de sacarose anteriormente preconizadas. Controle de temperatura a 28ºC e agitação de 180 rpm.



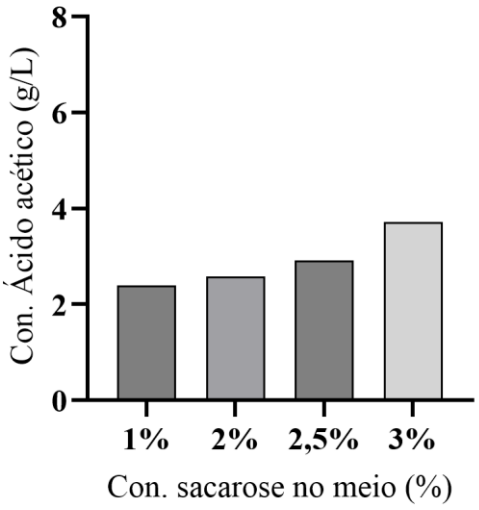
Fonte: Autoria própria

5.1.1. Produção de ácido acético por levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada

Durante as análises de ácidos orgânicos em HPLC, notou-se a presença abundante da produção de ácido acético em todas as concentrações (Figura 6). Essa informação pode revelar

a característica heterofermentativa ou homofermentativa facultativa desta cepa de levedura, já que produz também acetato, dando espaço para pesquisas futuras para tentar impedir a síntese de ácido acético em uma concentração elevada com outras edições genéticas ou aproveitar deste resultado de volume final significativa para futuras pesquisas de produção do mesmo. A produção exacerbada do subproduto pode derivar da limitação de fonte de carbono no final do processo fermentativo, o motivo qual a levedura moveu seu metabolismo para a rota do acetato (Costa, 2008).

Figura 6 – Concentração de ácido acético no sobrenadante após fermentação pela levedura geneticamente modificada.

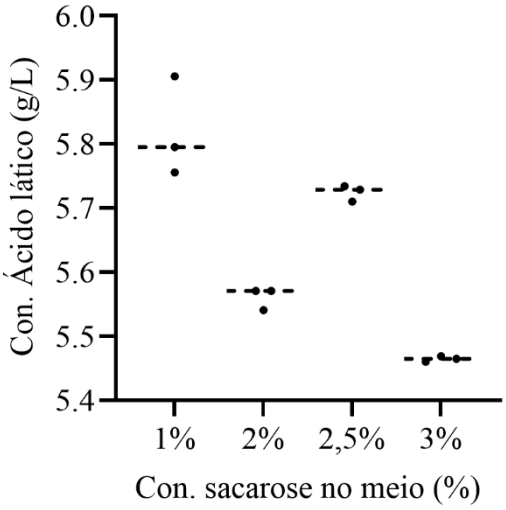


Fonte: Autoria própria

5.1.2. Produção de ácido lático por cepa bacteriana *Lactobacillus delbrueckii* Y15C em frascos Erlenmeyer

Os resultados em frasco Ernlenmeyer apresentam uma uniformidade entre as amostras, mas com testes de correlação apontando diferença positiva entre os valores estatísticos de concentração de ácido lático no momento final da fermentação. Quando comparado com os apuramentos da levedura, a progressão referente a relação de concentração e produção de AL são, em suma, bastante diferentes. Como pode ser visualizado na Figura 7, a concentração 1% sacarose apresentou o valor mais alto entre os resultados, assim como sua média em triplicata, enquanto a concentração esperada por ter o melhor rendimento, a de 2%, apresentou o segundo pior resultado. A concentração mais elevada, de 3%, produziu os menores resultados de AL, isso provavelmente foi motivado pela ausência de um tampão ou controle de pH no bioprocesso, o que reduziu a produção da molécula por redução de metabolismo geral da bactéria.

Figura 7 – Concentração de ácido lático por *Lactobacillus delbrueckii* Y15C nas concentrações de sacarose preconizadas. Controle de temperatura a 35ºC e agitação de 150 rpm.



Fonte: Autoria própria

Com relação a produção de ácido acético, ao contrário da levedura, essa espécie de bactéria (homofermentativa) é amplamente estudada, por isso, a percentagem de ácido acético produzido é mínima, apesar de aparecer em todos os resultados de HPLC, mostra-se irrelevante.

