

# PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO POR *Lactobacillus delbrueckii* EM HIDROLISADO CELULÓSICO DE BAGAÇO DE MALTE: EFEITO DO NÍVEL DE INÓCULO

Marcela Fernandes, Solange I. Mussatto\*, Ismael M. Mancilha, Inês C. Roberto

Escola de Engenharia de Lorena/Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo.  
Estrada Municipal do Campinho, s/nº, CEP: 12602-810. Lorena/SP. \*E-mail: solange@debiq.eel.usp.br

**Resumo-** O hidrolisado celulósico de bagaço de malte (50 g/l glicose) foi utilizado como meio de fermentação para a produção de ácido láctico pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii*. Diferentes níveis de inóculo (0,5, 0,75 e 1,0 g/l) foram utilizados nestas fermentações visando estabelecer o mais adequado para este processo de bioconversão. O valor máximo de fator de conversão de glicose em ácido láctico ( $Y_{P/S}=0,73$  g/g) foi obtido quando se utilizou 1,0 g/l de células no início da fermentação. Por outro lado, quando o nível de inóculo foi dobrado, o valor de  $Y_{P/X}$  (fator de rendimento de ácido láctico por célula) foi reduzido pela metade, sugerindo que quanto maior a quantidade de células no início da fermentação, menor a capacidade do microrganismo em converter glicose a ácido láctico. Porém, o aumento da carga do inóculo de 0,5 para 1,0 g/l foi capaz de mascarar esta menor capacidade de bioconversão da célula, uma vez que o valor de  $Y_{P/S}$  foi aumentado em 20%. Conclui-se então que o nível de inóculo é uma variável de grande influência na produção de ácido láctico em hidrolisado celulósico de bagaço de malte. O uso de um inóculo com 1 g/l de células foi capaz de proporcionar bons resultados de fermentação (73% de eficiência).

**Palavras-chave:** bagaço de malte, glicose, ácido láctico, fermentação, *Lactobacillus delbrueckii*

**Área do Conhecimento:** II- Ciências Biológicas

## Introdução

O ácido láctico (ácido 2-hidróxi-propanóico) é o mais importante ácido orgânico existente, com numerosas aplicações industriais como regulador de pH, conservante, agente tamponante ou solvente, nas áreas química, farmacêutica, de alimentos, couros e tecidos (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Recentemente, este composto também tem recebido grande atenção como matéria-prima para a produção de plásticos biodegradáveis (JIN et al., 2003). Por esta razão, o mercado de ácido láctico que já corresponde a mais de 100.000 toneladas/ano está previsto em aumentar ainda cerca de 15% com a possibilidade de produção de plásticos biodegradáveis (IDRIS; SUZANA, 2006). Todo este aumento na demanda de produção gera um grande interesse em encontrar métodos alternativos para produzir este ácido com o menor custo possível.

A produção de ácido láctico pode ser feita por processo químico ou biotecnológico. O processo biotecnológico, baseado na bioconversão de uma solução de açúcares (glicose, frutose, sacarose ou lactose) por bactérias (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000) apresenta várias vantagens quando comparado à síntese química, tais como baixo custo do substrato, uso de temperaturas mais brandas e menor consumo de energia (JOHN et al., 2007). Porém, de acordo com John et al., (2006) um dos principais problemas relacionados com a produção biotecnológica de ácido láctico em larga escala, é o custo da matéria-prima utilizada. Vários substratos podem ser utilizados

como fonte de carbono neste processo, os quais incluem glicose, sacarose, lactose, maltose, manose, xilose e galactose. No entanto, o uso de resíduos agro-industriais em substituição a estas fontes de carbono pode ser uma alternativa interessante, devido a grande disponibilidade e aos baixos custos com que eles podem ser obtidos (JOHN et al., 2006; TANAKA et al., 2006).

Por ser realizada por microrganismos, a produção biotecnológica de ácido láctico é um processo que pode ser afetado pelas condições experimentais utilizadas, tais como pH, agitação, temperatura, carga e idade do inóculo, aeração, fonte de carbono, concentração inicial de açúcar, composição do meio de fermentação e forma de condução do processo (contínuo ou descontínuo) (HOFVENDAHL; HAHN-HÄGERDAL, 2000; BAI et al., 2003). Conhecer o efeito destas variáveis e estabelecer as melhores condições de processo é de grande importância para se obter elevados rendimentos e produtividades.

