



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIEL BARBOZA DA SILVA

**Aspectos fisiológicos e metabólicos de *Lactocaseibacillus*
ramnosus ATCC 7469 durante a produção de ácido láctico em
diferentes meios formulados**

Recife
2024

GABRIEL BARBOZA DA SILVA

Aspectos fisiológicos e metabólicos de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 durante a produção de ácido lático em diferentes meios formulados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia, bioprocessos e bioprodutos.

Orientador (a): Profa. Dr^a Ester Ribeiro de Andrade

Coorientador (a): Dr. Gilberto Henrique Teles Gomes da Silva

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Gabriel Barboza da.

Aspectos fisiológicos e metabólicos de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 durante a produção de ácido lático em diferentes meios formulados / Gabriel Barboza da Silva. - Recife, 2024.

73f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Orientação: Ester Ribeiro de Andrade.

Coorientação: Gilberto Henrique Teles Gomes da Silva.

Inclui referências.

1. Ácido Orgânico; 2. Fermentação; 3. Lactobacillaceae; 4. Meios Formulados; 5. Razão carbono/nitrogênio. I. Andrade, Ester Ribeiro de. II. Silva, Gilberto Henrique Teles Gomes da. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

GABRIEL BARBOZA DA SILVA

Aspectos fisiológicos e metabólicos de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 durante a produção de ácido lático em diferentes meios formulados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

COMISSÃO ORGANIZADORA

Profa. Dra. Ester Ribeiro de Andrade (Presidente)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Glaucia Manoella de Souza Lima (Titular Interno)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler (Titular Externo)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Recife

2024

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação representa o fechamento de um ciclo e início de outro ainda mais importante da minha vida, e essa trajetória não teria sido possível sem o apoio e colaboração de muitas pessoas. A elaboração deste trabalho foi um percurso repleto de desafios e aprendizados, e, assim, é com grande gratidão que dedico um momento para reconhecer as contribuições fundamentais que tornaram este trabalho possível.

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força e pela fé que me sustentaram ao longo de todo o caminho. Pelos livramentos, pela sua misericórdia e amor incondicional.

Aos meus pais, Sandra Maria e Humberto Barboza, pela paciência, amor incondicional e por acreditarem em mim desde o início. Vocês são a minha maior fonte de inspiração, e sem o apoio de vocês, eu não teria alcançado este objetivo.

Aos meus irmãos, Gabriela Barboza, Rafael Barboza e Rafaela Barboza, dedico um agradecimento especial, que sempre acreditou em mim e me ofereceu apoio incondicional. Seu amor e compreensão foram pilares fundamentais que sustentaram minha jornada acadêmica.

Agradeço à minha orientadora e Coorientador, Profa. Dr^a Ester Ribeiro e Dr. Gilberto Henrique Teles, cuja orientação, paciência e expertise foram indispensáveis ao longo de todo o processo. Suas críticas construtivas, conselhos e sugestões precisas não apenas enriqueceram minha pesquisa, mas também aprimoraram minha formação acadêmica e pessoal.

Aos meus amigos, agradeço pelo apoio, pelas discussões construtivas e pela amizade ao longo dessa jornada. Em especial, agradeço a Rui Neto, Eliana Santos, Thiago Ramos, Nathali Gregório, Mislane Cruz, Erick Jonne, Pérsio Alexandre, Nínive Florêncio, Julia Santos, Rhabersh Rodrigues, Gabriel Santos e tantos outros que estiveram sempre dispostos a ajudar e compartilhar seus conhecimentos. O

companheirismo, as “FOFOCAS” e o espírito colaborativo que vivenciamos juntos foram essenciais para a concretização desse projeto.

Agradeço também aos membros da banca examinadora, Profa. Dr^a Glaucia Manoella, Profa. Dr^a Christine Lamenha, Prof. Dr. Fabrício Motteran e a Profa. Dr^a Eloyza Rozendo, que aceitaram o convite e dedicaram seu tempo e atenção para avaliar meu trabalho. Suas considerações e críticas construtivas foram valiosas e contribuíram para o aprimoramento deste estudo.

Agradeço também aos meus professores do mestrado, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e profissional durante o mestrado.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) pelo apoio financeiro, que tornou essa pesquisa possível.

Este trabalho é um reflexo do esforço coletivo, e sou eternamente grato a todos que contribuíram de alguma forma para que eu alcançasse este importante marco em minha vida.

A todos vocês, o meu mais sincero agradecimento.

A ciência não é apenas uma disciplina, é uma maneira de pensar

Carl Sagan

RESUMO

O ácido láctico, ácido orgânico mais abundante na natureza, é produzido por fermentação bacteriana, representando mais de 90% da produção global. Entre as espécies utilizadas na produção deste ácido, *Lactocaseibacillus rhamnosus* destaca-se pela alta eficiência na produção do composto. Estudos sobre o metabolismo e fisiologia dessa bactéria ainda são pouco explorados, havendo uma escassez de estudos sobre o tema. Assim, o objetivo principal do estudo foi avaliar os aspectos fisiológicos e metabólicos de *L. rhamnosus* ATCC 7469 na produção de ácido láctico em oito meios de cultura, com ou sem adição de acetato e variação na razão Carbono/Nitrogênio. Para isso, dos oitos ensaios, um foi realizado com MRS comercial (E1) e sete com meios formulados com diferentes concentrações de carbono e nitrogênio. Os ensaios foram realizados partindo-se de inóculo de velocidade específica máxima de crescimento conhecida. Foram determinadas as concentrações de biomassa, de glicose, de ácido láctico, de acetato e o pH, durante os estudos cinéticos. Os rendimentos em biomassa ($Y_{X/S}$) e em ácido láctico ($Y_{P/S}$), assim como as produtividades volumétricas máximas da biomassa (Q_X) e do produto (Q_P) foram calculados, em todos os ensaios. De modo geral, a ausência de acetato em alguns ensaios (E3, E5 e E7) influenciou negativamente, reduzindo as concentrações de biomassa e de ácido láctico, bem como reduziu o consumo e assimilação da glicose por *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante a fermentação. A máxima concentração de biomassa foi atingida em 24h em todos os ensaios, exceto para o ensaio E3, com as maiores concentrações obtidas para os meios formulados com acetato (E2, E4, E6 e E8). Nesses meios também foram obtidos os maiores consumos de glicose (> 60%) e maiores concentrações de ácido láctico (> 20 g/L). A adição de uma maior concentração de glicose mais o acetato (E6) permitiu que *L. rhamnosus* mantivesse seu crescimento durante 48h de fermentação e alcançasse a máxima concentração de ácido láctico (27 g/L) entre os ensaios estudados. A associação de maiores concentrações das fontes de carbono (C) (40 g/L) e de nitrogênio (N) (44 g/L) nos ensaios E7 e E8 foi benéfica para a produção de biomassa e consumo de glicose, mas não para a produção de ácido láctico. Nestes ensaios, a glicose consumida foi direcionada para a síntese de células, diferente de E5 e E6 (40 g/L e 22 g/L para C e N, respectivamente), que equilibraram a rota metabólica da glicose para produção de biomassa e de ácido láctico. Os parâmetros cinéticos da fermentação também foram influenciados pela ausência de acetato e pela razão C/N nos meios. Os ensaios com acetato apresentaram um maior rendimento de produto e biomassa, independentemente da razão de C/N. A adição de uma maior concentração de carbono (E5 e E6) permitiu maior produtividade volumétrica de ácido láctico (Q_P), enquanto o aumento simultâneo de carbono e nitrogênio (E7 e E8) aumentou a produtividade de biomassa (Q_X). De modo geral, a presença de acetato e o aumento da concentração de carbono foram benéficos para os aspectos fisiológicos e metabólicos de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante a fermentação dos meios formulados, em específico ensaio E6, cujos parâmetros são ideais para o crescimento e produção de ácido láctico pela bactéria.

Palavras-chave: Ácido Orgânico. Fermentação. *Lactobacillaceae*. Meios Formulados. Razão carbono/nitrogênio.

ABSTRACT

Lactic acid, the most abundant organic acid in nature, is mainly produced by bacterial fermentation, accounting for more than 90% of global production. Among the species used in the production of this acid, *Lactocaseibacillus rhamnosus* stands out for its high efficiency in the production of the compound. Studies on the metabolism and physiology of this bacterium are still little explored, and there is a scarcity of studies on the subject. Thus, the main objective of the study was to evaluate the physiological aspects of *L. rhamnosus* ATCC 7469 in the production of lactic acid in eight culture media, with or without the addition of acetate and variation in the Carbon/Nitrogen ratio. For this, of the eight trials, one was carried out with commercial MRS (E1) and seven with media formulated with different concentrations of carbon and nitrogen. The assays were carried out starting from inoculum with the maximum known specific growth rate. The concentrations of biomass, glucose, lactic acid, acetate and pH were determined during the kinetic studies. The yields in biomass ($Y_{X/S}$) and lactic acid ($Y_{P/S}$), as well as the maximum volumetric productivity of biomass (Q_X) and product (Q_P) were calculated in all trials. In general, the absence of acetate in some assays (E3, E5 and E7) had a negative influence, reducing the concentrations of biomass and lactic acid, as well as reducing the consumption and assimilation of glucose by *L. rhamnosus* ATCC 7469 during fermentation. The maximum concentration of biomass was reached in 24 hours in all assays, with the highest concentrations obtained for the media formulated with acetate (E2, E4, E6 and E8). In these media, the highest glucose intakes (> 60%) and the highest concentrations of lactic acid (> 20 g/L) were also obtained. The addition of a higher concentration of glucose plus acetate (E6), allowed *L. rhamnosus* to maintain its growth during 48 hours of fermentation and reach the maximum concentration of lactic acid (27 g/L). The association of higher concentrations of carbon (C) (40g/L) and nitrogen (N) (44 g/L) sources in the E7 and E8 assays was beneficial for biomass production and glucose consumption, but not for lactic acid production. In these assays, the glucose consumed was directed to cell synthesis, unlike E5 and E6 (40 g/L and 22 g/L for C and N, respectively), which balanced the metabolic pathway of glucose for biomass and lactic acid production. The kinetic parameters of fermentation were also influenced by the absence of acetate and the C/N ratio in the media. The acetate assays showed a higher yield of product and biomass, regardless of the C/N ratio. The addition of a higher carbon concentration (E5 and E6) allowed higher lactic acid (Q_P) yield, while the simultaneous increase of carbon and nitrogen (E7 and E8) increased biomass yield (Q_X). In general, the presence of acetate and the increase in carbon concentration were beneficial for the physiological and metabolic aspects of *L. rhamnosus* ATCC during the fermentation of the formulated media, in specific E6 assay, whose parameters are ideal for the growth and production of lactic acid by the bacterium.

Keywords: Organic Acid. Fermentation. *Lactobacillaceae*. Formulated medium. Carbon/nitrogen ratio.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias metabólicas de produção de ácido láctico a partir da glicose.	21
Figura 2	Estrutura molecular do Ácido Láctico nas suas formas L (+) e D (-).	26
Figura 3	Esquema de estudo cinético do crescimento de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 durante o desenvolvimento do inóculo em meio MRS Comercial.	30
Figura 4	Esquema do processo de fermentação dos meios de produção.	33
Figura 5	Estudo cinético do crescimento de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 durante o desenvolvimento do inóculo (a) e Curva de crescimento microbiano: Ln (Absorbância) em função do tempo (b).	37
Figura 6	Análise fisiológica de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 durante as fermentações nos ensaios E1 (MRS comercial), E2 (MRS formulado), E3 (MRS formulado sem acetato) e E4 (MRS formulado com acetato).	39
Figura 7	Análise fisiológica de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 durante as fermentações nos ensaios E5 (Meio MRS formulado sem acetato e C/N de 6,67 g/g), E6 (Meio MRS formulado com acetato e C/N de 6,67 g/g), E7 (Meio MRS formulado sem acetato e C/N de 3,33 g/g) e E8 (Meio MRS formulado com acetato e C/N de 3,33 g/g).	42
Figura 8	Análise estatística das concentrações de ácido láctico (g/L) nos oitos ensaios (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8) usados na fermentação com <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469, determinada pelo teste Tukey com nível de significância de 95%.	

Figura 9 Parâmetros cinéticos ($\mu_{\max}$, $Y_{X/S}$, Q_X , $Y_{P/S}$ e Q_P) dos ensaios com 49
Lacticaseibacillus rhamnosus ATCC 7469.

Figura 10 Análise de clusterização de dados multivariados através de 52
mapa de calor de oito ensaios de cultivos da bactéria
Lacticaseibacillus rhamnosus ATCC 7469. Ensaio de cultivo
são mostrados na legenda da figura. Ausência de acetato inicial
(não), presença de acetato inicial (sim). Inóculo proveniente do
meio comercial (C), inóculo proveniente do meio formulado (F).
Parâmetros fisiológicos relacionados ao metabolismo de
captação, assimilação e fermentação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Razão C/N, tipo do inóculo e composição química dos meios de cultivos utilizados na fermentação por <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.	31
-----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu_{\max}$ – Velocidade específica máxima de crescimento

ABS – Absorbância

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosina Trifosfato

BAL – Bactérias Ácido Láticas

C/N – Relação carbono/nitrogênio

EMP – Embden-Meyerhof-Parnas

g/L – Gramas por Litro

$\ln$ – Logaritmo Neperiano

mM – Milimolar

MRS – Meio de cultura de Man, Rogosa e Sharpe

MRS_C – Meio MRS comercial

MRS_F – Meio MRS formulado

NAD(P)⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

PLA – Ácido Polilático

Q_P – Produtividade volumétrica máxima do produto

Q_X – Produtividade volumétrica máxima de biomassa

$Y_{P/S}$ – Rendimento do produto em relação ao substrato

$Y_{X/S}$ – Rendimento de biomassa em relação ao substrato

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1.	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E O GÊNERO <i>Lacticaseibacillus</i>	16
2.2.	CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DE <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ...	18
2.3.	METABOLISMO FERMENTATIVO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE <i>Lactobacillaceae</i>	19
2.3.1.	Efeitos do acetato na Fermentação Lática	23
2.3.2.	Relação carbono/nitrogênio e seus efeitos na Fermentação Lática	25
2.4.	ÁCIDO LÁTICO	26
2.4.1.	Produção e Aplicação do Ácido Lático	27
3.	OBJETIVOS	29
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4.	METODOLOGIA.....	30
4.1.	CULTURA MICROBIANA.....	30
4.2.	ESTUDO CINÉTICO DE CRESCIMENTO DE <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 DURANTE O INÓCULO.....	30
4.2.1.	Desenvolvimento dos Inóculos	31
4.3.	FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO.....	31
4.4.	FERMENTAÇÃO	32
4.5.	MÉTODOS ANALÍTICOS	33
4.5.1.	Determinação do perfil de pH.....	33
4.5.2.	Determinação da concentração de biomassa.....	33
4.5.3.	Determinação das concentrações de glicose, ácido lático e acetato	34
4.6.	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS.....	34
4.7.	TRATAMENTO E ANÁLISES DE DADOS	36

5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1.	ANÁLISE DE CRESCIMENTO DE <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 DURANTE O ESTUDO CINÉTICO DO INÓCULO.....	37
5.2.	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469 EM DIFERENTES MEIOS FORMULADOS	38
5.2.1.	Efeitos do acetato na fisiologia e metabolismo fermentativo de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.....	39
5.2.2.	Efeitos do acetato e da variação na razão C/N na fisiologia e metabolismo fermentativo de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	41
5.2.3.	Avaliação da presença e ausência do acetato e influência da variação na razão de C/N nos aspectos fisiológicos de <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469 durante a fermentação	44
5.3.	PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO COM <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	50
5.4.	ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO DOS ENSAIOS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 7469.....	55
6.	CONCLUSÕES	59
	<u>REFERÊNCIAS.....</u>	<u>60</u>

1. INTRODUÇÃO

O ácido láctico é o ácido orgânico mais abundante na natureza, existindo nas formas D (-) e L (+) (Sudhakar e Dharani, 2022). Este ácido é essencial em vários setores industriais devido à sua versatilidade (Alexandri *et al.*, 2020), sendo amplamente utilizado em alimentos, fármacos, produtos químicos, cosméticos, agricultura e proteção ambiental (Gao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Na produção do ácido polilático (PLA), o ácido láctico tornou-se uma matéria prima crucial, sendo o PLA um polímero biodegradável que substitui plásticos derivados do petróleo, resultando em menos impactos ambientais (Fontes *et al.*, 2021).

A produção biológica de ácido láctico é responsável por mais de 90% da produção global, sendo uma opção promissora em larga escala, utilizando diferentes fontes de carbono e de nitrogênio (Oliveira *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2022). Essa abordagem oferece benefícios como baixo custo, baixa temperatura (30 a 37 °C) e menor consumo de energia, resultando em ácido láctico de alta pureza óptica (Gao *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2018). Essa via de produção ocorre pela ação de bactérias ácido lácticas (BAL), tendo como principal metabólito formado após a fermentação de carboidratos, o ácido láctico (Mora-Villabolos *et al.*, 2020).

As BAL são principalmente dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pedococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Juturu e Wu, 2016; Abedi *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2020). O gênero *Lactobacillus* era considerado o maior e mais importante gênero dentre as bactérias ácido lácticas, mas recentemente foi reorganizado taxonomicamente em 25 novos gêneros, incluindo o gênero *Lacticaseibacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

Lacticaseibacillus rhamnosus, um microrganismo chave do gênero *Lacticaseibacillus*, é considerado heterofermentativo facultativo, bacilar, não móvel, Gram-positivo e facultativamente anaeróbico (Collins *et al.*, 1989; Sun *et al.*, 2018). Para esses microrganismos, o principal produto da fermentação de carboidratos é o ácido láctico (Suissa *et al.*, 2023), tanto na via homolática quanto na heterolática. Metabolicamente, *L. rhamnosus* utiliza a via heterolática, ou seja, além de produzir ácido láctico, essas bactérias podem produzir outros compostos como acetato e etanol, podendo apresentar um rendimento máximo de 0,5 g de ácido láctico por grama de glicose (Abdel-Rhman *et al.*, 2013) ou próximo a 0,9 g/g (Miller *et al.*, 2017; Bintsis,

2018), não havendo uma clara consonância na literatura. Portanto, é de extrema importância avaliar o perfil metabólico dessa espécie microbiana para detalhar suas características fisiológicas durante crescimento e produção.

Alguns desafios são encontrados na produção biológica que, em sua grande maioria, são fatores do meio, tais como inibição do crescimento e metabolismo bacteriano pelo baixo pH, temperatura, concentração dos produtos sintetizados, concentração do substrato e relação C/N (Liew *et al.*, 2005; Yankov *et al.*, 2022; Lian *et al.*, 2022). Dentre os substratos, as fontes de carbono e nitrogênio são componentes-chave dos meios de cultivo e fermentação, sendo necessário adicioná-las em concentrações ideais, visando obter melhores resultados de crescimento e produção (Jafarpour *et al.*, 2020). Para uma ótima produção de ácidos, como o ácido láctico, é necessário que a razão C/N seja mantida dentro de uma variação ideal durante o processo de fermentação (Lian *et al.*, 2022).