5.2. Identificação de isômero D(-) Ácido Lático produzido por levedura via análise HPLC

Como esperado de testes anteriores, o isômero D (-) foi identificado em uma concentração alta o suficiente para considerar a mistura de ácido lático não racêmica (Tabela 1). O gene inserido na cepa usada foi da bactéria *L. mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*, amplamente descrita como uma espécie que não produz misturas racêmicas de ácido lático.

Tabela 1 – Proporção de isômeros de ácido lático. Determinação por HPLC utilizando coluna quiral

Isômero	**Proporção (%)**
D(-)	94,6 %
L(+)	5,4 %

Fonte: Autoria própria

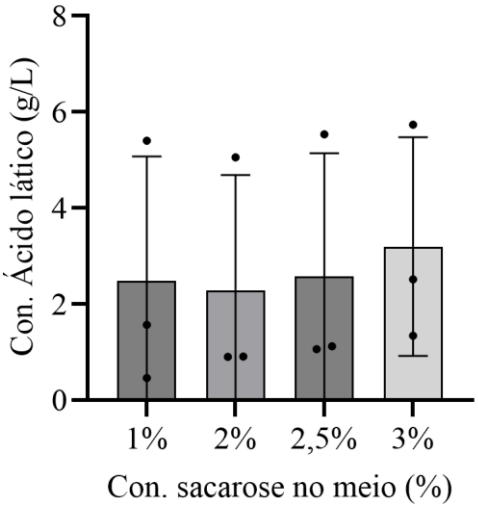
5.3. Bioprocesso em fermentador

As vantagens do biorreator, mesmo com um volume possível em frascos, estão no controle das varáveis de produção durante todo o procedimento de fermentação. Analisar a mudança de produção de ácido lático, a proporção da participação da rota do ácido acético e a concentração de açúcar (sacarose) no momento final das amostras de caldos fermentados em biorreator foi essencial para aproximar de uma realidade industrial, onde tudo deve ser padronizado conforme leis de vigilância e visando o aproveitamento máximo de insumos.

5.3.1. Determinação de ácido lático no fermentado por *S. cerevisiae* geneticamente modificada em biorreator

Visualizando o gráfico de produção de AL na Figura 8, em reator, houve um resultado 13 vezes maior na mostra de valor mais alto quando comparado às amostras provenientes de bioprocesso em frascos Erlenmeyer, com o melhor resultado sendo o da concentração inicial de sacarose 3%, a qual foi detectado 5,7375 g/L do ácido na mistura fermentada. Mesmo assim, os resultados demonstram uma relação parecida entre as concentrações, exceto que em biorreator, a concentração de 1% também demonstrou correlação insignificante, diferente de como aconteceu na análise em frascos. A produção consideravelmente mais elevada de ácido lático pela levedura pode demonstrar a importância do controle das variáveis que o biorreator proporciona, como o pH e a areação do meio durante todo o processo *overnight*.

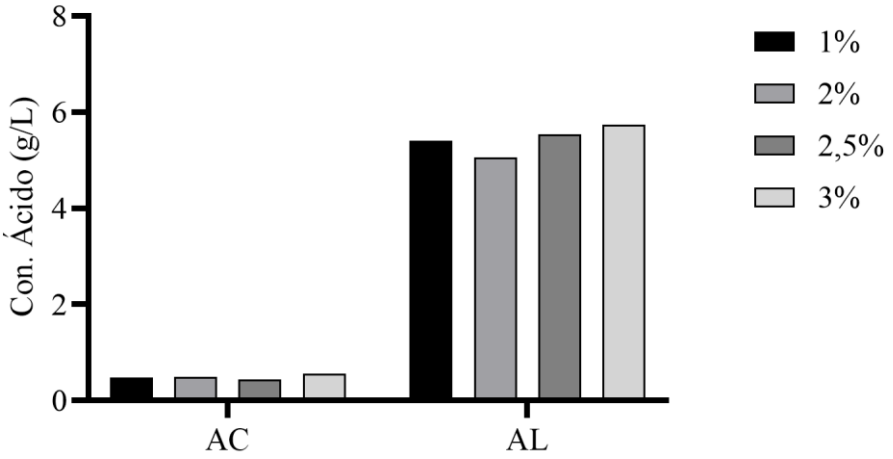
Figura 8 – Produção do ácido com o controle das variáveis em biorreator por levedura geneticamente modificada, sob controle de temperatura de 30ºC, pH 4.5, aeração de 50 ml/min e agitação de 400 rpm.