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer o nível de inóculo mais adequado para a produção de ácido láctico pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii* utilizando o hidrolisado celulósico de bagaço de malte (subproduto agro-industrial proveniente do processo cervejeiro) como meio de fermentação.

## Materiais e Métodos

O hidrolisado celulósico foi obtido por hidrólise enzimática da polpa de celulose (Tabela 1) produzida a partir do pré-tratamento do bagaço de

malte com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e posteriormente com NaOH diluído. As condições de hidrólise utilizadas em cada uma destas etapas foram: 1. hidrólise ácida: relação sólido:líquido de 1:8 g:g, solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,25% p/v, 120°C, 17 min; 2. hidrólise alcalina: relação sólido:líquido de 1:20 g:g, solução de NaOH 2% p/v, 120°C, 90 min; 3. hidrólise enzimática: concentração de substrato de 8% p/v, 45 FPU/g, 100 rpm, 45°C, 96 h. A atividade celulolítica total do extrato enzimático (Celluclast 1.5L, Novozymes) utilizado nos experimentos de hidrólise enzimática, era de 98 FPU/ml.

Tabela 1- Composição química da polpa celulósica de bagaço de malte utilizada no processo de hidrólise enzimática.

Componente	Composição (g/100 g)
Celulose	90,4
Hemicelulose	1,1
Lignina	8,2
Outros <sup>a</sup>	0,3

<sup>a</sup>outros componentes incluem cinzas (minerais), proteínas e extrativos

A bactéria *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 utilizada nos experimentos, foi proveniente da coleção de culturas da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa/MG). A espécie foi mantida em tubos de ensaio contendo meio MRS ágar com a seguinte composição (g/l): glicose (20), peptona (10), extrato de levedura (4), extrato de carne (8), citrato triamoniaco (2), acetato de sódio.3H<sub>2</sub>O (5), fosfato dipotássico (2), sulfato de magnésio.7H<sub>2</sub>O (0,2), sulfato de manganês.4H<sub>2</sub>O (0,05), ágar (14) e 1 ml de Tween 80. A cultura foi conservada em geladeira a 4°C.

O inóculo foi preparado em meio MRS caldo, cuja composição é a mesma do MRS ágar ausente apenas em ágar. Para o preparo do inóculo, duas alçadas de células mantidas em meio MRS ágar foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 10 ml do meio MRS caldo. O tubo foi fechado com rolha e papel filme e foi mantido em estufa a 37°C, sem agitação, por 24h. Após este tempo, 1 ml do inóculo foi transferido para um novo tubo de ensaio contendo 10 ml do meio MRS caldo, sendo mantido novamente em estufa a 37°C, sem agitação, por mais 24 h. As células foram então separadas por centrifugação (1100×g, 15 min) e ressuspensas em água destilada esterilizada de forma a se obter uma suspensão com concentração celular de aproximadamente 5 g/l. A partir desta suspensão, diferentes volumes foram adicionados aos meios de fermentação para se obter concentrações iniciais de células de 0,5, 0,75 e 1,0 g/l no início da fermentação.

O meio de fermentação foi constituído pelo hidrolisado celulósico de bagaço de malte (50 g/l de glicose) com o pH original (4,72) ajustado para

6,0 pela adição de NaOH 5N. Um volume de 10 ml do hidrolisado foi adicionado em cada tubo de ensaio de 25 ml, os quais foram então fechados e autoclavados a 0,5 atm durante 15 min. As fermentações foram conduzidas a 37°C, sem agitação, durante 48 h, sendo acompanhadas por retiradas de amostras para determinação da concentração celular, pH, consumo de glicose e produção de ácido láctico. As concentrações de glicose e ácido láctico foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e o crescimento celular foi acompanhado por medida da densidade ótica (620nm) em espectrofotômetro.

O fator de conversão em ácido láctico ( $Y_{P/S}$ , g/g) foi calculado pela relação entre a concentração de ácido láctico formado (g/l) e a concentração de glicose consumida (g/l). A produtividade volumétrica em ácido láctico ( $Q_P$ , g/l.h) foi calculada pela relação entre a concentração de ácido láctico formado (g/l) e o tempo de fermentação (h). O fator de rendimento de ácido láctico por célula ( $Y_{P/X}$ , g/g) foi determinado pela relação entre a concentração de ácido láctico formado (g/l) e a concentração de células presentes no meio de fermentação (g/l).