Dessa forma, compreender o metabolismo das bactérias ácido lácticas é crucial para a seleção do microrganismo capaz de proporcionar rendimentos e produtividades satisfatórios. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os aspectos fisiológicos e metabólicos de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 durante a produção de ácido láctico em diferentes meios de cultivos com e sem acetato, variando o tipo de inóculos e as concentrações das fontes de carbono e de nitrogênio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E O GÊNERO *Lacticaseibacillus*

As Bactérias Ácido Láticas (BAL) são microrganismos Gram-positivos que podem ser encontrados em diversos nichos ecológicos, principalmente no trato gastrointestinal de animais ou em alimentos fermentados (Liu *et al.*, 2023). Esses organismos podem ser comensais, *starter* ou patogênicos (Papadimitriou *et al.*, 2016), e suas características incluem a formação de bastonetes, facultativamente anaeróbias, não formadoras de esporos e catalase negativa (Huang *et al.*, 2018). Essas bactérias são obrigatoriamente organismos fermentativos e possuem o ácido lático como o principal metabólito de seu metabolismo (Chamberlain *et al.*, 2022).

Os principais gêneros de BAL encontrados nas indústrias são *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Papadimitriou *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2021). Esses grupos de microrganismos são responsáveis por produzir uma gama de compostos bioativos de relevante importância socioeconômica, como as bacteriocinas, polióis, ácidos orgânicos, vitaminas, exopolissacarídeos e benzaldeído (Yang *et al.*, 2021). *Lacticaseibacillus* (antigo *Lactobacillus*) é o gênero mais diverso entre as bactérias ácido láticas em termos de nichos ecológicos, além de possuir a capacidade de tolerar alta acidez, concentrações elevadas de sais biliares e consumir diversos tipos de carboidratos (Huang *et al.*, 2020). A tolerância aos estresses bióticos e abióticos em *Lacticaseibacillus* é regulada por um complexo de genes funcionais regulatórios, e a expressão desses genes pode ser influenciada negativamente pelos componentes do meio, como as fontes de nitrogênio (Zhang *et al.*, 2022).

Anteriormente *Lactobacillus*, o gênero *Lacticaseibacillus* pertencente à família *Lactobacillaceae*, sendo considerado o principal entre as bactérias ácido láticas (Ibrahim, 2016; Zheng *et al.*, 2020), e exibe alto rendimento e produtividade de ácido lático (Chen *et al.*, 2020), principal metabólito do metabolismo de açúcares. Em 2020, as mais de 260 espécies do gênero *Lactobacillus* passaram por uma reclassificação, sendo redistribuídas em 25 novos gêneros, incluindo *Lacticaseibacillus*, no qual as espécies como *Lacticaseibacillus rhamnosus* foram realocadas (Zheng *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

Em termos metabólicos e fisiológicos, *Lacticaseibacillus* possui a capacidade de utilizar diversos tipos de carboidratos como fonte de energia (Ceapa *et al.*, 2016), como por exemplo frutose, sacarose, galactose, trealose, xilooligossacarídeos e xilose (Huang *et al.*, 2020), utilizando a energia química contida neles para manter seu crescimento. As espécies de *Lacticaseibacillus*, derivados ou isolados do leite, podem ser homofermentativas ou heterofermentativas, termófilas e algumas incapazes de fermentar pentoses (Zheng *et al.*, 2020). Na metabolização de carboidratos, essas espécies seguem a via glicolítica ou Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), onde há a oxidação de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, posteriormente em duas moléculas de lactato, resultando na produção de lactato, ATP e H₂O (Eiteman e Ramalingam, 2015; Mora-Villalobos *et al.*, 2020).

As espécies do gênero *Lacticaseibacillus*, como *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. casei* e *L. acidophilus*, são conhecidas por produzirem diversos compostos ácidos durante a fermentação (Sulijaya *et al.*, 2020; Hwang *et al.*, 2024), como butirato, propionato, malato, acetato e lactato (Silva *et al.*, 2020; Thananimit *et al.*, 2022), além de exopolissacarídeos e bacteriocinas. Os ácidos produzidos por espécies de *Lacticaseibacillus* têm propriedades antimicrobianas e atuam como conservantes de alimentos (Rocchetti *et al.*, 2021; Walter e O'Toole, 2023), agentes neuroativos (Silva *et al.*, 2020), inibidores de patógenos e agentes anti-inflamatórios, além de servir como fonte de energia para células (Thananimit *et al.*, 2022).

Além dessas, os microrganismos do gênero *Lacticaseibacillus* têm aplicações biotecnológicas e importância econômica significativas, incluindo biorremediação, como agentes terapêuticos, antimicrobianos, aditivos e suplementos alimentares (Walter e O'Toole, 2023; Hwang *et al.*, 2024). Devido à sua interação natural com humanos e animais, as espécies de *Lacticaseibacillus* vem sendo amplamente utilizadas como microrganismos probióticos na produção e preservação de alimentos e na formulação de suplementos alimentares (Douillard *et al.*, 2013).

Algumas bactérias do gênero *Lacticaseibacillus* são conhecidas como probióticos eficazes no tratamento e alívio de constipação, diarreia, doenças inflamatórias intestinais, síndrome do intestino irritável, diabetes tipo-2 (Guo *et al.*, 2023), na inibição de patógenos formadores de biofilmes (Zhang *et al.*, 2023), através da síntese de metabólitos como ácidos orgânicos, fenóis, peróxidos, compostos antimicrobianos, ácidos graxos de cadeia curta, bacteriocinas, biosurfactantes, exopolissacarídeos ou pela adesão aos patógenos (Schnurer e Magnusson, 2005;

Zangl *et al.*, 2020; Rezaei *et al.*, 2021; Thananimit *et al.*, 2022; Abdel-Nasser *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2023). Contudo, apesar de muitas espécies de *Lacticaseibacillus* deste gênero serem usadas como microrganismos *starter* em fermentações lácticas e como probióticos (Zheng *et al.*, 2020), nem todas as espécies são exploradas cientificamente ou industrialmente.

2.2. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DE *Lacticaseibacillus rhamnosus*

Lacticaseibacillus rhamnosus é uma espécie extremamente adaptável (fenotipicamente) a diferentes ambientes, sendo encontrada principalmente em produtos lácteos, microbiota gastrointestinal e sistema reprodutor humano (Nadkarni *et al.*, 2020; You *et al.*, 2023). *L. rhamnosus* está intimamente relacionada filogeneticamente e fenotipicamente com outras espécies, como *L. casei* e *L. paracasei* e ambos podem ser empregados como microrganismos probióticos produtores de compostos benéficos à saúde (Huang *et al.*, 2018).

O genoma das linhagens dessa espécie pode ultrapassar 3 Mbp, um dos maiores genomas dentre as bactérias ácido lácticas (Douillard *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2020). Linhagens de *L. rhamnosus* são conhecidas por aderir bem às células humanas, produzir compostos antimicrobianos e prevenir cáries, reduzindo a formação de biofilmes por patógenos cariogênicos (Thananimit *et al.*, 2022), e essas propriedades a tornam uma das espécies mais procuradas pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas (Ceapa *et al.*, 2016; Hwang *et al.*, 2024).

No intestino, as espécies de *Lacticaseibacillus* produzem ácidos orgânicos com funções metabólicas relevantes, justificando seu papel probiótico (Wang *et al.*, 2021), e outros compostos como surfactantes, bacteriocinas e peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), todos esses com propriedades antimicrobianas (Mesquita *et al.*, 2017). Geralmente *L. rhamnosus* é utilizado como microrganismo probiótico, devido às suas promissoras e benéficas propriedades na promoção da saúde do hospedeiro (Santos *et al.*, 2022), seu sequenciamento genético disponível (Segers e Lebeer, 2014), sua habilidade de produzir diversos compostos pós-bióticos como o ácido láctico (Peng *et al.*, 2022) e sua capacidade de adaptar-se às mudanças nas condições ambientais (Zhang *et al.*, 2023).

Nesse sentido, como uma espécie probiótica, vem sendo amplamente aplicada em alimentos e fármacos, modulando a microbiota intestinal e aumentando a

imunidade do hospedeiro (Zhang *et al.*, 2022). Adicionalmente, as diferentes linhagens de *L. rhamnosus*, vem sendo utilizadas para outros diversos fins. Em estudos genéticos e de bioengenharia, as linhagens *L. rhamnosus* GG (Lebeer *et al.*, 2011) e *L. rhamnosus* GR-1 (Petrova *et al.*, 2016) demonstraram capacidade inibitória sobre patógenos e células cancerígenas devido à expressão de proteínas específicas que impedem a adesão desses agentes em células epiteliais. No setor industrial, tal como na produção de ácido láctico, as linhagens *L. rhamnosus* ATCC 7469 (Marques *et al.*, 2017), *L. rhamnosus* La-04-1 (Chen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022) e *L. rhamnosus* B103 (Bernardo *et al.*, 2016) mostraram alto rendimento e produtividade durante a fermentação, sendo consideradas ideais para a produção desse ácido orgânico.

Outra aplicação industrial é na produção de polímeros extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS). Os exopolissacarídeos promovem agregação e superfície de adesão para os microrganismos probióticos (Ren *et al.*, 2023). As linhagens ZFM231 (Hu *et al.*, 2021), LOCK 0943 e 0935 (Oleksy-Sobczak *et al.*, 2020) de *L. rhamnosus*, foram empregadas na produção de EPS e apresentaram alta eficiência na síntese desses compostos. Segundo Hu *et al.*, (2021), os EPS também possuem aplicação como aditivo alimentar com propriedades protetoras, imunoestimulatórias, antioxidantes e antitumorais.

2.3. METABOLISMO FERMENTATIVO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Lactobacillaceae*

Devido à diversidade na família *Lactobacillaceae*, seus microrganismos apresentam propriedades bioquímicas e fisiológicas distintas, exigindo uma variedade de fatores de crescimento, como aminoácidos, minerais, ácidos graxos e vitaminas (Pejin *et al.*, 2017). As bactérias ácido lácticas, como as do gênero *Lactocaseibacillus*, caracterizam-se por baixo conteúdo G+C (< 55%) no DNA e ausência de citocromo (Franz e Holzapfel, 2011). Geralmente catalase negativas e tolerantes à acidez, algumas espécies, como *L. rhamnosus*, podem aumentar a síntese de compostos que favorecem a produção de ATP, NADH, exopolissacarídeos (EPS) e glicogênio (Papadimitriou *et al.*, 2016).

Algumas espécies da família *Lactobacillaceae* são extremamente fastidiosos, requerendo mais do que 10 aminoácidos para seu crescimento, o que requer uma grande quantidade de fonte de nitrogênio, sendo esse considerado o componente

mais caro de um meio de crescimento e produção (Catone *et al.*, 2021). O metabolismo das bactérias ácido lácticas é influenciado pela composição do meio e condições estressantes, como acidez, potencial oxirredutor, temperatura e biodisponibilidade de nutrientes (Aider-Kaci *et al.*, 2023). A domesticação de *Lactobacillaceae* ocorreu há milhares de anos, e esse processo levou a perda de diversos genes importantes em vias metabólicas, principalmente, devido aos ambientes nutricionalmente ricos em que os microrganismos são adicionados (Papadimitriou *et al.*, 2016). Logo, conhecer as características metabólicas e fisiológicas desses microrganismos em meios estressantes é de extrema importância para indústrias, principalmente na escolha das espécies com melhor potencial biotecnológico.

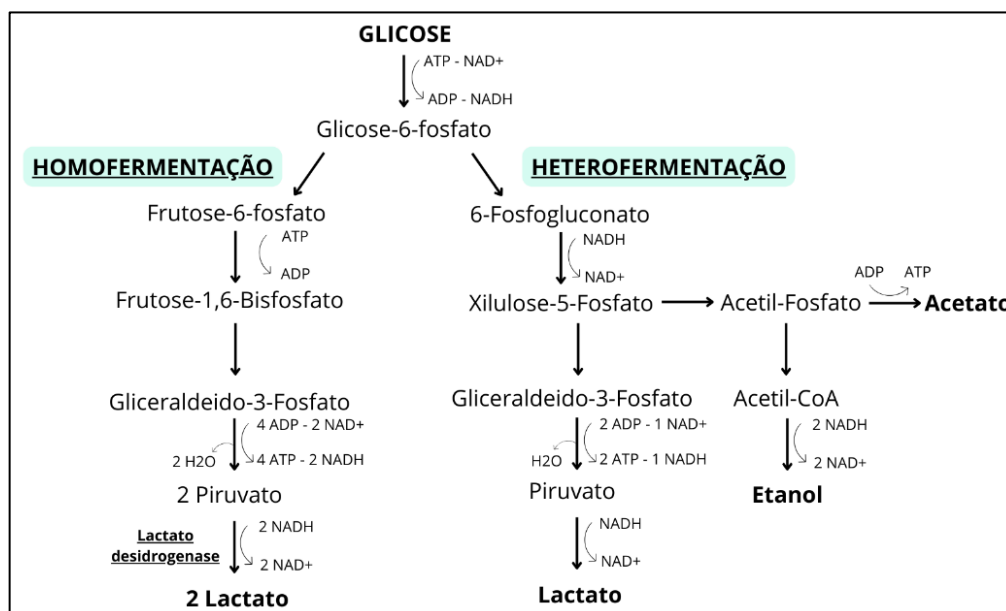
Assim como a maioria dos organismos, os carboidratos são as principais fontes de carbono utilizadas por bactérias lácticas. Em meios contendo pouca ou nenhuma quantidade de glicose, microrganismos do gênero *Lactocaseibacillus* apresentam a diminuição na quantidade de proteínas associadas a transporte de glicose, e aumento da produção de proteínas que transportam outros tipos de carboidratos, justificando assim seu alto poder de assimilação de diferentes tipos de carboidratos, sejam eles simples ou compostos (Angelis *et al.*, 2016). Na ausência de carboidratos, polifenóis e aminoácidos podem ser utilizados como fonte de energia pelos lactobacilos, auxiliando no crescimento dos microrganismos (Chamberlain *et al.*, 2022).

Os principais compostos produzidos durante o crescimento e fermentação de *Lactobacillaceae* são, principalmente, lactato, acetato, formato, succinato, etanol e CO₂ (Zheng *et al.*, 2020). Os microrganismos da família *Lactobacillaceae*, como apresenta a Figura 1, podem seguir a via homofermentativa (homolática) ou heterofermentativa (heterolática), estando condicionados, principalmente, ao tipo e concentração da fonte de carbono usada (Zheng *et al.*, 2020; Suissa *et al.*, 2021). Bactérias homofermentativas possuem a enzima aldolase, que converte hexoses em ácido láctico via Embden-Meyerhof (Abedi *et al.*, 2020). Por outro lado, bactérias heterofermentativas podem transformar carboidratos (hexoses e pentoses) em uma mistura de lactato, acetato, ácido fórmico, etanol e/ou dióxido de carbono (CO₂) (Abdel-Rhman *et al.*, 2011; Abedi *et al.*, 2020). A produção desses compostos está influenciada também pela concentração dos substratos. Por exemplo, em baixas concentrações de glicose, as bactérias heterofermentativas (obrigatórias ou

facultativas) podem gerar etanol e acetato, seguindo o metabolismo do piruvato (Bintsis, 2018).

Além do tipo e concentração da fonte de carbono, a concentração de oxigênio é outro fator que pode modificar a via metabólica dos microrganismos produtores de ácido láctico. Em anaerobiose ou com limitação de oxigênio, o ácido láctico é o principal produto da fermentação de açúcares por espécies da família *Lactobacillaceae* (Suissa *et al.*, 2021). Quando há presença de oxigênio, o lactato é oxidado a piruvato pela ação da enzima lactato oxidase. Posteriormente, o piruvato é convertido em acetato por meio das enzimas piruvato oxidase e acetato quinase (ACK) (Suissa *et al.*, 2022).

Figura 1. Vias metabólicas de produção de ácido láctico a partir da glicose.



Fonte: O Autor (2024) - Adaptado de Suissa *et al.* (2021)

Em termos de rendimentos, as bactérias homoláticas podem produzir mais de 90 gramas de ácido láctico por cada 100 gramas de glicose, isto é, mais de 1,8 mol de ácido por mol de carboidrato, já nas bactérias heteroláticas, menos de 1,8 mol de ácido láctico são produzidos por mol de glicose (Castro-Aguirre *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2021). Alguns autores citam que nas bactérias heterofermentativas a produção máxima é de 0,5 – 0,6 gramas de ácido láctico por grama de glicose (Abdel-Rhman *et al.*, 2013; Abedi *et al.*, 2020) ou rendimento próximo a 0,9 g/g (Miller *et al.*, 2017; Bintsis, 2018), não havendo uma clara consonância na literatura. Assim, compreender

o metabolismo dessas bactérias é crucial para a seleção do microrganismo capaz de proporcionar rendimentos e produtividades satisfatórios.

Em *Lactobacillaceae* a enzima lactato desidrogenase (Figura 1) é fundamental na conversão de piruvato, derivado da metabolização de açúcares, em lactato (Catone *et al.*, 2021). A estereoespecificidade da enzima determina a produção e quantidade dos isômeros D ou L do ácido láctico, sendo influenciada também pelo nível de expressão da enzima, variando conforme a linhagem bacteriana (Kim *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). Uma das maiores vantagens biotecnológicas do metabolismo bacteriano, é que este permite a produção específica de um dos isômeros, L (+) ou D (-), influenciando as características do produto (Mora-Villalobos *et al.*, 2020). Logo, o ácido láctico proveniente do metabolismo das espécies do gênero *Lactocaseibacillus* pode ser utilizado para aumentar a qualidade de diversos produtos, como por exemplo, dos alimentos (Wang *et al.*, 2021), sendo altamente requisitado por setores industriais.

Em termos de potencial biotecnológico, durante o processo fermentativo, *L. rhamnosus* pode produzir diversos metabólitos desejáveis, desde agentes antimicrobianos, como peptídeos e bacteriocinas, até ácidos orgânicos que podem melhorar a qualidade e aumentar o tempo de vida de um produto (Voidarou *et al.*, 2021). Em seu estudo, Chamberlain *et al.*, (2022) observaram que dentre quatro espécies analisadas (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus* e *L. rhamnosus*), *L. rhamnosus* foi a espécie que apresentou a maior capacidade de metabolizar os diferentes carboidratos analisados e teve uma ampla atividade enzimática, consequentemente, apresentando as maiores taxas de crescimento e produção de metabólitos.

Vale ressaltar que, como mencionado anteriormente, vários fatores, como o pH, podem influenciar o metabolismo bacteriano. Em pH baixo, por volta de 4,7, as atividades enzimáticas aumentam em aproximadamente 70%, enquanto a síntese de biomassa pode diminuir 80% em sua eficiência (Guan e Liu, 2020). Contudo, *Lactocaseibacillus rhamnosus* é amplamente reconhecida por sua tolerância à alta acidez, sais biliares, e capacidade de suportar concentrações elevadas de carboidratos, ácidos e temperaturas próximas a 50 °C (por até 10 minutos) (Reale *et al.*, 2015; Mathipa-Mdakane e Thantsha, 2022). Essas características fazem desta espécie uma escolha ideal para aplicação biotecnológica em diversas indústrias e setores comerciais.