Fonte: Autoria própria

O ácido acético também se mostrou presente na produção em biorreator (Figura 9), mesmo que em menor quantidade em relação as amostras em frasco. Percebe-se que não houve relação da produção de ácido acético com a concentração inicial de sacarose no meio, mas sim na quantidade de ácido lático gerado, por isso, futuras investigações serão necessárias para conhecer as propriedades e momentos do bioprocesso quando essas rotas entram em prioridade em detrimento a outra.

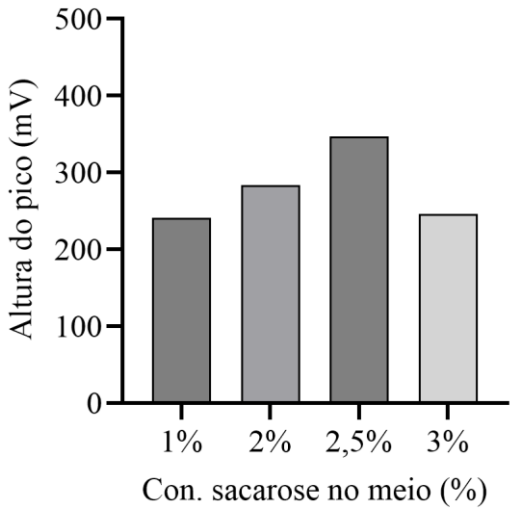
Figura 9 – Comparação da concentração de ácido acético (AC) e ácido lático derivados de fermentação por levedura em biorreator.



Fonte: Autoria própria

Os valores de sacarose restante nas amostras são expressos na Figura 10, onde é possível observar um possível maior rendimento da concentração mais alta entre as analisadas. O resultado é positivo quando comparamos este valor com o resultado mais alto na produção de ácido lático em biorreator, que também pertence a concentração de 3%, como observado na Figura 8.

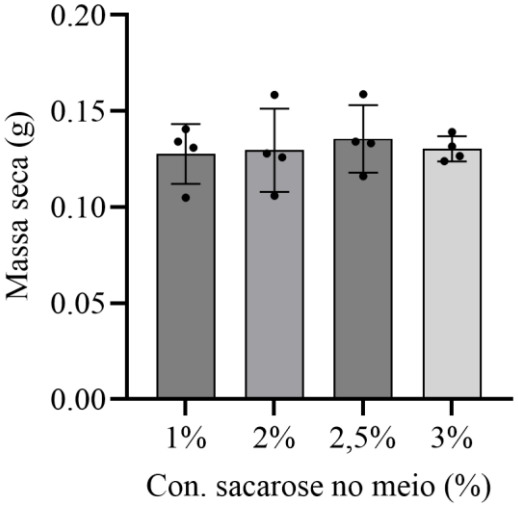
Figura 10 – Sacarose residual no meio fermentado em milivolts identificado por cromatografia líquida de alta precisão em cada uma das concentrações de sacarose inicial.



Fonte: Autoria própria

Por fim, os dados de biomassa seca gerada na fermentação de sacarose por levedura apresentaram uma uniformidade estatística. Ainda assim, houveram resultados de biomassa seca próximos de 0,16 gramas nas concentrações intermediárias (2% e 2,5%), enquanto as demais concentrações mantiveram uma média inferior de 0,14 gramas (Figura 11).

Figura 11 – Massa seca (g) após fermentação em biorreator por levedura geneticamente modificada.