## Resultados

Em todos os ensaios realizados foi observado que, após 48 h de fermentação, o pH inicial dos meios havia sido reduzido de 5,95 (pH inicial) para cerca de 4,5, devido a formação e liberação de ácido láctico no meio reacional. Porém, o consumo de glicose e a produção de ácido láctico variaram para cada nível de inóculo utilizado. A eficiência destas fermentações foi avaliada através dos valores dos parâmetros: fator de conversão de glicose em ácido láctico ( $Y_{P/S}$ ), produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) e fator de rendimento de ácido láctico por célula ( $Y_{P/X}$ ). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1.

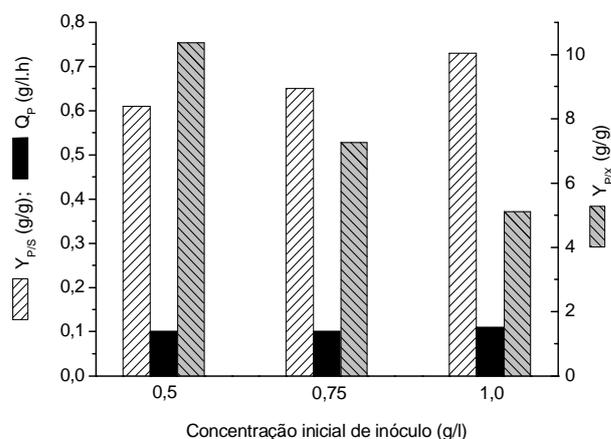


Figura 1- Efeito da concentração inicial de inóculo nos parâmetros fermentativos da produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* a partir do hidrolisado celulósico de bagaço de malte.

Nota-se na Figura 1 que os valores de  $Y_{P/S}$  aumentaram com o aumento do nível de inóculo de 0,5 para 1,0 g/l, atingindo o valor máximo de 0,73 g/g (73% de eficiência) quando se utilizou 1,0 g/l de células no início da fermentação. Por outro lado, quando o nível de inóculo foi dobrado, os valores de  $Y_{P/X}$  foram reduzidos pela metade. Em relação à produtividade volumétrica em ácido láctico ( $Q_P$ ) observa-se na Figura 1 que o valor deste parâmetro foi idêntico em todos os experimentos. Isto significa que em um tempo de fermentação de 48 h as células produziram a mesma quantidade de ácido láctico em todos os meios avaliados.

## Discussão

Observou-se no presente trabalho que os valores de  $Y_{P/S}$  aumentaram com o aumento do nível de inóculo de 0,5 para 1,0 g/l, enquanto que os valores de  $Y_{P/X}$  foram reduzidos pela metade, sugerindo que o aumento da quantidade de células no início da fermentação exerceu um efeito negativo sobre a capacidade do microrganismo em converter glicose a ácido láctico. Tal efeito pode estar relacionado com a presença de nutrientes no meio de fermentação. O hidrolisado celulósico de bagaço de malte foi utilizado como meio de fermentação na forma em que foi produzido, isto é, sem suplementação adicional de nutrientes. Como a polpa de celulose que foi hidrolisada enzimaticamente continha uma pequena fração (0,3% p/p) composta por proteínas e minerais (Tabela 1), é possível que parte destas substâncias tenham sido solubilizadas durante o processo de hidrólise enzimática, proporcionando desta forma alguma fonte nutricional para o desenvolvimento do microrganismo. No entanto, esta quantidade de nutrientes solubilizada pode não ter sido suficiente para os microrganismos quando o nível de inóculo foi aumentado. Isto teria afetado o desempenho das células em converter glicose a ácido láctico, justificando a queda observada nos valores de  $Y_{P/X}$ .

Por outro lado, quanto maior o nível de inóculo, maior a quantidade de células disponíveis para realizar este processo de bioconversão. Por esta razão, o aumento da carga do inóculo de 0,5 para 1,0 g/l foi capaz de mascarar esta menor capacidade da célula em converter glicose a ácido láctico, uma vez que o fator de rendimento do processo ( $Y_{P/S}$ ) foi aumentado em 20%. Conclui-se com estes resultados que, quando se utilizou um inóculo com 1 g/l de células, o fator de rendimento em ácido láctico por substrato consumido foi maior do que nos outros experimentos devido ao maior número de células presentes no meio de fermentação. Durante a produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* a partir de resíduo de abacaxi, Idris e Suzana (2006) também verificaram

uma relação entre a concentração de células e a produção de ácido láctico, de forma que a produção deste ácido foi favorecida quando a concentração celular utilizada foi aumentada. O aumento do nível de inóculo de 104 para 106 esporos/ml também favoreceu a produção de ácido láctico por uma espécie mutante do fungo *Rhizopus* (MIURA et al., 2003).