O perfil metabólico de *L. rhamnosus*, quanto à produção de ácido láctico, é classificado como heterofermentativo facultativo, ou seja, o microrganismo pode produzir apenas ácido láctico a partir da glicose (Wang *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2022), ou produzir ácido láctico e outros compostos, como acetato (Jyoti *et al.*, 2004; Ceapa *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018). Logo, a alteração no perfil metabólico do microrganismo é facultativa e está condicionada às variáveis da fermentação, como por exemplo, o tipo de carboidrato empregado (Cheong *et al.*, 2022). No entanto, um microrganismo heterofermentativo facultativo necessariamente utiliza a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para metabolizar hexoses (por exemplo, glicose), enquanto as pentoses são metabolizadas por vias distintas (Pagana *et al.*, 2014).

Lactocaseibacillus rhamnosus ATCC 7469, destaca-se como uma das principais linhagens da espécie, é anaeróbica e produz ácido L – Láctico durante a fermentação, utilizando glicose, celobiose, arabinose, ribose e sacarose (Ibrahim, 2016). Além disso, este microrganismo pode metabolizar pentoses e hexoses simultaneamente (Chamberlain *et al.*, 2022).

2.3.1. Efeitos do acetato na Fermentação Láctica

Pouco se sabe sobre os efeitos do acetato na fisiologia de bactérias ácido lácticas durante a fermentação, menos ainda em *Lactocaseibacillus rhamnosus*. O acetato é geralmente produzido a partir do acetaldeído, que é um importante composto do metabolismo dos microrganismos (Teles *et al.*, 2023). Diferente do lactato, principal metabolismo primário das BAL, o acetato é o principal metabólito secundário, devido ao menor gasto energético (Khor *et al.*, 2016). Como já mencionado anteriormente, no grupo das BAL, as bactérias heterofermentativas produzem obrigatoriamente ou facultativamente o acetato. Além disso, em algumas BALs, o lactato pode ser convertido em acetato nas condições anóxicas com a presença de aceptores de elétrons alternativos ou sob condições anaeróbicas estritas, sem aumentar o crescimento celular (Khor *et al.*, 2016).

Nos meios de cultivos e fermentação, como o MRS, o acetato é adicionado em sua forma associada com o sódio, visando gerar um sistema tampão no meio e manter um equilíbrio do pH (Hayek *et al.*, 2019) ou inibir o crescimento de fungos, devido às suas atividades antifúngicas (Stiles *et al.*, 2002). De acordo com a literatura, o acetato pode inibir o crescimento de microrganismos por meio do efeito de desacoplamento.

Isto é, na forma de ácido acético (protonada), ele se difunde livremente para dentro da célula, criando uma diferença de potencial, devido ao menor pKa do acetato (4,76) em comparação ao pH celular (7,6). Como resultado, o excesso de acetato é expelido da célula, exigindo um gasto energético que prejudica o crescimento dos microrganismos (Pinhal *et al.*, 2019).

Outra hipótese do efeito da presença de acetato na célula microbiana está na redução do conjunto de outros ânions, impedindo a manutenção da pressão osmótica e a função celular (Millard *et al.*, 2023). Assim, no geral, o aumento na concentração do acetato e a acidificação do citosol levam à inibição de diversos processos metabólicos importantes para os microrganismos (Martynova *et al.*, 2016). Não há consenso sobre a concentração máxima de acetato que pode ser adicionada a um cultivo microbiano. Contudo, o acúmulo deste composto no meio pode inibir o crescimento bacteriano (Pinhal *et al.*, 2019). Luli e Strohl (1990) relataram que concentrações de acetato acima de 5 g/L são tóxicas e inibem o crescimento microbiano, uma observação confirmada por Fotidis *et al.* (2012), sendo essa a concentração utilizada em meios de crescimento, como o MRS.

Efeitos positivos do acetato de sódio na fisiologia de bactérias ácido lácticas, especialmente na produção metabólitos ou atividades biológicas, são bem documentados. Por exemplo, Stiles *et al.* (2002) relataram que a adição de acetato ao meio MRS formulado aumentou a atividade antifúngica de *Lactocaseibacillus rhamnosus* VT1 frente a 33 das 42 linhagens fúngicas testadas. Pedro *et al.* (2023), concluíram em seu estudo que a atividade antifúngica de *L. gasseri* frente a duas espécies de *Candida* sp. aumentou quando o acetato de sódio estava presente. Kusmiati *et al.* (2022) observaram que o aumento na concentração de acetato de sódio aumentou a concentração de exopolissacarídeos por *L. plantarum* durante o cultivo em meio MRS.

Como constituinte dos meios de produção, o acetato também pode ser usado para formação de acetil-CoA (usado em reações anabólicas) ou para o crescimento de BALs com metabolismo homofermentativo obrigatório, já que essas bactérias não produzem acetato após a metabolização da(s) fonte(s) de carbono (Slavica *et al.*, 2015). Na produção de ácido láctico com meio de produção do tipo MRS, Lino *et al.* (2001), observaram que a adição de acetato de sódio ao meio fermentado por *L. sakei* aumentou a produção de ácido láctico. Segundo esses autores, além de aumentar a produção, o acetato de sódio atuou como regulador da via enzimática responsável

pela produção do isômero L do ácido, ao aumentar a expressão da enzima L-lactato desidrogenase. Contudo, poucos estudos avaliaram os efeitos do acetato nos aspectos fisiológicos e metabólicos de *L. rhamnosus* ou de espécies do gênero *Lactobacillus* durante a produção do ácido láctico, tornando essa investigação essencial para o entendimento da biologia bacteriana.

2.3.2. Relação carbono/nitrogênio e seus efeitos na Fermentação Láctica

Como são considerados microrganismos fastidiosos, as bactérias requerem meios de cultura ricos em diversos nutrientes, devido à carência de vias metabólicas importantes para seu crescimento e metabolismo (Chang e Liew, 2013; Abbasiliasi *et al.*, 2016). Contudo, esses meios devem conter o tipo e a quantidade adequada de cada componente, entregando uma proporção de C/N ideal (Chasoy *et al.*, 2020).

Como principais componentes dos meios de cultivo e do processo de fermentação, as fontes de carbono e nitrogênio estão presentes em maiores quantidades nas formulações (Jafarpour *et al.*, 2020). Contudo, a relação entre Carbono/Nitrogênio deve ser mantida em concentrações ideais para não limitar o metabolismo dos microrganismos (Lian *et al.*, 2022). A glicose, um carboidrato simples, é o principal componente dos meios de fermentação. Este carboidrato é a fonte de energia preferida pelas BALs (Hashemi *et al.*, 2020), que a metabolizam através da via Embden-Meyerhof, gerando biossíntese celular, produção de coenzimas e metabólitos primários (Abedi *et al.*, 2020; Jafarpour *et al.*, 2020).

As fontes de nitrogênio, como extrato de carne, extrato de levedura, peptona bacteriológica, também são essenciais em quantidades adequadas. Isto é, em baixas concentrações, podem limitar o crescimento bacteriano devido à baixa produção de enzimas metabólicas, enquanto em excesso, podem ser tóxicas e inibir o crescimento celular (Lu *et al.*, 2010). Devido à carência de vias biossintéticas importantes para o crescimento celular, as bactérias ácido lácticas necessitam de duas ou mais fontes de nitrogênio (Juturu e Wu, 2016). O extrato de levedura é particularmente importante por fornecer fatores de crescimento, como nitrogênio, vitaminas e minerais, que estimulam o crescimento das BALs (Jafarpour *et al.*, 2020; Zakariyah *et al.*, 2021). Contudo, a adição descontrolada da(s) fonte(s) de nitrogênio, além de inibir o crescimento, pode impedir a assimilação dos açúcares e, conseqüentemente, a biossíntese de ácido láctico (Chasoy *et al.*, 2020).

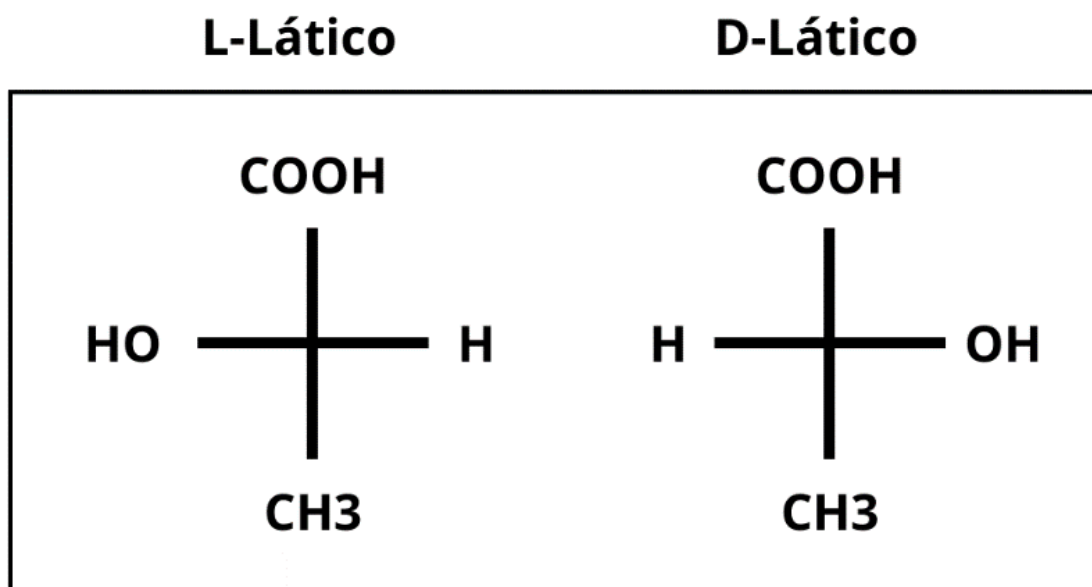
Alguns estudos demonstram que a razão C/N influencia no crescimento bacteriano, na produção metabólitos primários, como o ácido láctico (Lu *et al.*, 2010; Coelho *et al.*, 2011; Jafarpour *et al.*, 2021) e secundários, como as bacteriocinas (Abbasiliasi *et al.*, 2017). Desse modo, como o metabolismo microbiano está intimamente relacionado ao crescimento celular, e ambos são influenciados diretamente pela composição do meio (Tian *et al.*, 2020), é essencial desenvolver meios de produção com quantidades ideais de cada componente, especialmente fontes de carbono e nitrogênio.

2.4. ÁCIDO LÁTICO

O ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) é um hidroxiácido encontrado naturalmente em duas formas isoméricas opticamente ativas (ácido L (+) e D (-) láctico) (Figura 2) (Pejin *et al.*, 2018; Sudhakar e Dharani, 2022), sendo um dos ácidos orgânicos mais abundantes da natureza (Yang *et al.*, 2020). O ácido láctico foi descoberto pelo químico suíço Scheele em 1780 (Singhvi *et al.*, 2021), sendo produzido por via biológica pela primeira vez apenas em 1880, nos Estados Unidos (Ghaffar *et al.*, 2014; Krishna *et al.*, 2018).

Caracterizado como um ácido fraco, o ácido láctico é um metabólito intermediário importante para diversos organismos, desde os procariotos até os humanos (Haris *et al.*, 2023). Por via química ou biológica, este ácido pode ser convertido em outros compostos químicos, como acetaldeído, acetilacetona, propilenoglicol e ácido acrílico (Singhvi *et al.*, 2021).

Figura 2. Estrutura molecular do Ácido Láctico nas suas formas L (+) e D (-).



Fonte: O Autor (2024) - Adaptado de Ojo *et al.* (2023)

2.4.1. Produção e Aplicação do Ácido Lático

A produção anual atual é de 270.000 toneladas, sendo esperada uma produção 11,5 % maior até 2025 (Lee *et al.*, 2023), e seu mercado pode ultrapassar os 9 bilhões de dólares em 2025 (Rombouts *et al.*, 2020). Há dois métodos de produção do ácido lático, podendo ocorrer por via química ou biológica, sendo que aproximadamente 90% da produção mundial provém do processo fermentativo com bactérias ácido lácticas (Wang *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2022).

A produção por meio de síntese química apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, alto custo de produção (Castro-Aguirre *et al.*, 2016), e a incapacidade de produzir somente um tipo de enantiômero, apresentando uma mistura racêmica dos dois tipos de isômeros de ácido lático (Eiteman e Ramalingam, 2015; Wang *et al.*, 2015; Anagnostopoulou *et al.*, 2022).

Na via química a lactonitrila é hidrolisada em ácido lático com auxílio de ácidos fortes, o que pode ocasionar diversos impactos ambientais negativos (Krishna *et al.*, 2018). Além disso, o alto custo associado à produção química contribui para a elevação do valor do ácido orgânico (Guo *et al.*, 2023). As bactérias ácido lácticas produzem naturalmente ácido lático como metabólito intermediário de seu metabolismo, e são amplamente utilizadas devido às propriedades, tais como: alta taxa de conversão, alta pureza ótica, alta produtividade, menor consumo de energia e

de substrato (Tian *et al.*, 2021). Por meio da fermentação com bactérias, devido ao aparato enzimático que possuem, é possível produzir os dois ou somente um tipo dos enantiômeros de ácido láctico, L (+) ou D (-), possibilitando maior especificidade em sua aplicação (Mora-Villalobos *et al.*, 2020).

A quantidade de cada isômero (L ou D) presente na mistura produzida influencia diretamente nas características do produto, como, por exemplo, na cristalinidade e estabilidade térmica (Eiteman e Ramalingam, 2015). Cada um dos isômeros possui aplicações diferentes. Por exemplo, o isômero ácido L (+) – láctico é amplamente utilizado pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos, já o ácido D (-) – láctico pelas indústrias químicas, pois pode causar acidose ou descalcificação quando presente em grandes quantidades nos humanos (Oliveira *et al.*, 2018; Haris *et al.*, 2023).

O ácido láctico pode ser aplicado em diversos setores industriais, desde a indústria alimentícia e farmacêutica, até a indústria de cosméticos e químicos (Chen *et al.*, 2023). A indústria de alimentos é o setor que mais utiliza ácido láctico, visto que este ácido orgânico pode ser aplicado como agente de fermentação e conservante de alimentos, fortificante nutricional, acidulante e intensificador de sabor (Oliveira *et al.*, 2018), além de atuar como agente aromatizante, bactericida e conservante (Yang *et al.*, 2020). Devido aos seus grupos carboxílicos e hidroxilas, o ácido láctico pode ser convertido em outros compostos na indústria química, como ácido pirúvico, ácido acrílico e éster de lactato (Gao *et al.*, 2011; Singhvi *et al.*, 2021).

Na medicina, o ácido láctico, assim como outros metabólitos, pode afetar positivamente a saúde dos consumidores/hospedeiros e por isso são definidos como pós-bióticos. Os pós bióticos são todos aqueles compostos microbianos produzidos pelos probióticos que possuem funções terapêuticas reconhecidas (Pimentel *et al.*, 2023). Diferente dos probióticos, os pós bióticos possuem maior estabilidade a longo prazo, são bastante definidos quanto a suas ações e não transmitem resistência a antibióticos (Liu *et al.*, 2023).

Outra aplicação do ácido láctico está na produção de polímeros biodegradáveis, como o Ácido Polilático (PLA), que é um termoplástico biodegradável e renovável que, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, tem sido amplamente utilizado na produção de dispositivos de implantes, suportes para tecidos e suturas, nas indústrias farmacêuticas e indústria têxtil (Kuru e Kaya, 2023). Sendo assim, o PLA é uma alternativa ecologicamente correta aos plásticos convencionais.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os aspectos fisiológicos de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 na produção de ácido láctico a partir de diferentes meios de cultivos formulados na presença e ausência de acetato.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudo cinético do crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o desenvolvimento do inóculo em meio MRS comercial;
- Formular diferentes meios de cultura complexos baseando-se no meio comercial MRS, para comparar o crescimento, o consumo de glicose, a produção de ácido láctico, a concentração de acetato e o pH durante as fermentações;
- Comparar o comportamento metabólico de *L. rhamnosus* ATCC 7469 no meio comercial e nos meios formulados;
- Avaliar a influência do acetato, do tipo de inóculo e da razão Carbono/Nitrogênio nas características fisiológicas de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante a fermentação;
- Determinar a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$), rendimento em produto ($Y_{P/S}$) e as produtividades volumétricas máximas da biomassa (Q_X) e do produto (Q_P) em todas as fermentações;
- Analisar a semelhança e diferença dos ensaios de cultivo por meio de Análise de Clusterização.

4. METODOLOGIA

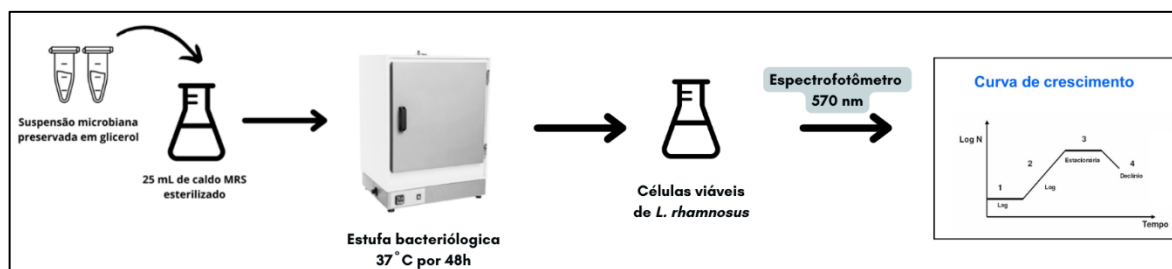
4.1. CULTURA MICROBIANA

A cultura comercial de *L. rhamnosus* ATCC 7469, proveniente da Plast Labor (Rio de Janeiro), foi preservada em glicerol (10% v/v) a -20 °C no freezer FFE24 da Electrolux, seguindo a metodologia de Chang e Liew (2013). O microrganismo foi mantido preservado em glicerol até posterior uso.

4.2. ESTUDO CINÉTICO DE CRESCIMENTO DE *L. rhamnosus* ATCC 7469 DURANTE O INÓCULO

Visando definir a fase exponencial de crescimento de *L. rhamnosus* e usá-la como critério de transferência do inóculo para a fermentação principal, foi realizado um estudo cinético de 48h em meio MRS comercial. Para isso, foi determinada a absorbância do caldo fermentado em espectrofotômetro a 570 nm (VIS-2006, Gehaka) em intervalos pré-determinados, como demonstra a Figura 3. Inicialmente, adicionaram-se 2 mL de suspensão bacteriana (7 a 8 Log UFC/mL) preservada em glicerol a 25 mL de caldo MRS. O meio foi incubado a 37 °C por até 48h em estufa bacteriológica.

Figura 3. Esquema de estudo cinético do crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o desenvolvimento do inóculo em meio MRS Comercial.