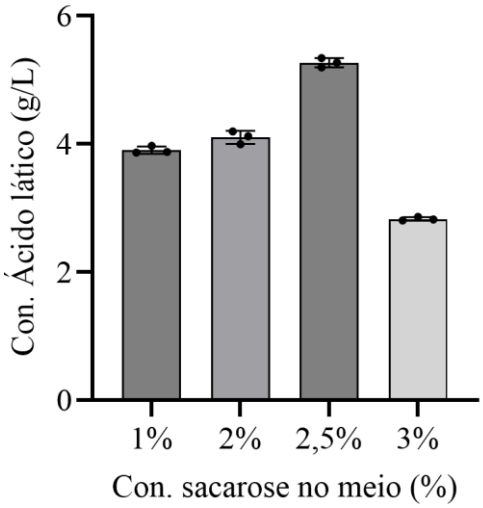


Fonte: Autoria própria

5.3.2. Comparação com cepa bacteriana Y15C de *Lactobacillus delbrueckii* em biorreator

A ausência de ácido acético no fermentado de *Lactobacillus delbruecki* Y15C reforça a característica homofermentativa da bactéria, metabolismo que também ocorre na espécie de onde o gene do aparato lactato-desidrogenase foi retirado e inserido na levedura, porém foi observado o contrário. A possível caraterística heterofermentativa encontrada na fermentação da levedura geneticamente modificada não permitiu uma comparação satisfatória, apesar de ter revelado importantes informações sobre as rotas metabólicas ainda presentes após a engenharia genética aplicada. A concentração de ácido lático identificada no processo de cromatografia líquida foi dentro do esperado para o procedimento em biorreator, com os maiores valores expressos pela concentração 2,5% de sacarose no meio inicial, onde foram medidas concentrações de 5,34 g/L de AL (Figura 12).

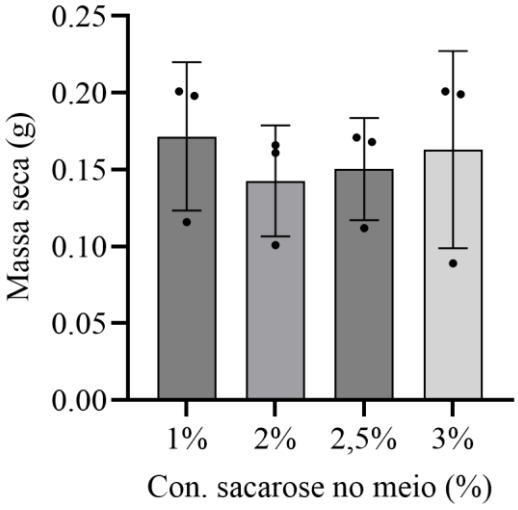
Figura 12 – Produção de ácido lático por *Lactobacillus delbruecki* Y15C em biorreator



Fonte: Autoria própria

O comportamento da bactéria no crescimento da biomassa foi o contrário, tendo as concentrações extremas, de 1% e 3%, com os maiores índices de biomassa seca, tendo médias de 0,127 e 0,130 gramas respectivamente (Figura 13).

Figura 13 – Massa seca em gramas após análise de síntese de ácido lático em biorreator por bactéria da cepa Y15C



Fonte: Autoria própria

6. CONCLUSÃO

A levedura comum por suas aplicações em indústrias de alimentos fermentados como panificação e cerveja já é amplamente pesquisada como uma levedura facilmente editável geneticamente. A modificação para inserir o aparato da enzima D(-) Lactato-desidrogenase por Pedreira (2025) foi bastante eficiente, mostrando resultados interessantes em duas das quatro contrações analisadas neste trabalho de otimização em frascos Erlenmeyer. Já em biorreator, os resultados de concentração e relação por sacarose residual foram maiores ainda, sugerindo a concentração de 30 g/L como a mais viável para estudos de produção de AL com essa cepa. A bactéria Y15C teve resultados bastante dissemelhantes, apontando uma possível característica heterofermentativa na cepa de levedura. Mesmo assim, também foram encontrados aspectos que podem dificultar a produção de ácido lático, como a produção de ácido acético e o baixo aproveitamento da sacarose em determinadas concentrações de sacarose. Esses problemas podem ser resolvidos ou aproveitados em futuras pesquisas com melhoramento genético dessa levedura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A KIMMEL, Stacy; ROBERTS, Robert F. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* RR. **International Journal of Food Microbiology**, [S.L.], v. 40, n. 1-2, p. 87-92, mar. 1998. Elsevier BV.

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**, [*s. l.*], v. 20, 2 set. 2020.