Os valores de produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) foram idênticos para todos os experimentos. Comportamento similar foi observado por Gomez e Goma (1986) durante a fermentação para produção de ácido láctico a partir de glicose empregando diferentes níveis de inóculo (0,4, 2,5 e 3,6 g/l). De acordo com estes autores, um tempo de fermentação de 50 h foi suficiente para que todos os meios de fermentação atingissem a mesma concentração final de ácido láctico, devido à queda do pH do meio de fermentação. Durante a fermentação para produção de ácido láctico, na medida em que o ácido láctico é formado e excretado para fora da célula, o pH do meio de fermentação diminui causando uma inibição no crescimento do microrganismo, reduzindo então o rendimento de formação de produto (SILVA; MANCILHA, 1991). Logo, no presente trabalho, um tempo de 48 h foi longo o suficiente para permitir que as células produzissem, em todos os meios de fermentação, a mesma quantidade de ácido láctico capaz de proporcionar a queda do pH até este valor limite onde o metabolismo do microrganismo foi afetado. Por este motivo, todas as fermentações apresentaram valores similares de pH final e de produtividade volumétrica. De acordo com Hofvendahl e Hahn-Hägerdal (2000), o pH ótimo para produção de ácido láctico varia entre 5,0 e 7,0. Valores abaixo deste limite afetam negativamente o desempenho do microrganismo, determinando o final da fermentação.

## Conclusão

Conclui-se que o nível de inóculo é uma variável de grande influência na produção de ácido láctico pela bactéria *Lactobacillus delbrueckii* em hidrolisado celulósico de bagaço de malte. Quanto maior o nível de inóculo, maior a quantidade de células disponíveis para realizar a bioconversão e melhor foi o resultado de  $Y_{P/S}$  obtido (0,73 g/g, 73% de eficiência). Este resultado provavelmente pode ser melhorado se o meio de fermentação for suplementado com nutrientes, uma vez que as bactérias ácido lácticas são microrganismos de elevada exigência nutricional. Este tema será assunto de nossos trabalhos futuros.

## Agradecimentos

CNPq, CAPES, FAPESP e NOVOZYMES.

## Referências

- BAI, D-M.; JIA, M-Z.; ZHAO, X-M.; BAN, R.; SHEN, F.; LI, X-G.; XU, S-M. L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. **Chem. Eng. Sci.**, v.58, p.785–791, 2003.
- GOMEZ, J.; GOMA, G. Effect of different inoculum levels of heterogeneous mixed culture in acidogenic fermentation. **Biotechnol. Lett.**, v.8, p.833–836, 1986.
- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme Microb. Techn.**, v.26, p.87–107, 2000.
- IDRIS, A.; SUZANA, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochem.**, v.41, p.1117–1123, 2006.
- JIN, B.; HUANG, L.P.; LANT, P. *Rhizopus arrhizus* – a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid. **Biotechnol. Lett.**, v.2, p.1983–1987, 2003.
- JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY A. Fermentative production of lactic acid from biomass: An overview on process developments and future perspectives. **Appl. Microbiol. Biot.**, v.74, p.524–534, 2007.
- JOHN, R.P.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochem.**, v.41, p.759–763, 2006.
- MIURA, S.; ARIMURA, T.; HOSHINO, M.; KOJIMA, M.; DWIARTI, L.; OKABE, M. Optimization and scale-up of L-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors. **J. Biosci. Bioeng.**, v.96, p.65–69, 2003.
- SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Aproveitamento de resíduos agro-industriais: Ácido láctico, uma alternativa. **Bol. SBCTA**, v.25, p.37–40, 1991.
- TANAKA, T.; HOSHINA, M.; TANABE, S.; SAKAI, K.; OHTSUBO, S.; TANIGUCHI, M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresour. Technol.**, v.97, p.211–217, 2006.