Fonte: O Autor (2024)

Após intervalos pré-determinados (0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36 e 48h), alíquotas de 1 mL foram retiradas, diluídas em água destilada (1:10) e foram lidas as absorbâncias em espectrofotômetro. As absorbâncias foram anotadas e utilizadas

para a construção do gráfico de curva de crescimento. O estudo foi realizado em triplicata e os resultados obtidos foram utilizados para calcular a média, desvio padrão, coeficiente de variação e a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}).

4.2.1. Desenvolvimento dos Inóculos

Após a definição da fase exponencial de crescimento, foram desenvolvidos dois tipos de inóculos, MRS comercial e MRS formulado. O inóculo do tipo MRS comercial (MRS_C) foi utilizado somente para os ensaios E1 e E2, para os demais ensaios foi utilizado o inóculo do tipo MRS Formulado (MRS_F). Para a reativação do microrganismo, foram adicionados 2 mL da suspensão bacteriana (7 a 8 Log UFC/mL) preservada a 25 mL de caldo MRS comercial (MRS_C) (de Man, Rogosa e Sharpe) ou MRS Formulado (MRS_F) e incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 15h, baseando-se nos dados obtidos durante o estudo cinético do inóculo (Item 4.1).

4.3. FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO

Para a avaliação dos efeitos da presença ou ausência de acetato, do tipo do inóculo e da variação da razão carbono/nitrogênio (C/N) no crescimento e metabolismo de *L. rhamnosus* ATCC 7469, foram realizados 8 (oito) ensaios, sendo um com caldo MRS comercial (E1) e sete com MRS formulado (E2 a E8), conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Razão C/N, tipo do inóculo e composição química dos meios de cultivos utilizados na fermentação por *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Ensaio	Razão C/N* (g/g)	Tipo do inóculo	Componentes (g/L)				
			Glicose	Acetato de sódio	Peptona bacteriológica	Extrato de carne	Extrato de levedura
E1	3,33	MRS _C	20	5	10	8	4
E2	3,33	MRS _C	20	5	10	8	4
E3	3,33	MRS _F	20	-	10	8	4
E4	3,33	MRS _F	20	5	10	8	4
E5	6,67	MRS _F	40	-	10	8	4
E6	6,67	MRS _F	40	5	10	8	4
E7	3,33	MRS _F	40	-	20	16	8
E8	3,33	MRS _F	40	5	20	16	8

* **C/N** = Relação carbono e nitrogênio; **MRS_c** – MRS comercial; **MRS_f** – MRS Formulado; (-) ausência de acetato;

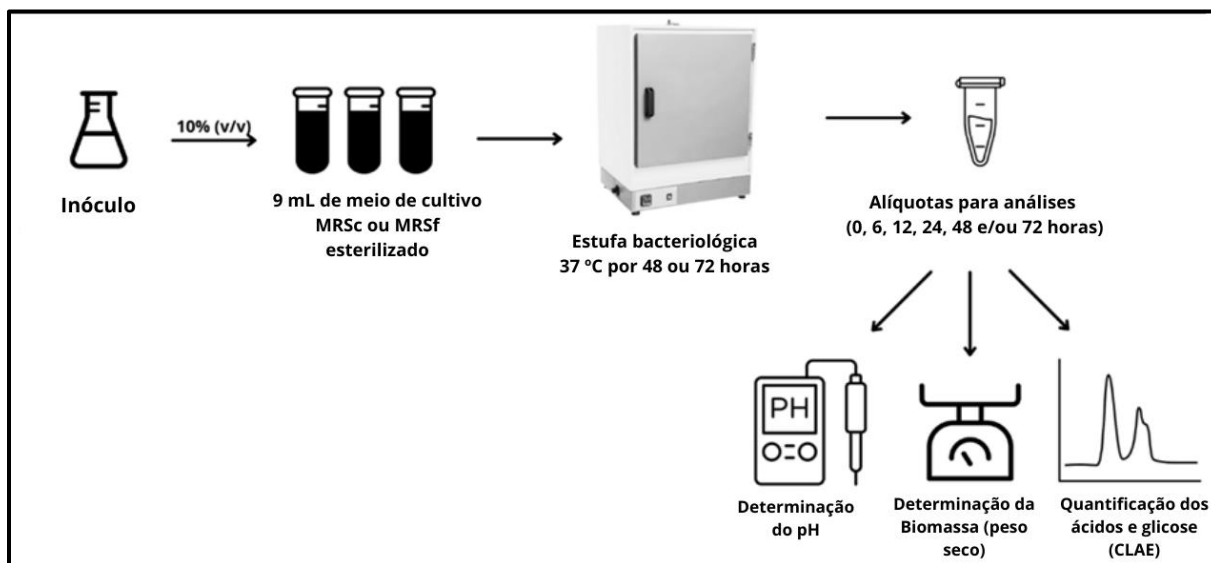
A preparação do meio MRS comercial (E1) seguiu as instruções do fabricante (Kasvi), diluindo-se 52,25 g/L de caldo MRS em água destilada. Para os meios MRS formulados (E2 a E8), utilizaram-se os mesmos componentes do meio comercial, mas em concentrações diferentes, conforme descrito na Tabela 1. Além dos componentes presentes na tabela acima, todos os meios formulados (E2 a E8) continham: 2 g/L de Citrato de Amônio (Dinâmica); 2 g/L de Fosfato de Potássio (Dinâmica); 1 g/L de Tween 80 (Synth); 0,2 g/L de Sulfato de Magnésio (Dinâmica); e 0,05 g/L de Sulfato de Manganês (Fmaia).

Os meios E1 e E2 são semelhantes em sua composição, porém o E2 foi formulado. Os meios E2 e E4 também são semelhantes em sua composição química, mas seus inóculos são diferentes, como mostra a Tabela 1. Após a preparação, todos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

4.4. FERMENTAÇÃO

Para a avaliação da capacidade fermentativa de *L. rhamnosus* ATCC 7469, os ensaios experimentais descritos no item 4.4 foram empregados na produção de ácido láctico. O inóculo bacteriano foi preparado de acordo com o Item 4.3. A fermentação ocorreu com a adição de 10% (v/v) de inóculo bacteriano (em sua fase exponencial) em tubos esterilizados de capacidade de 15 mL contendo 9 mL de meios de fermentação esterilizados (Figura 4). Os tubos foram incubados de forma estática em estufa bacteriológica sem circulação de ar a 37 °C por até 72 horas. Todas as fermentações foram realizadas em tubos independentes e em triplicata.

Figura 4. Esquema do processo de fermentação dos meios de produção.



Fonte: O Autor (2024)

4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.5.1. Determinação do perfil de pH

A determinação do pH dos meios de cultivo durante o período de fermentação foi conduzida utilizando o potenciômetro digital (Jenway 3510, Meter).

4.5.2. Determinação da concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada pelo método do peso seco. Para isso, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada tubo de fermentação, transferida independentemente para tubos de Eppendorfs previamente secos e tarados, e centrifugada a $6.708 \times g$ por 10 minutos. Após centrifugação, os sobrenadantes foram retirados e armazenados em freezer para posterior quantificação dos ácidos e da glicose. Os tubos de Eppendorf foram secos em estufa a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e, em seguida, transferidos para o dessecador até atingir a temperatura ambiente, antes de serem pesados em balança analítica. As massas (g) foram utilizadas para calcular a concentração de biomassa (g/L), conforme a equação abaixo.

$$C = \frac{m_s - m_{ep}}{V_a} \quad \text{Eq. 1}$$

Onde:

m_s : Massa dos eppendorfs após a secagem;

m_{ep} : Massa dos eppendorfs antes da secagem;

V_a : Volume da amostra

4.5.3. Determinação das concentrações de glicose, ácido láctico e acetato

Durante as fermentações foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as concentrações de glicose, ácido láctico e acetato (Farias *et al.*, 2016). Para isso, os sobrenadantes obtidos no item anterior foram filtrados em filtros Millipore com 0,22 μm de diâmetro de poro e diluídos na proporção de 1:10 com fase móvel (H_2SO_4).

As análises foram conduzidas utilizando uma coluna de troca iônica (HPX-87H⁺, Aminex ®), fase móvel aquosa de H_2SO_4 (5 mM) e fluxo de 0,6 mL/min. Os detectores utilizados foram: detector de índice de refração (RID-10A, Shimadzu Corporation) para a glicose e detector de arranjo de diodos (SPD-M20A, Shimadzu Corporation) para o ácido láctico e acetato. Utilizou-se o software LC Solution da Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão) para coletar dados. A temperatura de trabalho da coluna foi 30 °C para o ácido láctico e acetato e de 60 °C para a glicose. Amostras padrão (1 g/L) de glicose, ácido láctico e acetato, foram utilizadas para construção das curvas de calibração destes analitos. As curvas tiveram coeficientes de determinação maiores do que 0,999.

4.6. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Foram determinados parâmetros cinéticos durante o inóculo e a fermentação principal. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi calculada a partir da absorbância (570 nm) durante o crescimento na etapa do inóculo e a partir dos valores de biomassa (g/L) durante as fermentações principais. A equação de primeiro grau, gerada ao plotar $\ln(x)$ em relação ao tempo de cultivo (h), forneceu o coeficiente angular equivalente à velocidade específica máxima de crescimento durante o inóculo.

Para o cálculo do μ_{max} durante as fermentações principais, foi utilizada a Equação 2:

$$\mu_{\text{max}} = \frac{\ln(X) - \ln(X_i)}{t - t_i} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde:

$\mu_{\max}$: velocidade específica máxima de crescimento;

$\ln(X)$: logaritmo neperiano da biomassa no final da fase exponencial;

$\ln(X_i)$: logaritmo neperiano da biomassa inicial;

t : tempo final da fase exponencial;

t_i : tempo inicial da fase exponencial.

O rendimento do produto em razão do consumo de substrato foi calculado utilizando a Equação 3:

$$Y_{P/S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

P_f : Concentração final do produto;

P_i : Concentração inicial do produto;

S_i : Concentração inicial do substrato;

S_f : Concentração final do substrato.

O rendimento de biomassa em relação ao substrato foi calculado utilizando a Equação 4:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde:

X_f : Concentração final da biomassa;

X_i : Concentração inicial da biomassa;

S_i : Concentração inicial do substrato;

S_f : Concentração final do substrato.

As produtividades volumétricas máximas, do produto (Q_P) e da biomassa (Q_X) foram calculadas utilizando as seguintes Equações:

$$Q_P = \frac{(P_{\max} - P_i)}{(t - t_i)} \quad \text{Eq. 5}$$

$$Q_X = \frac{(X_{max} - X_i)}{(t - t_i)} \quad \text{Eq. 6}$$

Onde:

P_{max} e X_{max}: Concentração máxima do produto e biomassa, respectivamente;

t: tempo necessário para atingir a máxima concentração do produto ou biomassa;

t_i: tempo inicial da fermentação.

4.7. TRATAMENTO E ANÁLISES DE DADOS

Os softwares Excel e Origin 2024b foram utilizados para as análises de dados e construção dos gráficos, respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A média, desvio padrão e coeficientes de variação foram calculados utilizando o software Excel a partir dos valores obtidos em cada ensaio. As quantificações de biomassa, ácido láctico, acetato e glicose foram realizadas em triplicata. A análise estatística a partir da análise de variância (ANOVA) univariada foi realizada utilizando o software Past 4.0.

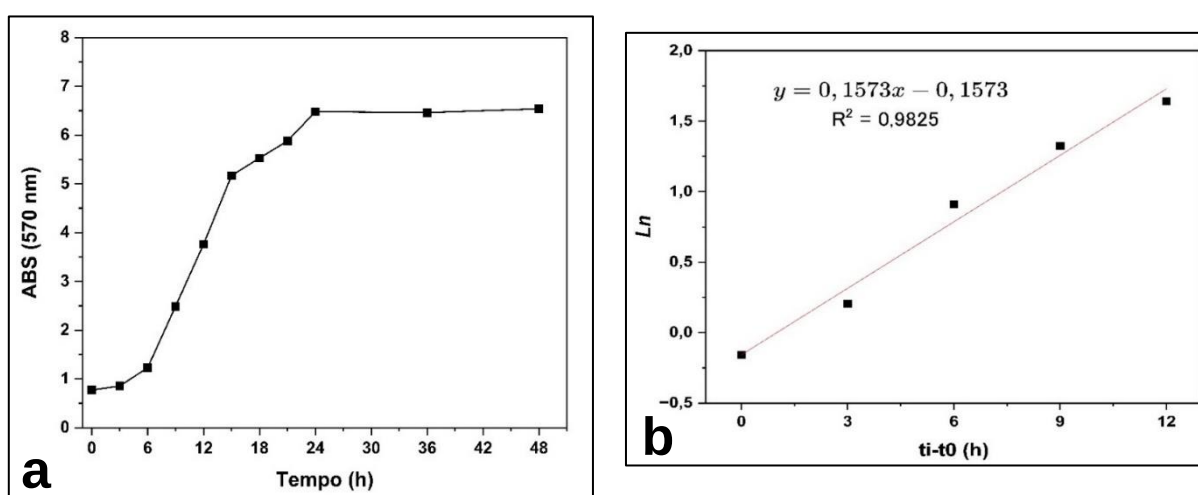
Para analisar o conjunto de dados obtidos, referente aos oito ensaios (E1 a E8), a plataforma Clustvis foi utilizada, conforme descrito por Metsalu e Vilo (2015). Essa ferramenta permite a análise de dados multivariados e a correlação existente entre eles através da geração de mapa de calor, que foi plotado utilizando o pacote pheatmap R (versão 0.7.7) disponível no site: <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ANÁLISE DE CRESCIMENTO DE *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 DURANTE O ESTUDO CINÉTICO DO INÓCULO

Visando acompanhar o perfil de crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469, foi realizado um estudo cinético de 48h durante o desenvolvimento do inóculo em meio MRS comercial (Figura 5) para estabelecer a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\max}$).

Figura 5. Estudo cinético do crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante o desenvolvimento do inóculo (a) e Curva de crescimento microbiano: $\ln$ (Absorbância) em função do tempo (b).



Conforme ilustrado na Figura acima (Figura 5a), o padrão de crescimento de *L. rhamnosus* ATCC 7469 segue uma cinética microbiana típica, com fases de latência (lag), exponencial (log) e estacionária. Nas primeiras 3 horas, o microrganismo estava na fase de latência, com uma absorbância (ABS) igual a $0,85 \pm 0,001$, sem crescimento aparente. Após esse período, entrou na fase exponencial, fase na qual o microrganismo alcança a sua máxima velocidade de crescimento (ABS igual a $5,17 \pm 0,004$). Ao final do experimento, o microrganismo desacelerou seu crescimento, atingindo um platô máximo na fase estacionária (~ 24h). Assim, foi considerado como a fase exponencial (fase log) o intervalo de 6 a 15 horas de crescimento. Este resultado é utilizado como parâmetro para a transferência do inóculo para o meio de fermentação principal, visando encurtar a fase de adaptação do microrganismo ao

meio (fase lag), permitindo um crescimento e formação de ácido lático de forma mais rápida.

Após a identificação da fase exponencial de crescimento, foi criado um gráfico utilizando o logaritmo neperiano ($\ln$) de cada ABS em relação ao tempo de cultivo, subtraindo o tempo correspondente ao período de latência ($T_i - T_0$), conforme demonstrado na Figura 5b.

Como observa-se na Figura 5b, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) de *L. rhamnosus* foi de $0,1573 \text{ h}^{-1}$, sendo esse valor igual ao coeficiente angular (a) da equação 7. Com as médias dos valores de $\ln$ para cada ABS obtida para os tempos de 6, 9, 12 e 15h, obteve-se a equação da reta abaixo.

$$y = 0,1573x - 0,1573 \quad \text{Eq. 7}$$

Com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9825, é possível ter a comprovação de que há uma precisão e uma boa qualidade dos resultados. O estudo cinético de crescimento prévio, ou durante o processo fermentativo, é essencial para entender o padrão de crescimento bacteriano e analisar o comportamento metabólico e/ou fisiológico desses microrganismos diante dos ensaios da fermentação, e assim determinar de forma mais concreta a velocidade de crescimento e de conversão do substrato em produtos. Este resultado está de acordo com Mesquita *et al.* (2017), que observaram um $\mu_{\max}$ de $0,20 \text{ h}^{-1}$ para espécies de *Lactobacillus* dentre eles *L. rhamnosus* ATCC 9595 em meio MRS comercial.

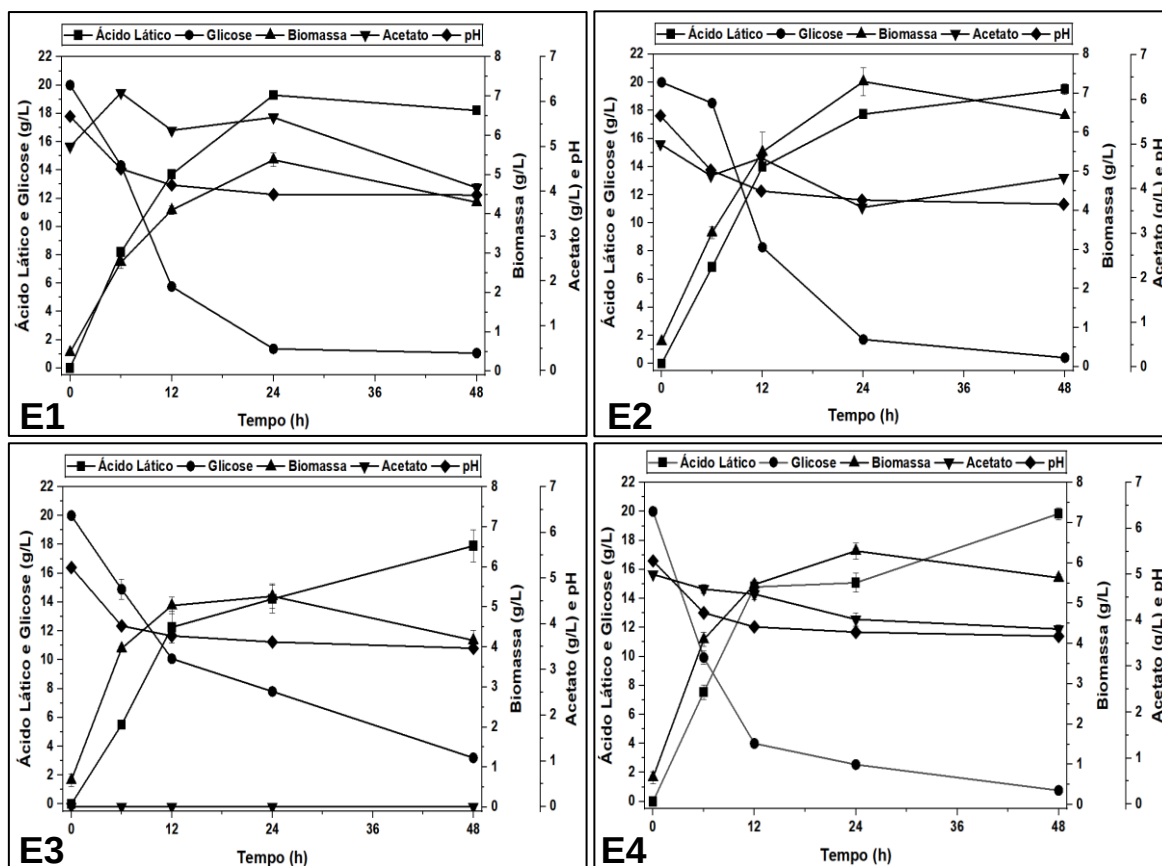
5.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DE *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 EM DIFERENTES MEIOS FORMULADOS

Os resultados deste estudo foram divididos em dois grupos. No primeiro grupo, está apresentado o desempenho de *L. rhamnosus* ATCC 7469 em meios que diferem entre si apenas pela presença ou ausência de acetato e tipo de inóculo utilizado, correspondendo aos ensaios E1, E2, E3 e E4 (Figura 6). No segundo grupo, analisaram-se os efeitos da presença ou ausência de acetato e variação nas concentrações das fontes de carbono e nitrogênio, sendo eles E5, E6, E7 e E8 (Figura 7).