BALASUBRAMANIAN, Vignesh Kumar; MUTHURAMALINGAM, Jothi Basu; CHEN, Yen-Po; CHOU, Jui-Yu. Recent trends in lactic acid-producing microorganisms through microbial fermentation for the synthesis of polylactic acid. **Archives of Microbiology**, [S.L.], v. 206, n. 1, p. 1-19, 21 dez. 2023. Springer Science and Business Media LLC.

BEITEL, Susan Michelz. **Otimização da Produção de D(-) Ácido Lático por *Sporolactobacillus Nakayamae* e *Lactobacillus Delbrueckii* Utilizando Subprodutos Agro-Industriais**. Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero. 2016. Dissertação De Mestrado (Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" Instituto De Biociências, Rio Claro, 2016.

BENNINGA, H.. **A History of Lactic Acid Making**: a chapter in the history of biotechnology. Dordrecht, Holanda: Springer Science & Business Media, 1990. 478 p.

BERNARDO, Marcela Piassi. **Identificação de Bactérias Láticas e Otimização da Produção de Ácido Lático**. Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Obtenção de Grau de Bacharel em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Rio Claro, Rio Claro, 2011.

CAO, Qitao; ZHANG, Wanqin; YIN, Fubin; LIAN, Tianjing; WANG, Shunli; ZHOU, Tanlong; WEI, Xiaoman; ZHANG, Fangyu; CAO, Tiantian; DONG, Hongmin. Lactic acid production with two types of feedstocks from food waste: effect of inoculum, temperature, microoxygen, and initial ph. **Waste Management**, [S.L.], v. 185, p. 25-32, jul. 2024. Elsevier BV.

CHAWONG, K.; RATTANAPHANEE, P. N-Butanol As An Extractant For Lactic Acid Recovery. **World Academy of Science and, Engineering and Technology**, [*s. l.*], v. 56, 24 ago. 2011.

COELHO, Luciana Fontes. **Isolamento e Seleção de Micro-Organismos e Desenvolvimento de Tecnologia para Produção de Ácido Lático.** 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.

COELHO, Luciana Fontes. Lactic acid production from renewable resources. In: COELHO, Luciana Fontes. **Lactic Acid: Production, Properties and Health Effects**. Rio Claro: Nova Science Publishers, 2012. p. 47-64.

COSTA, Vanessa Moreira; BASSO, Thiago Olitta; ANGELONI, Luis Henrique Poleto; OETTERER, Marilia; BASSO, Luiz Carlos. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do ácido lático por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 32, n. 2, p. 503-509, mar./abr., 2008

CHEN, Hao; CHEN, Bo; SU, Zihang; WANG, Kang; WANG, Boxuan; WANG, Yong; SI, Zhihao; WU, Yilu; CAI, Di; QIN, Peiyong. Efficient lactic acid production from cassava bagasse by mixed culture of Bacillus coagulans and lactobacillus rhamnosus using stepwise pH controlled simultaneous saccharification and co-fermentation. **Industrial Crops And Products**, [S.L.], v. 146, p. 112175, abr. 2020. Elsevier BV.

DÍAZ-MONTES, Elsa; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, Jorge; CASTRO-MUÑOZ, Roberto. Characterization of oligodextran produced by Leuconostoc mesenteroides SF3 and its effect on film-forming properties of chitosan. **Materials Today Communications**, [S.L.], v. 28, p. 102487, set. 2021. Elsevier BV.

DING, Shaofeng; TAN, Tianwei. L-lactic acid production by Lactobacillus casei fermentation using different fed-batch feeding strategies. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 41, n. 6, p. 1451-1454, jun. 2006. Elsevier BV.

DONG, Yuhan; LI, Jiangfeng; JIANG, Qiang; HE, Sirong; WANG, Bin; YI, Qiying; CHENG, Xiting; GAO, Xiang; BAI, Yan. Structure, ingredient, and function-based biomimetic scaffolds for accelerated healing of tendon-bone interface. **Journal of Orthopaedic Translation**, [*s. l.*], v. 48, p. 70-88, 2024.