5.2.1. Efeitos do acetato na fisiologia e metabolismo fermentativo de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469

A concentração de biomassa, o consumo de glicose, a produção de ácido láctico, a concentração de acetato e o pH, durante 48 horas de fermentação, nos ensaios do primeiro grupo são apresentados na Figura 6¹. O meio do inóculo foi o MRS comercial nos ensaios E1 e E2 e o MRS formulado nos ensaios E3 e E4. O perfil cinético de *L. rhamnosus* foi semelhante nos dois tipos de inóculos. Após 15h de incubação, a absorbância do inóculo MRS formulado foi de $5,7 \pm 0,004$, valor próximo ao do inóculo MRS comercial ($\sim 5,2 \pm 0,004$).

Figura 6. Análise fisiológica de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante as fermentações nos ensaios E1 (MRS comercial), E2 (MRS formulado), E3 (MRS formulado sem acetato) e E4 (MRS formulado com acetato).



¹ **E1** – MRS comercial; **E2** – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_C; **E3** – MRS formulado sem acetato e inóculo MRS_F; **E4** – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_F.

A partir da análise da Figura 6 observa-se que houve crescimento nos quatro diferentes ensaios (E1, E2, E3 e E4²). A concentração máxima de biomassa foi observada com 24 horas em todos os ensaios. Contudo, com exceção daquela obtida no ensaio E3 (Figura 6). Neste ensaio, em que não foi adicionado acetato ao meio MRS formulado, o microrganismo cresceu até às 12h de cultivo, sem crescimento aparente após este período. Nos ensaios com a presença de acetato, a concentração máxima de biomassa foi maior do que 6 g/L, com destaque para E4. Por outro lado, em E3, apesar do crescimento ter sido mais rápido, a concentração máxima foi menor do que este valor, sendo essa de 5,3 g/L.

Ainda com relação ao acetato, não houve produção deste composto durante a fermentação do ensaio E3. Isto é, meio MRS formulado sem adição de acetato. Em relação aos ensaios com adição de acetato em sua composição, houve decréscimo da sua concentração, durante toda a fermentação apenas no ensaio E4, isto é, quando o inóculo também foi proveniente do meio formulado. Neste ensaio o consumo foi de 24% do acetato disponível. Nas fermentações com o MRS comercial (E1) e com o MRS formulado (E2), utilizando MRS comercial como o meio do inóculo, a concentração de acetato aumentou e diminuiu durante a fermentação (Figura 6). Nestes ensaios a concentração final de acetato foi menor do que a inicial.

O consumo de glicose foi mais acelerado nas primeiras 12 horas de fermentação em todos os quatro ensaios, com destaque para E4 com consumo de 80%. Entretanto, no ensaio sem a presença de acetato no meio de cultura (E3) ainda tinha mais do que o dobro de glicose com 12 horas, em relação aos ensaios E2 e E4. Neste mesmo ensaio, apesar da concentração máxima de biomassa ter sido alcançada em menor tempo (12 horas), nesse tempo ainda tinha uma quantidade maior de glicose do que nos outros ensaios. Provavelmente, a ausência de acetato no ensaio E3 reduziu a velocidade de consumo de glicose, impedindo que o crescimento de *L. rhamnosus* fosse prolongado até 24 horas, diferentemente do que foi observado nas fermentações com os meios contendo acetato. Nos ensaios formulados com acetato, E2 e E4, houve um consumo de 98% e 96% da glicose disponível, respectivamente. Isso indica que, apesar dos inóculos diferentes, o consumo de glicose foi semelhante entre os ensaios.

² E1 – MRS comercial; E2 – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_C; E3 – MRS formulado sem acetato e inóculo MRS_F; E4 – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_F.

A produção de ácido láctico foi simultânea ao crescimento, entretanto, a concentração máxima foi obtida com 24 horas apenas quando foi utilizado o meio E1 (19 g/L). Nos outros três ensaios (E2, E3 e E4), este metabólito continuou sendo produzido após a fase exponencial de crescimento, alcançando a concentração máxima com 48 horas. Apesar dos ensaios E2, E3 e E4 serem utilizando meios formulados, apenas no ensaio E3, isto é, sem a presença de acetato, a concentração final de 17,9 g/L, foi menor do que na ensaio E1. Isso indica que a concentração máxima não está atrelada com um maior tempo de fermentação. Nos ensaios E2 e E4, além do maior tempo de produção, as concentrações de 20 g/L de ácido láctico com 48 horas, foram maiores do que aquela obtida no ensaio E1, isto é, com o meio MRS comercial. Logo, E2 e E4 apresentaram as maiores concentrações de ácido láctico dentre os meios formulados do primeiro grupo, independente do inóculo utilizado (MRS_C ou MRS_F).

O pH apresentou um decréscimo semelhante nos quatro ensaios, alcançando um valor final entre 3,5 e 4,0 (Figura 6). Em todos os ensaios, a partir de 24 horas esta variável, praticamente, se manteve constante até o final da fermentação. Isso ocorreu independente da concentração de ácido láctico continuar aumentando durante a fase estacionária nos ensaios E2, E3 e E4. Ao final da fermentação, a maior variação ocorreu em E3. Esta variável é um referencial do metabolismo ativo do microrganismo, isto é, com o crescimento e a produção de ácido láctico, o pH tende a diminuir como um indicativo do aumento da acidez.

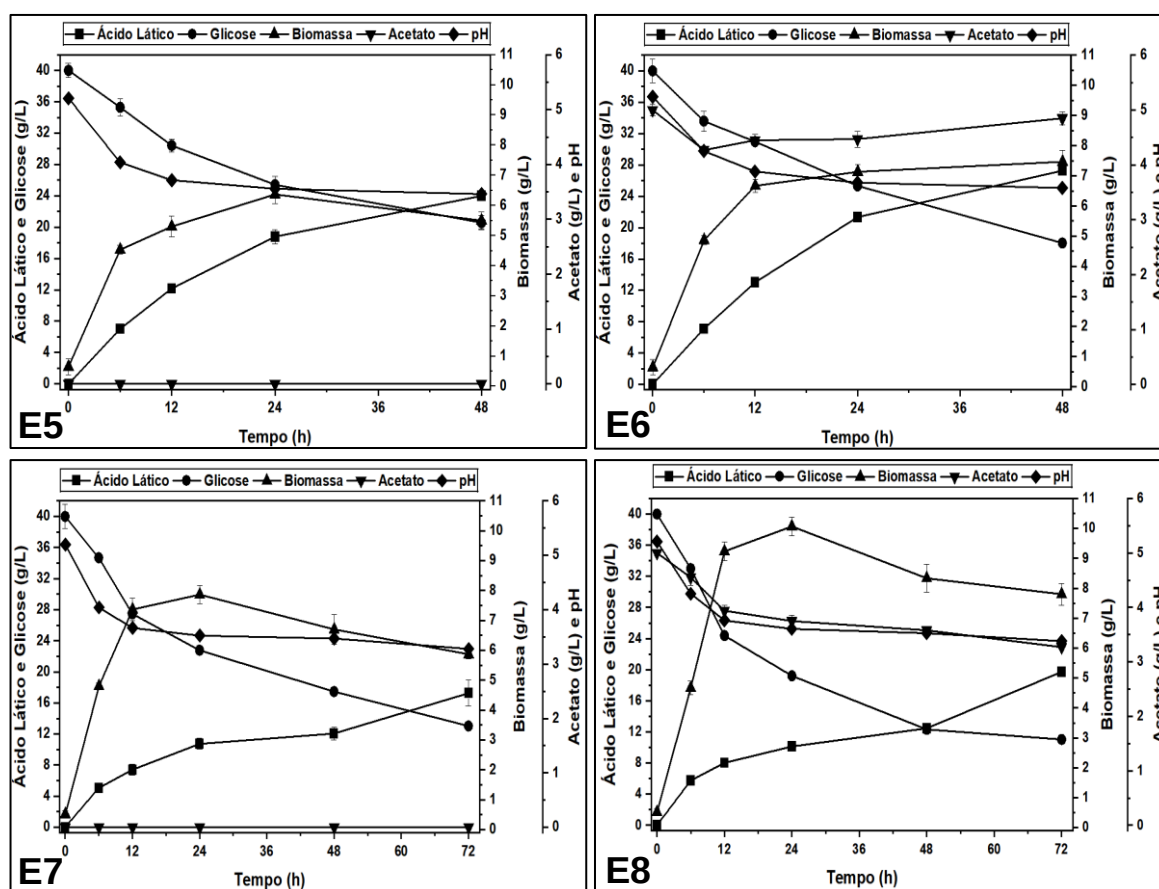
Após a avaliação da influência do acetato no metabolismo fermentativo de *L. rhamnosus* ATCC 7469, também foi investigado os efeitos do aumento das concentrações de carbono (glicose) e de nitrogênio (peptona, extrato de carne e de levedura), variando a razão dos elementos em quatro meios formulados (E5, E6, E7 e E8).

5.2.2. Efeitos do acetato e da variação na razão C/N na fisiologia e metabolismo fermentativo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469

Assim como a influência da presença ou ausência do acetato foi investigada em meios com as mesmas concentrações de fonte de carbono (glicose) e fonte de nitrogênio (peptona, extrato de carne e de levedura), também foram investigados os

efeitos da variação da relação carbono/nitrogênio em meios de cultivo com e sem acetato, como apresenta a Figura 7.

Figura 7. Análise fisiológica de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante as fermentações nos ensaios E5 (Meio MRS formulado sem acetato e C/N de 6,67 g/g), E6 (Meio MRS formulado com acetato e C/N de 6,67 g/g), E7 (Meio MRS formulado sem acetato e C/N de 3,33 g/g) e E8 (Meio MRS formulado com acetato e C/N de 3,33 g/g).³



Conforme apresenta a Figura 7, o aumento da razão C/N para 6,67 g/g e a presença de acetato em E6, afetou positivamente a concentração de biomassa durante todo o período de fermentação em relação aos outros ensaios. Nos ensaios sem a adição de acetato (E5 e E7), o crescimento foi maior quando a razão C/N foi de 3,33 g/g (E7), porém, ambos os ensaios alcançaram a máxima concentração com 24 horas. O aumento da concentração de glicose e nitrogênio, mais a presença de acetato, favoreceu a concentração de biomassa em E8 em relação a E7, resultando

³ **E5** – MRS formulado sem acetato e razão C/N de 6,67 g/g; **E6** – MRS formulado com acetato e razão C/N de 6,67 g/g; **E7** - MRS formulado sem acetato e razão C/N de 3,33 g/g; **E8** - MRS formulado com acetato e razão C/N de 3,33 g/g.

em um crescimento de quase 3 g/L a mais em E8, após 24 horas. Apesar disso, apenas em E6 não foi observada redução, mantendo a concentração de biomassa acima de 7 g/L, com aumento de 91% durante a fermentação.

Os ensaios sem adição de acetato de sódio (E5 e E7), não apresentaram produção de acetato ao longo da fermentação (Figura 7). No ensaio com adição de acetato e razão de 6,67 g/g (E6), foi observada redução na concentração do acetato apenas nas seis primeiras horas de cultivo, sendo essa de 15%. Por outro lado, quando a razão foi mantida em 3,33 g/g, mas com o simultâneo aumento da concentração de carbono e nitrogênio (E8), o acetato foi reduzido durante todo o estudo cinético, havendo redução de 35% de acetato ao final da fermentação. Nestes ensaios com adição de acetato, E6 e E8, a biomassa apresentou comportamento diferente, como aquele observado entre os ensaios sem acetato (E5 e E7). De modo que, após a fase exponencial de crescimento (6h – 12h), nos ensaios sem aumento de nitrogênio (E5 e E6) o crescimento foi menor que o crescimento obtido para E7 e E8, neste mesmo intervalo. Portanto, o comportamento da biomassa foi similar para a mesma razão C/N, isto é, entre os ensaios E5 e E6 e entre E7 e E8 foram observadas as mesmas variações da concentração de biomassa ao longo do período fermentativo.

Analisando a Figura 7, foi possível observar que o consumo de glicose foi mais acentuado nas primeiras 12 horas de fermentação em todos os ensaios. Após 48 horas de cultivo, foi observado um consumo de glicose superior a 77% em E8 e 55% em E6, ambos com adição de acetato e com as maiores concentrações de biomassa. Em E8, ensaio com maior consumo de glicose, *L. rhamnosus* consumiu quase 80% da glicose disponível, indicando alta taxa fisiológica e metabólica do microrganismo nas condições deste ensaio. A ausência de acetato em E5 e E7, influenciou na quantidade de glicose consumida durante a fermentação. Ou seja, nestes ensaios sem acetato, apesar de concentrações de biomassa aproximadas, a concentração de glicose final foi de, aproximadamente, 2 g/L e 4 g/L maior nos ensaios E5 e E7, em comparação com E6 e E8, respectivamente (Figura 7).

A concentração de ácido láctico aumentou paralelamente ao consumo de glicose, e foi influenciada pela presença do acetato e variação da razão C/N. Em E5 e E6, após 48 horas, as concentrações de ácido láctico foram superiores a 24 g/L e 27 g/L, respectivamente (Figura 7). Essas concentrações foram quase duas vezes maiores do que as obtidas para E7 e E8 no mesmo intervalo de tempo. Isto é, mesmo apresentando um rápido crescimento e alto consumo de glicose, a produção de lactato

em E7 e E8 foi bem menor do que a obtida para E5 e E6. Logo, o aumento na concentração de nitrogênio nos meios afetou a velocidade de produção de ácido láctico, já que as maiores concentrações do ácido em E7 e E8 foram observadas após 72h de fermentação. Sendo assim, constatou-se que uma maior concentração de nitrogênio no meio não beneficiou a produção de lactato em *L. rhamnosus* ATCC 7469, desviando a rota metabólica para uma maior síntese de biomassa (Figura 7).

O pH apresentou comportamento semelhante nos ensaios com acetato (E6 e E8) e nos ensaios sem acetato (E5 e E7) do grupo 2. Durante as primeiras 12 horas de cultivo, o pH em todos os ensaios reduziu rapidamente e, após esse intervalo, manteve-se constante entre 3,2 e 3,9 (Figura 7). As reduções no pH foram mais acentuadas nos ensaios com aumento na concentração de nitrogênio, independentemente da presença ou ausência de acetato (E7 e E8). A acentuada diminuição do pH nesses ensaios está atrelada ao rápido e expressivo crescimento de *L. rhamnosus*, em comparação com E5 e E6 que, mesmo apresentando altas concentrações de ácido láctico, apresentaram pH acima do obtido em E7 e E8.

De forma comparativa, foi realizada uma análise entre os grupos 1 e 2 e a literatura, avaliando os efeitos da adição de acetato e de maiores concentrações de carbono e nitrogênio, variando a razão C/N dos meios de produção.

5.2.3. Avaliação da presença e ausência do acetato e influência da variação na razão de C/N nos aspectos fisiológicos de *L. rhamnosus* ATCC 7469 durante a fermentação

Neste estudo, a influência da presença do acetato na fisiologia de *L. rhamnosus* foi estudada e seus efeitos foram postulados como positivos. Os efeitos do acetato de sódio nas características fisiológicas de *Lacticaseibacillus* ainda estão pouco elucidados na literatura, devido à escassez de trabalhos que abordem o tema. Mas, conforme Silva *et al.* (2019), metabolicamente o acetato é um constituinte para a biossíntese de lipídeos, ou seja, está diretamente ligado à produção de células bacterianas, sendo assimilado como fonte de carbono durante a fase de crescimento dos microrganismos. Além disso, comporta-se como um regulador de mecanismos de detecção de quórum, resultando no aumento da produção de metabólitos secundários em *L. rhamnosus*, como as bacteriocinas (Meng *et al.*, 2021).

Comparando os dois grupos (Figuras 6 e 7), foi verificado que o crescimento microbiano e o consumo de glicose foram maiores nos meios formulados com acetato, independentemente do aumento das concentrações de carbono ou nitrogênio. Isto é, ao final da fermentação, os ensaios formulados com acetato (E2, E4, E6 e E8) mantiveram concentrações de biomassa superiores a 6 g/L, ao contrário dos ensaios sem acetato (E3, E5 e E7). Nesses meios com acetato, foram observados consumos de glicose acima de 70%. Assim, de modo geral, o acetato induziu a assimilação de glicose, equilibrando a resposta fisiológica para produção láctica e síntese de biomassa nos ensaios com acetato, em especial os ensaios com 40 g/L de glicose. De maneira similar, Silva *et al.* (2019) observaram que a adição de 40 g/L de glicose no meio MRS, em comparação a 20 g/L, promoveu maior crescimento de *L. vini* JP7.8.9 após 24 horas de fermentação. A razão C/N usada no estudo citado foi a mesma dos ensaios E5 e E6, e o meio MRS continha acetato em sua composição.

O acetato de sódio pode ser utilizado para aumentar e melhorar o crescimento e metabolismo das bactérias ácido lácticas, sendo usado para geração de energia (Wang *et al.*, 2020). A assimilação do acetato por meio das BAL ocorre através da conversão de acetato em acetil-CoA, que poderá ser utilizada na produção de intermediários metabólicos e energia para as células (Hosmer *et al.*, 2024). Além dessas funções, o acetato está associado a adesão e sobrevivência de bactérias ácido lácticas (Kimoto-Nira *et al.*, 2016), pode ser precursor para produção de antibióticos, como a Ketamicina (Zheng *et al.*, 2019) e regulador de atividades enzimáticas (Meng *et al.*, 2021).

Contudo, nem sempre o acetato será consumido pelas bactérias, como foi observado nas fermentações dos ensaios E1, E2 e E6. Esses resultados indicam que *L. rhamnosus* não assimila acetato como fonte de carbono quando há glicose, sua principal fonte de carbono, e que a presença do sal orgânico no meio não promoveu diretamente o seu crescimento. Esse mecanismo é chamado de repressão catabólica de carbono (CCR) e foi relatado em bactérias do ácido láctico (Filimon *et al.*, 2024). De maneira semelhante, Jyoti *et al.* (2003) observaram que em meio de cultivo com glicose e acetato, as células de *L. rhamnosus* ATCC 7469 preferiram consumir somente a glicose como fonte de carbono, acumulando acetato no meio.

Assim como o acetato, a concentração de carbono e nitrogênio pode influenciar nas características fermentativas de bactérias ácido lácticas. As maiores concentrações de biomassa foram observadas nos ensaios com maiores

concentrações de nitrogênio (E7 e E8). O mesmo padrão foi observado por Liew *et al.* (2005), que relataram que a adição de maiores concentrações de extrato de levedura promoveu o crescimento de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 durante 24 horas de cultivo em meio MRS. Jafarpour *et al.* (2021) observaram que o aumento na concentração de extrato de levedura, variando a relação C/N, elevou a concentração celular de *L. rhamnosus* PTCC 1637 e a produção de ácido láctico durante o cultivo. Logo, a adição de fontes de nitrogênio, especialmente do extrato de levedura, favorece os aspectos fisiológicos e metabólicos de *Lactocaseibacillus*.

De maneira semelhante à adição isolada de fontes de nitrogênio, a variação na concentração de diferentes fontes de nitrogênio, como neste estudo, também pode estimular o crescimento de bactérias ácido lácticas, como foi observado para *L. rhamnosus* NBIMCC 1013 quando foi aumentado a concentração de extrato de carne e extrato de levedura no meio (Kostov *et al.*, 2011). No entanto, altas concentrações de carbono e nitrogênio podem reprimir o crescimento de bactérias ácido lácticas, a depender da concentração adicionada (Coelho *et al.*, 2011), mesmo que o crescimento microbiano seja sustentado pela utilização de fontes de nitrogênio devido à deficiência em vias biossintéticas (Abbasiliasi *et al.*, 2016). Maryanty *et al.* (2021), observaram que concentrações iguais ou superiores a 70% de glicose inibem o crescimento de *L. rhamnosus* em meio MRS. Quanto ao nitrogênio, não foram encontrados estudos recentes que indiquem o limiar de N suportado por espécies do gênero *Lactocaseibacillus*.

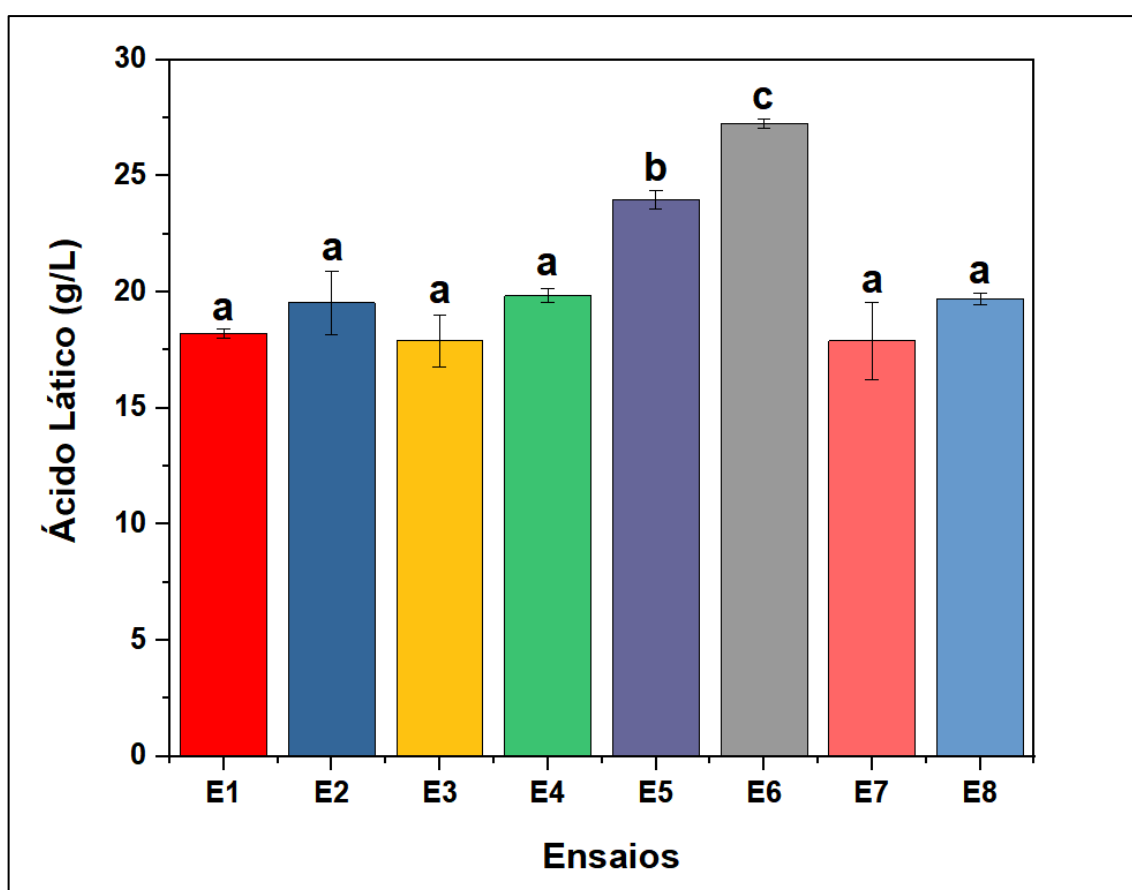
De maneira semelhante à concentração de biomassa, a concentração de ácido láctico também foi maior nos meios formulados com acetato, porém aqueles que também tiveram aumento na concentração de nitrogênio foram influenciados negativamente. Ou seja, a ausência do acetato (E7) mais uma maior concentração de nitrogênio (E8) afetaram a produção do ácido láctico, quando comparados com E5 e E6. De maneira geral, no meio com acetato e sem aumento de nitrogênio (E6), *L. rhamnosus* produziu até 9 g/L a mais de ácido láctico.

O aumento das concentrações de ácido láctico acompanhou o consumo de glicose, indicando que este é o principal subproduto fermentativo de *L. rhamnosus*. De acordo com Suissa *et al.* (2023), a produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* é induzida pela presença da glicose no meio, especialmente quando há outra fonte de carbono disponível, como o acetato de sódio. Apesar do maior consumo de glicose após 48h de fermentação nos ensaios com aumento simultâneo de carbono e

nitrogênio (E7 e E8), as concentrações finais de ácido láctico foram inferiores às observadas nos ensaios com apenas aumento de carbono (E5 e E6), e até mesmo em comparação com meio comercial (E1) e seu similar (E2). Este fato, possivelmente, pode estar atrelado ao efeito inibitório de uma maior concentração de nitrogênio na formação de lactato.

Embora a concentração de ácido láctico fosse maior nos meios com acetato, não houve diferença estatística significativa entre os ensaios do grupo 1 ($p < 0,05$), mas houve diferença significativa entre os ensaios do grupo 2 ($p > 0,05$) (Figura 8).

Figura 8. Análise estatística das concentrações de ácido láctico (g/L) nos oito ensaios (E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7 e E8)⁴ usados na fermentação com *L. rhamnosus* ATCC 7469, determinada pelo teste Tukey com nível de significância de 95%.



a, b e c Letras distintas indicam médias significativamente diferentes entre os ensaios ($p < 0,05$).

⁴ **E1** – MRS comercial; **E2** – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_C; **E3** – MRS formulado sem acetato e inóculo MRS_F; **E4** – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_F; **E5** – MRS formulado sem acetato e razão C/N de 6,67 g/g; **E6** – MRS formulado com acetato e razão C/N de 6,67 g/g; **E7** – MRS formulado sem acetato e razão C/N de 3,33 g/g; **E8** – MRS formulado com acetato e razão C/N de 3,33 g/g.

Nos ensaios do grupo 2 (E5, E6, E7 e E8) foi observada uma maior disparidade nos valores das concentrações de ácido láctico, em comparação ao grupo 1. Isto é, os ensaios do grupo 1 diferiam entre si apenas pela presença ou ausência de acetato e pelo tipo de inóculo, que não apresentaram efeitos significativos (Figura 8). Os ensaios E5 e E6 apresentaram diferença estatisticamente significativa dos demais ensaios, tanto do grupo 1 quanto do grupo 2 ($p < 0,05$). Contudo, no geral, apresentando ou não diferença estatisticamente significativa, todos os ensaios apresentaram concentrações de ácido láctico dentro e, até mesmo, acima do observado para *L. rhamnosus* cultivado em meio MRS (Mesquita *et al.*, 2017).

L. rhamnosus ATCC 7469 é um produtor promissor de ácido láctico, especialmente do isômero ácido L – Lático. Nagarajan *et al.* (2022), observaram que em meio a MRS modificado com 40 g/L de glicose, e mesma razão C/N dos ensaios E5 e E6, *L. rhamnosus* apresentou uma produção de apenas 20 g/L de ácido láctico. Mesquita *et al.* (2017) observaram que em meio MRS comercial, contendo 20 g/L de glicose, o maior metabólito produzido por *L. rhamnosus* ATCC 9595 foi o ácido L – Lático, apresentando uma produção máxima de 23 g/L após 72 horas. Em nosso estudo, *L. rhamnosus* alcançou concentrações acima de 19 g/L de ácido láctico em 48 horas de fermentação (E2 e E4) e, quando foi adicionado mais glicose, este valor superou 27 g/L de ácido láctico produzido (E6), destacando sua promissora capacidade de produção em um intervalo de tempo reduzido (48h).

Segundo Lino *et al.* (2001), a produção de ácido láctico e o tipo de isômero produzido estão fortemente relacionados à presença de acetato de sódio no meio. Isto é, a presença do acetato de sódio durante a fermentação promoveu uma maior expressão da enzima L-lactato dehydrogenase, responsável pela conversão da glicose em ácido L – Lático.

Ao comparar o crescimento de bactérias ácido lácticas em meio com e sem acetato de sódio, Lino *et al.* (2001) observaram que, das 49 linhagens testadas, 23 cresceram exponencialmente e produziram quase o dobro de ácido láctico na presença do acetato. Entre essas espécies estava *L. rhamnosus*. Segundo Khor *et al.* (2016), a adição do acetato favorece a rota de produção de ácido láctico através do direcionamento do pH do meio para sua capacidade tampão ácido, favorecendo a adequabilidade do organismo ao meio. Assim, esses achados justificam a influência do acetato na fisiologia de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469, além de seus

impactos no consumo de glicose e na produção de ácido lático, a partir de uma regulação metabólica e seu papel nas condições físico-químicas, como o pH.

Um dos mais importantes parâmetros de avaliação do potencial fisiológico de bactérias ácido lácticas é o pH, pois sua variação pode estar diretamente atrelada à alta taxa metabólica. Em relação ao pH, em todos os ensaios sem adição de acetato (E3, E5 e E7), houve maior variação neste parâmetro, em comparação aos demais meios. Nestes ensaios o pH baixou até 3,2. De acordo com Song *et al.* (2022), uma maior concentração de nitrogênio influencia diretamente o pH dos meios, provocando uma maior acidificação e, conseqüentemente maior estresse às bactérias, reduzindo o metabolismo e sobrevivência dos microrganismos. O pH nos ensaios E7 e E8 apresentou este comportamento, ocasionando numa maior redução na concentração de biomassa. Desse modo, é possível que uma menor concentração de nitrogênio possa aumentar a tolerância aos estresses ambientais por *Lacticaseibacillus*, aumentando sua sobrevivência em meios formulados (Zhang *et al.*, 2022).

Ainda mais, uma maior variação do perfil de pH nos ensaios sem acetato pode estar intimamente relacionada à ausência do acetato. Isto é, o acetato de sódio geralmente é usado como tampão em meios de crescimento, visando manter o equilíbrio do pH (Kimoto-Nira *et al.*, 2016; Hayek *et al.*, 2019). Este equilíbrio é crucial para os processos fisiológicos, vias metabólicas e atividade enzimática (Song *et al.*, 2022). Estudos recentes mostraram que os valores de pH ideais para crescimento bacteriano e produção de metabólitos variam de 3,5 a 9,6, a depender da espécie e linhagem do microrganismo (Krishna *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2022). Em seu estudo, Wang *et al.* (2020) observaram que nas primeiras 4 horas de cultivo com *L. rhamnosus* LS-8, o pH do meio MRS declinou de 6,2 para 4,8, mesma variação observada neste estudo, após 6 horas de fermentação.

Na rota metabólica, o acetato é produzido por oxidação do acetaldeído pela enzima acetaldeído desidrogenase (ACDH) NAD(P)⁺ dependente (Teles *et al.*, 2023). Este aparato enzimático está presente em *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469. Logo, *L. rhamnosus* é caracterizado como microrganismo heterofermentativo devido à possível produção simultânea de lactato (ácido lático) e ácido acético (Abdel-Rhaman *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2018). Contudo, diferentemente do observado na literatura, em todos os meios formulados, independente da concentração de glicose e de nitrogênio, *L. rhamnosus* seguiu a rota homofermentativa ou homolática. Isto é, não houve produção de acetato ou outro composto metabólico, além do ácido lático, seu

principal metabólito produzido após a metabolização da glicose. Esses resultados foram observados comparando a concentração de acetato inicial e final de cada ensaio.

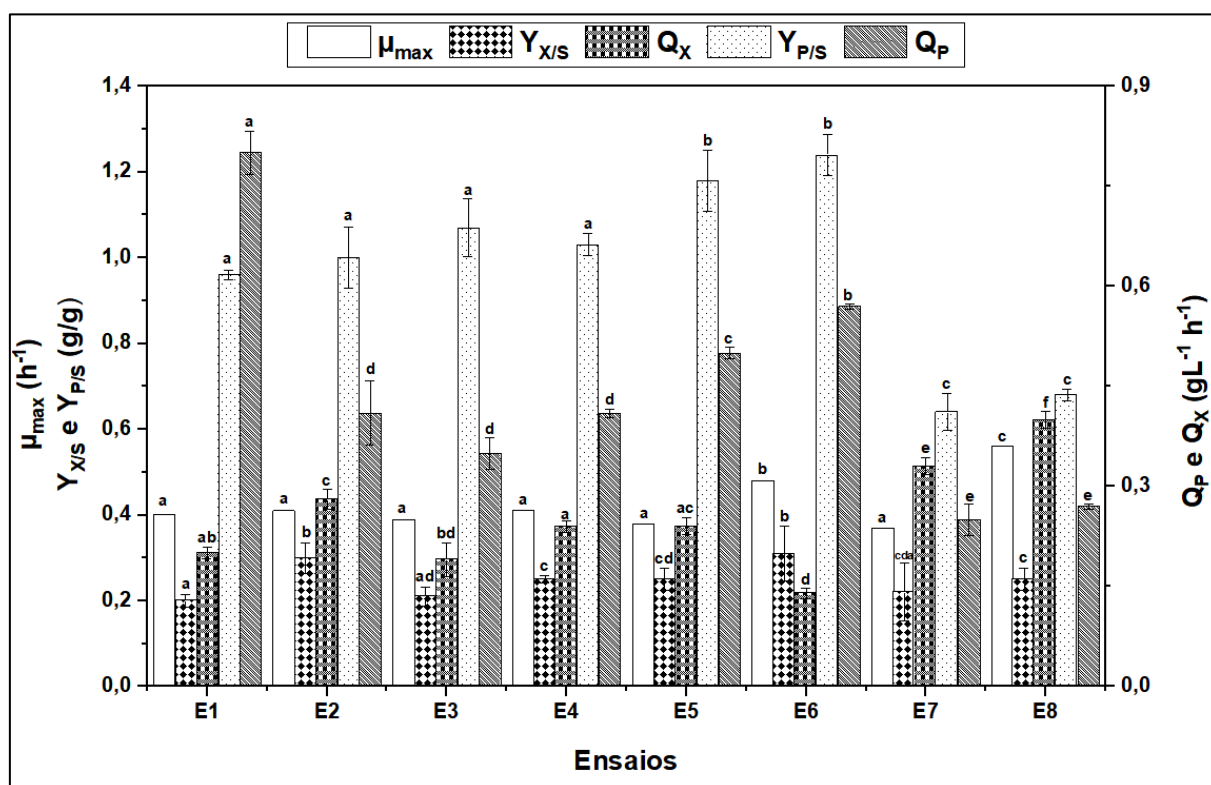
O gênero *Lacticaseibacillus* apresenta uma enorme variabilidade metabólica, a qual pode ser observada até mesmo dentro da mesma espécie (Silva *et al.*, 2019). Bintsis (2018), explica que a produção do acetato ou ácido acético por *Lactobacillaceae* heterofermentativos, como *L. rhamnosus*, ocorre quando o meio apresenta baixas concentrações de glicose, a partir do metabolismo do piruvato. No entanto, mesmo em baixas concentrações de glicose, ao final da fermentação, não foi observada produção de acetato por *L. rhamnosus*, evidenciando a variabilidade metabólica da espécie.

No geral, observou-se que a ausência de acetato teve efeitos negativos nos aspectos fisiológicos de *L. rhamnosus*, enquanto que o aumento das fontes de nitrogênio apresentou efeitos mistos (positivos e negativos), promovendo um maior crescimento celular, mas reduzindo a produção de ácido láctico. Portanto, são necessários mais estudos que investiguem como diferentes composições químicas do meio influenciam nas características fisiológicas e metabólicas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* durante a fermentação.

5.3. PARÂMETROS CINÉTICOS DA FERMENTAÇÃO COM *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469

A Figura 9 apresenta os valores médios dos parâmetros cinéticos velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$), rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$), produtividade volumétrica máxima de biomassa (Q_X), rendimento em produto ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica máxima do produto (Q_P) durante a fermentação dos diferentes meios de cultivo por *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Figura 9. Parâmetros cinéticos ($\mu_{\max}$, $Y_{X/S}$, Q_X , $Y_{P/S}$ e Q_P) dos ensaios com *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469.



a, b, c, d, e, f Parâmetros com letras diferentes para mesma variável nos diferentes ensaios diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).⁵

Como apresenta a Figura 9, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi semelhante para todos os meios, exceto para E6 (MRS formulado com acetato e razão C/N de 6,67 g/g) e E8 (MRS formulado com acetato e C/N de 3,33 g/g), com valores de 0,5 h⁻¹ e 0,6 h⁻¹, respectivamente, ambos apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos demais. Nos demais ensaios, o $\mu_{\max}$ foi de aproximadamente 0,4 h⁻¹. Ainda, embora o crescimento microbiano tenha sido maior em E7, a velocidade específica máxima de crescimento foi similar à dos outros ensaios. Na literatura, autores como, Wang *et al.* (2020), observaram um $\mu_{\max}$ de 0,35 h⁻¹ para *L. rhamnosus* LS-8 em estudo fermentativo. Kostov *et al.* (2011) relataram um $\mu_{\max}$ de 0,51 h⁻¹ para *L. rhamnosus* em meio MRS, ambos corroborando com os resultados deste estudo.