EŞ, Ismail; KHANEGHAH, Amin Mousavi; BARBA, Francisco J.; SARAIVA, Jorge A.; SANT'ANA, Anderson S.; HASHEMI, Seyed Mohammad Bagher. Recent advancements in lactic acid production - a review. **Food Research International**, [S.L.], v. 107, p. 763-770, maio 2018. Elsevier BV.

FREIRE-ALMEIDA, Ederson; MALDONADO-ALVARADO, Pedro. Use of Lactobacillus for Lactic Acid Production from Agro-Industrial By-Products. **Lactobacillus - A Multifunctional Genus**, [S.L.], 26 jul. 2023. IntechOpen.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS (India). Lactic Acid Market Size, Share & Industry Analysis, By Raw Material (Sugarcane, Corn, Yeast Extract, and Others), By Form (Liquid and Dry), By Application (Polylactic Acid, Food & Beverages, Pharmaceutical, Cosmetics & Personal Care, and Others), and Regional Forecast, 2024-2032. *In*: FORTUNE BUSINESS INSIGHTS PVT. LTD. (India). **Specialty & Fine Chemicals**. Maharashtra, India, 10 mar. 2025. Disponível em: https://www.fortunebusinessinsights.com/lactic-acid-market-102119. Acesso em: 26 mar. 2025.

GARCIA, Carlos; PATERNINA, Guillermo Segundo Arrázola; VILLADIEGO, Alba Manuela Durango. Producción de ácido láctico por via biotecnológica. **Temas Agrarios**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 9-26, 30 dez. 2010. Universidad de Cordoba.

GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). **Journal of Polymers and the Environment**, [*s. l.*], v. 9, n. 2, Abril 2001.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G.: **Taxonomic Outline of the Procaryotes.** In:

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Verlag, New York: Springer, 2004.

GHAFFAR, Tayyba; IRSHAD, Muhammad; ANWAR, Zahid; AQIL, Tahir; ZULIFQAR, Zubia; TARIQ, Asma; KAMRAN, Muhammad; EHSAN, Nudrat; MEHMOOD, Sajid. Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 222-229, abr. 2014. Elsevier BV.

HEMME, Denis; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, Catherine. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 467-494, jun. 2004. Elsevier BV.

HETÉNYI, Kata; NÉMETH, Áron; SEVELLA, Béla. Investigation and modeling of lactic acid fermentation on wheat starch via SSF, CHF and SHF technology. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 11, 2011. Periodica Polytechnica Budapest University of Technology and Economics.

HOFVENDAHL, Karin; HAHN–HÄGERDAL, Bärbel. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. **Enzyme And Microbial Technology**, [S.L.], v. 26, n. 2-4, p. 87-107, fev. 2000. Elsevier BV.

HUJANEN, M.; LINKO, S.; LINKO, Y.-Y.; LEISOLA, M. Optimisation of media and cultivation conditions for L (+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 56, n. 1-2, p. 126-130, 1 jul. 2001. Springer Science and Business Media LLC.

IOANNOU, Petros; ZIOGOU, Afroditi; GIANNAKODIMOS, Ilias; GIANNAKODIMOS, Alexios; BALIOU, Stella; SAMONIS, George. Infective Endocarditis by Lactobacillus Species—A Narrative Review. **Antibiotics**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 53, 4 jan. 2024. MDPI AG.

JIANG, Shan; XU, Ping; TAO, Fei. L-Lactic acid production by Bacillus coagulans through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic corncob residue. **Bioresource Technology Reports**, [*s. l.*], v. 6, p. 131-137, Junho 2019.

KELLER, Robert; DUNN, Irving J.. Computer simulation of the biomass production rate of cyclic fed batch continuous culture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S.L.], v. 28, n. 11, p. 784-790, nov. 1978. Wiley.

KOMESU, Andrea; OLIVEIRA, Johnatt Allan Rocha de; MARTINS, Luiza Helena Da Silva; MACIEL, Maria Regina Wolf; MACIEL FILHO, Rubens. Lactic acid production to purification: a review. **Bioresources**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 4364-4383, 6 fev. 2017. BioResources.

KORZ, D.J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E.A.; DECKWER, W.D.. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli. **Journal of Biotechnology**, [S.L.], v. 39, n. 1, p. 59-65, fev. 1995. Elsevier BV.