⁵ **E1** – MRS comercial; **E2** – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_C; **E3** – MRS formulado sem acetato e inóculo MRS_F; **E4** – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_F; **E5** – MRS formulado sem acetato e razão C/N de 6,67 g/g; **E6** – MRS formulado com acetato e razão C/N de 6,67 g/g; **E7** – MRS formulado sem acetato e razão C/N de 3,33 g/g; **E8** – MRS formulado com acetato e razão C/N de 3,33 g/g.

O rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$) foi semelhante entre alguns ensaios, com E6, E2, E4, E5 e E8 apresentando os maiores valores (0,3 g/g), seguidos por E1, E3 e E7 (0,2 g/g), com os menores valores de rendimento em biomassa. Esses valores foram menores do que o observado para *L. rhamnosus* LS-8 (0,5 g/g) por Wang *et al.* (2020), durante processo fermentativo, porém semelhante à *L. casei*, que em meio MRS modificado, apresentou rendimentos em biomassa de 0,28 a 0,29 g/g (Chasoy *et al.*, 2020). *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T, um microrganismo também herefermentativo facultativo cultivado em MRS, apresentou um $Y_{X/S}$ de 0,17 g/g a 0,23 g/g após 26 h de fermentação (Slavica *et al.*, 2015).

As produtividades máximas em biomassa (Q_x) foram maiores em E8 e E7, com valores de 0,4 gL⁻¹ h⁻¹ e 0,33 gL⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Esses valores são resultados de uma maior produção de células em um intervalo menor (24 horas). O menor valor para Q_x foi observado em E6 (0,14 gL⁻¹ h⁻¹), pois o crescimento do microrganismo neste ensaio continuou até 48h de cultivo (Figura 7).

Em termos de rendimentos em ácido láctico ($Y_{P/S}$), foi observada uma maior variação nos valores obtidos, e essa variação está diretamente relacionada à razão C/N. Isto é, quando houve aumento da razão C/N para 6,67 g/g, o ensaio E6 (MRS formulado com acetato e 40 g/L de glicose), apresentou o maior rendimento em produto ($Y_{P/S}$ = 1,24 g/g), seguido do ensaio E5 ($Y_{P/S}$ = 1,18 g/g), como mostra a Figura 9. Nestes ensaios, foram observadas as maiores concentrações de ácido láctico durante a fermentação (Figura 7).

Por outro lado, quando a razão C/N foi de 3,33 g/g, foram observados comportamentos diferentes. Ou seja, para os ensaios do grupo 1 (E1, E2, E3 e E4), foram observados valores intermediários para $Y_{P/S}$, variando de 1,07 g/g a 0,96 g/g. Contudo, quando a razão C/N foi mantida em 3,33 g/g, pela adição de maiores concentrações das fontes de carbono e nitrogênio nos ensaios E8 e E7, foram observados valores inferiores a 0,9 g/g (0,68 g/g e 0,64 g/g). Embora os resultados de rendimento em ácido láctico variem, todos os valores obtidos estão em conformidade com os observados para *L. rhamnosus* e espécies do gênero *Lacticaseibacillus*.

Li *et al.* (2010), obtiveram um rendimento de 0,99 g/g de ácido láctico usando *L. rhamnosus* LA-04-1, em um meio com alta concentração de fonte de carbono (> 60 g/L) e nitrogênio (> 30 g/L). Em contrapartida, Wang *et al.* (2010), observaram rendimentos em ácido láctico de 0,67 a 0,86 g/g para *L. rhamnosus* CASL. Para outras espécies heterofermentativas facultativas, como *L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM

20004^T, também foi observado um rendimento de 0,68 g/g, após 26 horas de fermentação em meio MRS (Slavica *et al.*, 2015). Em todos esses estudos, os rendimentos obtidos vão de encontro aos observados para *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Outras espécies de *Lacticaseibacillus*, incluindo espécies homofermentativas, apresentam rendimentos semelhantes quando são cultivadas em meio MRS formulado. Como exemplo disto, Silva *et al.* (2019) observaram rendimentos de 0,70 g/g a 0,76 g/g para *L. vini* JP7.8.9 após 48h de fermentação em MRS formulado. Chasoy *et al.* (2020) observaram um rendimento superior a 1,2 g/g em meio MRS formulado com 20 g/L de lactose como fonte de carbono, fermentado por *L. casei*.

Ainda em relação ao ácido láctico, mas em termos de produtividade máxima, o maior valor para este parâmetro foi observado no ensaio E1 ($Q_P = 0,8 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$), meio comercial. Este achado resulta do menor tempo de produção (24 horas), enquanto os outros ensaios levaram 48 horas para apresentar a máxima concentração de ácido láctico. Assim como foi observado nos valores de $Y_{P/S}$, os menores valores para Q_P , $0,27 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,25 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, foram observados em E8 e E7, respectivamente (Figura 9). Em termos de produtividade máxima volumétrica, pode ser observado na literatura uma grande variação neste parâmetro, devido, principalmente, às condições do meio e sua composição. No geral, são observados valores que variam de $0,37 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Cui *et al.*, 2011) a $4,23 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Nagarajan *et al.*, 2022) para a espécie *L. rhamnosus*.

Quando comparada a outras espécies de *Lacticaseibacillus*, *L. rhamnosus* apresenta uma maior capacidade de produção de ácido láctico, produzindo até 2,9 vezes mais ácido láctico que outras espécies do mesmo gênero e apresentando uma taxa de conversão de 95% (Granget *et al.*, 2024) a 99% (Lee *et al.*, 2024). Logo, observa-se a notável capacidade do microrganismo converter quase todo açúcar disponível em ácido láctico.

No ensaio com maior rendimento de ácido láctico (E6), em termos percentuais (considerando os valores das concentrações iniciais de glicose e finais de ácido láctico), houve uma conversão acima de 99% da glicose disponível em ácido láctico, indicando que a glicose consumida ($\sim 22 \text{ g/L}$) foi predominantemente direcionada ao metabolismo láctico. De maneira diferente deste trabalho, *L. vini*, um microrganismo homofermentativo, em meio MRS formulado converteu 70% da glicose em lactato, destinando o restante do açúcar para produção de energia, através de NADPH (Silva *et al.*, 2019), o que pode ter ocorrido com *L. rhamnosus* ATCC 7469.

Por ser considerado uma espécie heterofermentativa facultativa, *L. rhamnosus* ATCC 7469 apresentaria um rendimento teórico máximo de 0,5 g/g a 0,9 g/g de ácido láctico por grama de glicose (Miller *et al.*, 2017; Bintsis, 2018). Neste estudo, *L. rhamnosus* seguiu predominantemente a rota homofermentativa nas condições impostas, apesar de apresentar rendimento típico de um microrganismo heterofermentativo, uma vez que apenas a produção de ácido láctico foi detectada. Bactérias homofermentativas podem produzir até 2 mol de ácido láctico por mol de glicose durante a fermentação (Djukic-Vukovic *et al.*, 2019), apresentando rendimentos acima de 1 g/g.

Em relação aos efeitos da adição de maiores concentrações de carbono e nitrogênio, os ensaios E7 e E8 apresentaram baixas produtividades volumétricas de ácido láctico, mesmo apresentando um alto consumo da glicose (> 26 g/L) como mostra a Figura 7. De maneira similar, Lu *et al.* (2010), observaram que quanto maior a concentração de carbono e nitrogênio no meio contendo *L. rhamnosus* HG09, menor a produtividade volumétrica de ácido láctico, devido ao efeito repressor desses nutrientes. Ainda conforme Lu *et al.* (2010), altas concentrações de nitrogênio e carbono podem exercer um efeito tóxico para as células bacterianas, inibindo suas atividades enzimáticas e, conseqüentemente, o metabolismo láctico dos microrganismos.

No geral, os ensaios E6 (meio formulado com acetato e a mesma variação na razão C/N que E5), e E2 (MRS formulado) foram considerados ideais para o crescimento e produção de ácido láctico por *L. rhamnosus*, devido aos seus maiores rendimentos, produtividades em produto e velocidade específica máxima de crescimento. Diante do exposto, os meios formulados com acetato mostraram-se adequados para o crescimento celular e produção de ácido láctico por *L. rhamnosus* ATCC 7469, apresentando rendimentos de biomassa e produto satisfatórios ao longo da fermentação.

Chang e Liew (2013) observaram que, embora o meio MRS seja comumente utilizado para o cultivo de bactérias ácido lácticas, diferentes linhagens de *Lactocaseibacillus* possuem necessidades nutricionais específicas. Portanto, a formulação e otimização de meios de cultivo pode maximizar parâmetros fermentativos na indústria, resultando em maiores rendimentos e produtividades volumétricas.

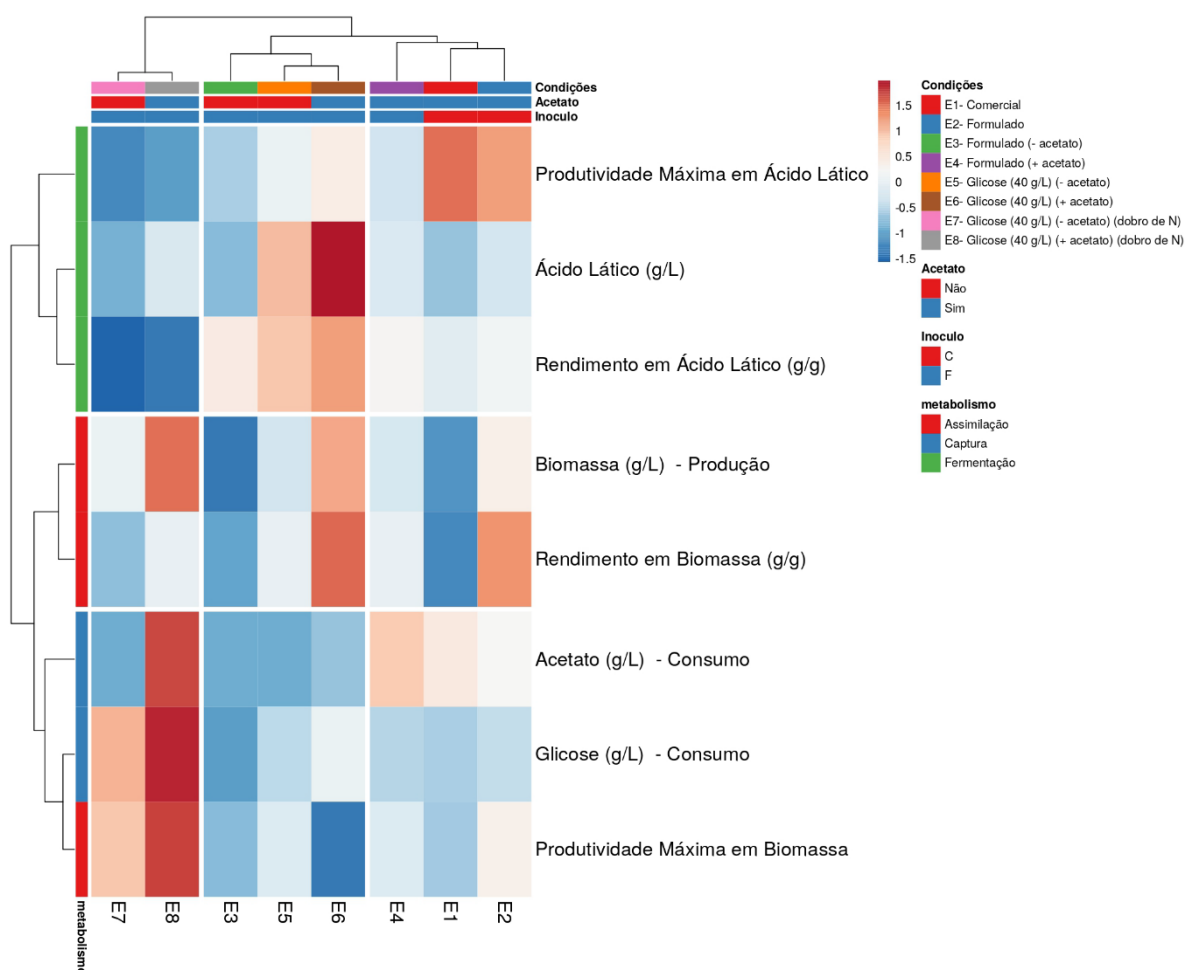
5.4. ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO DOS ENSAIOS E PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469

A ferramenta Clustvis permite diversas análises de um conjunto de dados multivariados provenientes de ensaios nas mais diferentes vertentes. No presente trabalho, essas análises foram realizadas utilizando resultados gerados a partir dos oito cultivos utilizando a bactéria *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 e com o objetivo de caracterizar fisiologicamente esse microrganismo com potencial biotecnológico. A utilização do mapa de calor promove inferência da formação de grupos semelhantes ou distintos (Metsalu e Vilo, 2015).

A Figura 10 apresenta a análise de clusterização dos ensaios e parâmetros fisiológicos de *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 durante a fermentação nos meios comercial e formulados⁶.

Figura 10. Análise de clusterização de dados multivariados através de mapa de calor de oito ensaios de cultivos da bactéria *Lacticaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469. Ensaios de cultivo são mostrados na legenda da figura. Ausência de acetato inicial (não), presença de acetato inicial (sim). Inóculo proveniente do meio comercial (C), inóculo proveniente do meio formulado (F). Parâmetros fisiológicos relacionados ao metabolismo de captação, assimilação e fermentação.

⁶ **E1** – MRS comercial; **E2** – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_C; **E3** – MRS formulado sem acetato e inóculo MRS_F; **E4** – MRS formulado com acetato e inóculo MRS_F; **E5** – MRS formulado sem acetato e razão C/N de 6,67 g/g; **E6** – MRS formulado com acetato e razão C/N de 6,67 g/g; **E7** - MRS formulado sem acetato e razão C/N de 3,33 g/g; **E8** - MRS formulado com acetato e razão C/N de 3,33 g/g.



Nesse sentido, os dados foram agrupados com a formação de três clusters (Figura 10). Os resultados de produção e rendimento de biomassa se agruparam, mostrando uma relação entre os valores (Figura 10). Isto é, os ensaios que apresentaram as maiores concentrações de biomassa durante a fermentação, também mostraram maiores rendimentos em biomassa. Isso mostrou uma característica interessante na fisiologia desse microrganismo e reflete o agrupamento em questão. Por conseguinte, é formado um cluster de produção, rendimento e produtividade máxima em ácido láctico, o que mostra que esses parâmetros são bem particulares no metabolismo da bactéria, e a relação constante entre o tempo de produção e o rendimento em ácido láctico. Por fim, formou-se um cluster relacionando os dados de consumo de glicose, consumo de acetato e produtividade volumétrica máxima em biomassa.

O resultado apresentado acima comprova a relação intrínseca entre os consumos dessas fontes de carbono e o tempo que o microrganismo leva para direcionar esse carbono para produzir biomassa. De maneira que, o fluxo do

metabolismo central e/ou a presença de outras fontes de carbono que são assimiladas por *L. rhamnosus* pode impactar nessa relação. Em outros microrganismos, a análise de clusterização indicou a relação entre o consumo de açúcar e o direcionamento do carbono para produção de acetato, como foi o caso da levedura *Dekkera bruxellensis* em ensaios fermentativos (Teles *et al.*, 2022). Em relação aos ensaios, os cultivos MRS comercial (E1), MRS formulado (E2) e MRS formulado (+ acetato) (E4) mostraram uma homogeneidade entre eles e formaram um grupo. De fato, estes ensaios compreendem a mesma composição de meio e a única diferença é que em E4 o inóculo foi proveniente do meio formulado. Portanto, neste caso, a mudança de inóculo manteve as respostas fisiológicas uniformes, com destaque para o que ocorreu na produção de ácido láctico, consumo de glicose e rendimento de ácido láctico entre esses ensaios (Figura 9).

Outro agrupamento aconteceu com os ensaios formulados (– acetato) (E3), 40 g/L de glicose (– acetato) (E5) e 40 g/L de glicose (+ acetato) (E6). Isso mostra que esses ensaios são metabolicamente semelhantes. É importante salientar que os agrupamentos não indicam que os ensaios são iguais, mas que houve um comportamento uniforme entre eles. Nesse cluster (E3, E5 e E6), por exemplo, existiu um consumo de glicose próximo entre os ensaios: 16,8 g/L, 19,43 g/L e 21,97 g/L, respectivamente (Figuras 6 e 7). Ou seja, mesmo com o dobro de glicose utilizada (E5 e E6), *L. rhamnosus* não conseguiu manter a proporção de consumo. Isso pode representar um limiar de consumo, mesmo com altas concentrações de glicose, mas necessita de um estudo mais aprofundado.

Subsequentemente, os ensaios com 40 g/L de glicose (– acetato) e dobro de fonte de nitrogênio (E7) e 40 g/L de glicose (+ acetato) e dobro de fonte de nitrogênio (E8) se agruparam. De fato, esses ensaios com o dobro de fonte de carbono e o dobro de fonte de nitrogênio variaram uniformemente. Entre os ensaios, E7 e E8 apresentaram o maior consumo de glicose (27,01 g/L e 30,94 g/L), resultado que pode indicar uma relação direta entre a concentração de nitrogênio e o consumo da fonte de carbono, uma vez que a diferença entre E7 e E8 e E5 e E6 é a concentração de nitrogênio. Apesar do maior consumo de carbono em E7 e E8, o nível de produção de ácido láctico refletiu menores rendimentos (0,64 g/g e 0,68 g/g) e produtividade volumétrica ($0,25 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,27 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) do composto, respectivamente, nesses ensaios em comparação aos demais. Portanto, de acordo com esta análise, o aumento da concentração de glicose e da fonte de nitrogênio não representou uma

melhora no metabolismo fermentativo de *L. rhamnosus* ATCC 7469 e sim uma queda nesses parâmetros.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram que os meios formulados são ideais para a fermentação, destacando-se pelos promissores rendimentos de biomassa, ácido láctico e produtividades volumétricas ao longo da fermentação. O crescimento de *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi maior em meios com acetato, com concentração de biomassa acima de 6 g/L e produção de ácido láctico superior a 27 g/L, mantendo-se mesmo em pH baixo (~ 4,2). No ensaio com razão C/N de 6,67 g/g e presença de acetato (E6), a eficiência na produção de ácido láctico e biomassa foi máxima. Nos ensaios com aumento na concentração de nitrogênio a produção de ácido láctico foi reduzida em 30%. Em contrapartida, a combinação de uma maior concentração de nitrogênio com a presença do acetato (E8), aumentou a concentração de biomassa em 30% e o consumo de glicose em 18%, além de melhorar a velocidade específica máxima de crescimento e a produtividade volumétrica. Em todos os ensaios com a razão C/N de 3,33 g/g, *L. rhamnosus* manteve a produção de ácido láctico na mesma proporção (19 g/L) sem diferenças estatisticamente significativas. A análise de clusterização revelou perfis metabólicos semelhantes entre os ensaios, apesar das variações em composição química e condições fermentativas. *L. rhamnosus* seguiu predominantemente uma rota homofermentativa, convertendo glicose em ácido láctico. Estudos futuros são necessários para aprofundar o entendimento do perfil metabólico e fisiológico de *L. rhamnosus* ATCC 7469.

REFERÊNCIAS

- ABBASILIASI, S. *et al.* Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: a review. **RSC Advances**, v. 7, 2017.
- ABDEL-NASSER, A. *et al.* Extraction and characterization of bioactive secondary metabolites from lactic acid bacteria and evaluating their antifungal and antiaflatoxic activity. **Biotechnology Reports**, v. 38, 1 jun. 2023.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**. v. 156, p. 286-301, 2011.
- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**. v. 31, p. 877-902, 2013.
- ABEDI, E.; HASHEMI, S. M. B. Lactic acid production – producing microorganisms and substrates sources-state of art. **Heliyon**. v. 6, e04974, 2020.
- AIDER-KACI, F. A.; AIDARBEOVA, S.; AIDER, M. Impact of electro-activated whey on growth, acid and bile resistance of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Heliyon**, v. 9, n. 1, 2023.
- ALEXANDRI, M. *et al.* High L (+) lactic acid productivity in continuous fermentations using bakery waste and lucerne green juice as renewable substrates. **Bioresource Technology**, v. 316, e123949, 2020.
- ANAGNOSTOPOULOU, C. *et al.* Valorization of household food wastes to lactic acid production: A response surface methodology approach to optimize fermentation process. **Chemosphere**, v. 296, e133871, 2022.
- ANGELIS, M. *et al.* Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. **Proteomics**, v. 16, p. 946-962, 2016.

BERNARDO, M. P. *et al.* L (+) Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 640–646, 2016.

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 665-684, 2018.

CASTRO-AGUIRRE, E. *et al.* Poly (lactic acid) - Mass production, processing, industrial applications, and end of life. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 333-366, 2016.

CATONE, M. V. *et al.* Lactic acid production using cheese whey based medium in a stirred tank reactor by a ccpA mutant of *Lacticaseibacillus casei*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 4, 2021.

CEAPA, C. *et al.* The variable regions of *Lactobacillus rhamnosus* genomes reveal the dynamic evolution of metabolic and host-adaptation repertoires. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 6, p. 1889–1905, 2016.

CHAMBERLAIN, M. C. *et al.* Metabolomic analysis of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, and *Lacticaseibacillus rhamnosus* Strains in the presence of Pomegranate extract. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

CHANG, C. P.; LIEW, S. L. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 536–543, 2013.

CHASOY, G. R.; CHAIREZ, I.; DURÁN-PÁRAMO, E. Carbon/nitrogen ratio and initial pH effects on the optimization of lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp *casei* NRRL-441. **Wulfenia Journal**, v. 27, n. 10, p. 37- 59, 2020.

CHEN, C. *et al.* Engineering microorganisms to produce bio-based monomers: Progress and Challenges. **Fermentation**, v. 9, n. 2, 2023.

CHEN, H. *et al.* 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**, v. 146, 2020.

CHEONG, Y. E. *et al.* Elucidation of the fucose metabolism of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG by metabolomic and flux balance analyses. **Journal of Biotechnology**, v. 360, p. 110–116, 2022.

COELHO, L. F. *et al.* Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: Optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 27–36, 2011.

COLLINS, M.; PHILLIPS, B.; ZANONI, P. Deoxyribonucleic Acid Homology Studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic**, v. 39, n. 2, p. 105–108, 1989.

CUI, F.; LI, YEBO.; WAN, CAIXIA. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1831-1836, 2011.

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

DOUILLARD, F. P. *et al.* Comparative genomic and functional analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* strains and their comparison with strain GG. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 8, 2013.

EITEMAN, M. A.; RAMALINGAM, S. Microbial production of lactic acid. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 5, pp. 955–972, 2015.

FARIAS, N.; SOARES, M.; GOUVEIA, E. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT**, v. 71, p. 149–154, 2016.

FILIMON, V. R. *et al.* Studies on the carbon catabolite repression in lactic acid bacteria isolated from wine: carbon catabolite repression in lactic acid bacteria. **Journal of Experimental and Molecular Biology**, v. 25, n. 2, p. 85–92, 2024.

FONTES, M. R. V. *et al.* Thermal stability, hydrophobicity and antioxidant potential of ultrafine poly (lactic acid)/rice husk lignin fibers. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 1, p. 133–144, 2021.

FOTIDIS, I. A. *et al.* Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 1, p. 38–48, 2013.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. The importance of understanding the stress physiology of lactic acid bacteria. **Stress Responses of Lactic Acid Bacteria**. Springer US, p. 3–20, 2011.

GAO, C.; MA, C.; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 930-939, 2011.

GHAFFAR, T. *et al.* Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 222–229, 2014.

GRANGET, C. *et al.* Brewer's spent grain as a self-sufficient feedstock for homofermentative production of optically pure L-lactic acid using *Lactobacillus rhamnosus*. **Environmental Technology & Innovation**, n. 34, 103582, 2024.

GUAN, N.; LIU, L. Microbial response to acid stress: Mechanisms and Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 51-65, 2020.

GUO, S. *et al.* Metabolic profiling and growth characteristics of a spaceflight-induced mutant of *Lactobacillus rhamnosus*: Unveiling enhanced carbohydrate and amino acid metabolism for improved probiotic potential. **Food Bioscience**, v. 58, 2024.

HARIS, S. *et al.* Production of lactic acid from date fruit pomace using *Lactobacillus casei* and the enzyme Cellic CTec2. **Environmental Technology and Innovation**, v. 31, 2023.

HASHEMI, S. M. B.; JAFARPOUR, D. Fermentation of bergamot juice with *Lactobacillus plantarum* strains in pure and mixed fermentations: Chemical composition, antioxidant activity and sensorial properties. **LWT**, v. 131, 2020.

HAYEK, S. A. *et al.* Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 86, p. 490-502, 2019.

HOSMER, J.; MCEWAN, A.; KAPPLER, U. Bacterial acetate metabolism and its influence on human epithelia. **Emerging Topics in Life Sciences**, V. 8, P. 1-13, 2024.

HU, S. M. *et al.* Purification, characterization and biological activities of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* ZFM231 isolated from milk. **LWT**, v. 147, 2021.

HUANG, C. *et al.* Identification and Classification for the *Lactobacillus casei* Group; **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

HUANG, D. *et al.* Comparative genomic analyses of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from Chinese subjects. **Food Bioscience**, v. 26, 100659, 2020.

HWANG, S. *et al.* Exploring the fatty acid double bond hydration activities of *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Food Bioscience**, v. 57, 103571, 2024.

IBRAHIM, S. A. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. **Reference Module in Food Science**, 2016. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00857-x>.

JAFARPOUR, D. *et al.* Comparison between response surface methodology and genetic algorithm analysis to optimize lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* under ultrasonic pretreatment. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 21–24, 2021.

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

JYOTI, B. D.; SURESH, A. K.; VENKATESH, K. V. Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 509–514, 2003.

KHOR, W. C. *et al.* Acetate accumulation enhances mixed culture fermentation of biomass to lactic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 19, p. 8337–8348, 2016.

KIM, K. H. *et al.* Genomic and metabolic features of *Lactobacillus sakei* as revealed by its pan-genome and the metatranscriptome of kimchi fermentation. **Food Microbiology**, v. 86, 2020.

KIMOTO-NIRA, H. *et al.* Effect of sodium acetate on the adhesion to porcine gastric mucin in a *Lactococcus lactis* strain grown on fructose. **Animal Science Journal**, v. 87, n. 6, p. 802–808, 2016.

KOSTOV, G. *et al.* Lactic acid production with *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* NBIMCC 1013: Modeling and optimization of the nutrient medium. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, n. 5, p. 517–527, 2011.

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

KURU, Z.; KAYA, M. A. Poly(Lactic Acid) / Polyester Blends: Review of current and future applications. **The European Journal of Research and Development**, v. 3, n. 1, p. 175–199, 2023.

KUSMIATI, K. *et al.* Effects of sodium acetate and trace element (se²⁺, zn²⁺) on exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* and promote antioxidant capacity. In *Lactobacillus - A Multifunctional Genus*. **IntechOpen**. 2023.

LEBEER, S. *et al.* Functional analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili in relation to adhesion and immunomodulatory interactions with intestinal epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 1, pp. 185–193, 2012.

LEE, J. *et al.* Physicochemical characterization of potassium hydroxide pretreated chestnut shell and its bioconversion to lactic acid by *Lactocaseibacillus rhamnosus*. **Processes**, v. 11, n. 12, 2023.

LI, Z. *et al.* Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 1, p. 138–142, 2010.

LIAN, T. *et al.* Improving production of lactic acid and volatile fatty acids from dairy cattle manure and corn straw silage: Effects of mixing ratios and temperature. **Bioresource Technology**, v. 359, 127449, 2022.

LIEW, S. L. *et al.* Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 137–142, 2005.

LINO, T. *et al.* Effects of sodium acetate on the production of stereoisomers of lactic acid by *Lactobacillus sakei* and other lactic acid bacteria. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 47, p. 223–239, 2001.

LIU, X. *et al.* Probiotic properties of *Lactocaseibacillus rhamnosus* grx10 revolved with complete genome. **Food Bioscience**, v. 52, 102219, 2023.

LU, Z. *et al.* Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 10, p. 3642–3648, 2010.

LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1004-1011, 1990.

MARQUES, S. *et al.* Pulsed fed-batch strategy towards intensified process for lactic acid production using recycled paper sludge. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 7, n. 2, p. 127–137, 2017.

MARTYNOVA, J. *et al.* Effects of acetate on *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 growth and metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 10, p. 4585–4594, 2016.

MARYANTY, Y. *et al.* Comparing the performance of *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus rhamnosus* on the formation of lactic acid from glucose. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 1053, n. 1, p. 12-42, 2021.

MATHIPA-MDAKANE, M. G., & THANTSHA, M. S. *Lactocaseibacillus rhamnosus*: A suitable candidate for the construction of novel bioengineered probiotic strains for targeted pathogen control. **Foods**, v. 11, n. 6, 2022.

MENG, F. *et al.* Acetate activates *Lactobacillus* bacteriocin synthesis by controlling quorum sensing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 13, 2021.

MESQUITA, A. C. *et al.* Activity of metabolites produced by new strains of *Lactobacillus* in modified de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium against multidrug-resistant bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 8, p. 345–355, 2017.

METSALU, T., VILO, J. ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. **Nucleic Acids Research**. v. 43, n. 1, p. 566–570, 2015.

MILLARD, P. *et al.* Acetate is a beneficial nutrient for *E. coli* at low glycolytic flux. **The EMBO Journal**, v. 42, n. 15, e113079, 2023

MILLER, C. *et al.* Industrial production of lactic acid. In: **Comprehensive Biotechnology**. p. 208–217, 2017.

MORA-VILLALOBOS, J. A. *et al.* Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. **Fermentation**, v. 6, n. 23, 2020.

NADKARNI, M. A. *et al.* Intra-species variation within *Lactobacillus rhamnosus* correlates to beneficial or harmful outcomes: lessons from the oral cavity. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 661, 2020.

NAGARAJAN, D. *et al.* Fermentative lactic acid production from seaweed hydrolysate using *Lactobacillus* sp. and *Weissella* sp. **Bioresource Technology**, v. 344, 126166, 2022.

OLEKSY-SOBCZAK, M.; KLEWICKA, E.; PIEKARSKA-RADZIK, L. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains – Optimization of synthesis and extraction conditions. **LWT**, v. 122, 2020.

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

PAGANA, I.; MORAWICKI, R.; HAGER, T. J. Lactic acid production using waste generated from sweet potato processing. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 641–649, 2014.

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

PEDRO, N. A. *et al.* Acetate modulates the inhibitory effect of *Lactobacillus gasseri* against the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata*. **Microbial Cell**, v. 10, n. 4, p. 88–102, 2023.

PEJIN, J. *et al.* Lactic acid fermentation of brewer's spent grain hydrolysate by *Lactobacillus rhamnosus* with yeast extract addition and pH control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 98-104, 2017.

PEJIN, J. *et al.* Possibility of L-(+)-lactic acid fermentation using malting, brewing, and oil production by-products. **Waste Management**, v. 79, p. 153–163, 2018.

PENG, S. *et al.* Isolation, characterization and anti-UVB irradiation activity of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* VHPriobi O17. **Heliyon**, v. 8, n. 10, 2022.

PEREIRA, M. T.; SANTANA, E. H. W.; SANTOS, J. S. Importância das bactérias ácido lácticas e não starter (NSLAB) na tecnologia de produção dos derivados

lácteos. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**. v. 24, n. 4, p. 348–352, 2020.

PETROVA, M. I. *et al.* The lectin-like protein 1 in *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mediates tissue-specific adherence to vaginal epithelium and inhibits urogenital pathogens. **Scientific Reports**. v. 6, 2016.

PIMENTEL, T. C. *et al.* Postbiotics: An overview of concepts, inactivation technologies, health effects, and driver trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 138, p. 199-214, 2023.

PINHAL, S. *et al.* Acetate Metabolism and the Inhibition of Bacterial Growth by Acetate. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 13, 2019.

REALE, A. *et al.* Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT**. v. 60, n. 2, p. 721–728, 2015.

REN, Y. *et al.* Purification of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* and changes in their characteristics by regulating quorum sensing genes via polyphenols. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 240, 2023.

REZAEI, Z.; KHANZADI, S.; SALARI, A. Biofilm formation and antagonistic activity of *Lactobacillus rhamnosus* (PTCC1712) and *Lactiplantibacillus plantarum* (PTCC1745). **AMB Express**, v. 11, n. 1, 2021.

ROCCHETTI, M. T. *et al.* Bioprospecting antimicrobials from *Lactiplantibacillus plantarum*: Key factors underlying its probiotic action. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, e12076, 2021.

ROMBOUTS, J. L. *et al.* Selecting for lactic acid producing and utilizing bacteria in anaerobic enrichment cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 5, p. 1281–1293, 2020.

SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 70-78, 2005.

SEGER, M. E.; LEBEER, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014.

SILVA, P. K. N. *et al.* Nutritional requirements for *Lactobacillus vini* growth in sugarcane derivative substrate of ethanol fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, n. 16, 2019.

SILVA, Y. P.; BERNARDI, A.; FROZZA, R. L. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. **Frontiers in Endocrinology**, 2020.

SINGHVI, M. *et al.* Greener L-lactic acid production through in situ extractive fermentation by an acid-tolerant *Lactobacillus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6425–6435, 2018.

SLAVICA, A. *et al.* Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^T in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^T. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p. 50-59, 2015.

SONG, L. *et al.* Microbial production of lactic acid from food waste: Latest advances, limits, and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 345, 2022.

STILES, J. *et al.* Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillus rhamnosus*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 7, p. 1188-1191, 2002.

SUDHAKAR, M. P.; DHARANI, G. Evaluation of seaweed for the production of lactic acid by fermentation using *Lactobacillus plantarum*. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, 2022.

SUISSA, R. *et al.* Context-dependent differences in the functional responses of *Lactobacillaceae* strains to fermentable sugars. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, n. 24, 2022.

SUISSA, R. *et al.* Metabolic inputs in the probiotic bacterium *Lactocaseibacillus rhamnosus* contribute to cell-wall remodeling and increased fitness. **Biofilms and Microbiomes**, v. 9, n. 1, 2023.

SUISSA, R. *et al.* Molecular genetics for probiotic engineering: dissecting lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 293-306, 2021.

SULIJAYA, B.; TAKAHASHI, N.; YAMAZAKI, K. *Lactobacillus*-derived bioactive metabolites for the regulation of periodontal health: Evidences to clinical setting. **Molecules**, v. 25, n. 9, 2020.

SUN, L. *et al.* Comparative genomics and transcriptome analysis of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 11443 and the mutant strain SCT-10-10-60 with enhanced L-lactic acid production capacity. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 293, n. 1, p. 265–276, 2018.

TELES, G. H. *et al.* The metabolism of respiring carbon sources by *Dekkera bruxellensis* and its relation with the production of acetate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 195, n. 10, p. 6369–6391, 2023.

TELES, G. H. *et al.* Metabolic and biotechnological insights on the analysis of the Pdh bypass and acetate production in the yeast *Dekkera bruxellensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 355, p. 42–52, 2022.

THANANIMIT, S.; PAHUMUNTO, N.; TEANPAISAN, R. Characterization of short chain fatty acids produced by selected potential probiotic *Lactobacillus* strains. **Biomolecules**, v. 12, n. 12, 2022.

TIAN, X. *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, 2020.

TIAN, X. *et al.* Recent advances in lactic acid production by lactic acid bacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 4151-4171, 2021.

VOIDAROU, C. *et al.* Fermentative foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues. **Foods**, v. 10, n. 69, 2021.

WALTER, J.; O'TOOLE, P. W. Microbe Profile: The *Lactobacillaceae*. **Microbiology**, v. 169, n. 12, 2023.

WANG, L. *et al.* Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7895-7901, 2010.

WANG, T. *et al.* Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 3, p. 515–528, 2020.

WANG, Y. *et al.* Genome-shuffling improved acid tolerance and l-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. **Journal of Biotechnology**, v. 129, n. 3, p. 510–515, 2007.

WANG, Y. *et al.* Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 2021.

WANG, Y. *et al.* MgO recycling in L-lactic acid fermentation and effects of the reusable alkaline neutralizer on *Lactobacillus rhamnosus*: From process integration to transcriptome analysis. **LWT**, v. 163, 2022.

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 1, p. 10-18, 2015.

YANG, F. *et al.* Lactic acid biosynthesis pathways and important genes of *Lactobacillus panis* L7 isolated from the Chinese liquor brewing microbiome. **Food Bioscience**, v. 36, 100627, 2020.

YANG, H. Cross protection of lactic acid bacteria during environmental stresses: Stress responses and underlying mechanisms. **LTW**, n. 144, 111203, 2021.

YANKOV, D. Fermentative lactic acid production from lignocellulosic feedstocks: From source to purified product. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, 2022.

YOU, L. *et al.* A large-scale comparative genomics study reveals niche-driven and within-sample intra-species functional diversification in *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Research International**, v. 173, n.2, e113446, 2023.

ZAKARIYAH, R. F. *et al.* Optimization of Lactic Acid Fermentation from Cassava Peel by *Lactobacillus casei* (ATCC334). **Microbiology Research Journal International**, v. 31, n. 6, p. 29-42, 2021.

ZANGL, I. *et al.* The role of *Lactobacillus* species in the control of *Candida* via biotrophic interactions. **Microbial Cell**, v. 7, n. 1, 2020.

ZHANG, C. *et al.* Influence of nitrogen sources on the tolerance of *Lacticaseibacillus rhamnosus* to heat stress and oxidative stress. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 5, 2022.

ZHANG, S.; AIDA, H.; YING, B. W. Employing active learning in medium optimization for selective bacterial growth. **Applied Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 1355–1369, 2023.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* *beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020.

ZHENG, X. *et al.* Effects of precursors on kitasamycin production in *Streptomyces kitasatoensis*. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 3, p. 910–919, 2019.