MACEDO, João Victor Carpinelli; RANKE, Fabiane Fernanda de Barros; ESCARAMBONI, Bruna; CAMPIONI, Tania Sila; NĐÑEZ, Eutimio Gustavo Fernández; OLIVA NETO, Pedro de. Cost-effective lactic acid production by fermentation of agro-industrial residues. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 27, p. 101706, ago. 2020. Elsevier BV.

MAN, J. C. De; ROGOSA, M.; SHARPE, M. Elisabeth. A Medium For The Cultivation Of Lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 130-135, abr. 1960. Wiley.

MARCO, M. L.; HEENEY, D.; BINDA, S.; CIFELLI, C. J.; COTTER, P. D.; FOLIGNÉ, B.; HUTKINS, R. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94–102, 2017.

MARTINEZ, Fabio Andres Castillo; BALCIUNAS, Eduardo Marcos; SALGADO, José Manuel; GONZÁLEZ, José Manuel Domínguez; CONVERTI, Attilio; OLIVEIRA, Ricardo Pinheiro de Souza. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, [*s. l.*], v. 30, p. 70-83, 2013.

MIMITSUKA, TakashI; SAWAI, Kenji; KOBAYASHI, Koji; TSUKADA, Takeshi; TAKEUCHI, Norihiro; YAMADA, Katsushige; OGINO, Hiroyasu; YONEHARA, Tetsu. Production of d-lactic acid in a continuous membrane integrated fermentation reactor by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*: enhancement in d-lactic acid carbon yield. **Journal of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 119, n. 1, p. 65-71, jan. 2015. Elsevier BV. http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.002.

ORLA-JENSEN, Sigurd. **The Lactic Acid Bacteria**. Universidade da Califórnia, Berkeley: A.F. Host, 1919. 118 p.

OU, Mark S; INGRAM, Lonnie O.; SHANMUGAM, K. T. L(+)- Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 38, ed. 5, p. 599–605, 1 maio 2011.

PAL, P.; DEY, P. Developing a sustainable technology for clean production of lactic acid. In: **International Conference On Chemical, Ecology And Environmental Sciences (Icees)**, Bangkok, mar. 2012. Proceedings [...]. [S.l.]: ICEES, 2012.

PEDREIRA, Dandara Porto. Abordagens de Engenharia Metabólica e Evolutiva para Produção De D-Ácido Láctico em *Saccharomyces cerevisiae*. 2025. 84 p. Tese de Doutorado (Doutor em Ciências, área de Bioenergia) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2025.

RAMAN, Jegadeesh; KIM, JEONG-Seon; CHOI, Kyeong Rok; EUN, Hyunmin; YANG, Dongsoo; KO, Young-Joon; KIM, Soo-Jin. Application of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Sustainable Agriculture: Advantages and Limitations. **Int. J. Mol.,** [*s. l.*], v. 23, ed. 7784, 14 jul. 2022.

SANTOS, Larissa Provasi. **Utilização de Xilose para a Produção De Ácido Lático por Isolados De *Weizmannia sp.* e Abordagem da Evolução Adaptativa Laboratorial**. Orientador: Prof. Dr. Jonas Contiero. 2023. Tese de Mestrado (Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular E Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" Instituto De Biociências, Rio Claro, 2023.

WEE, Young-Jung; KIM, Jin-Nam; RYU, Hwa-Won. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. ***Food Technol. Biotechnol***, [*s. l.*], v. 44, ed. 2, p. 163–172, 12 mar. 2006.

YAN, Jinyong; HAN, Bingnan; GUI, Xiaohua; WANG, Guilong; XU, Li; YAN, Yunjun; MADZAK, Catherine; PAN, Dujie; WANG, Yaofeng; ZHA, Genhan. Engineering Yarrowia lipolytica to Simultaneously Produce Lipase and Single Cell Protein from Agro-industrial Wastes for Feed. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 0-0, 15 jan. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

ZHANG, Yang; MA, Li; YANG, Jichu. Kinetics of esterification of lactic acid with ethanol catalyzed by cation-exchange resins. **Reactive and Functional Polymers**, [S.L.], v. 61, n. 1, p. 101-114, ago. 2004. Elsevier BV.