



Produção de ácido láctico através da fermentação em estado sólido por meio do reaproveitamento das cascas do abacaxi

Production of lactic acid using solid-state fermentation by reusing pineapple peels

Rosângela de Carvalho Goulart Guedes Prado^{1*}, Diana Maria Serafim Martins¹,
Brenaline Ribeiro Consoli², Felipe Batista², Flavia Brigolin Gandra²,
Luiz Henrique da Silva Reganasse², Rafael dos Santos Tanaka²

¹ Docente do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, UNIFEB.

² Discente do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, UNIFEB - Curso de Engenharia Química.

Resumo

O ácido láctico é um dos ácidos orgânicos mais utilizados atualmente, com aplicações em vários setores, tais como farmacêutico, químico, alimentício, entre outros. Pode ser obtido de duas maneiras: por síntese química, responsável por uma pequena fração (~10%) de toda a produção por causa de seu alto custo; e por via fermentativa, que corresponde a 90% de toda a produção de ácido láctico. Para produzir esse ácido por via fermentativa, pode-se empregar o método de fermentação de estado sólido (FES), amplamente usado por poluir menos o meio ambiente comparado à fermentação líquida e por necessitar de uma quantidade menor de água, o que, em larga escala, pode ser mais econômico e sustentável. Pelo método de FES, é possível utilizar restos de compostos orgânicos como substratos, que inicialmente seriam descartados por não terem uso ou serem pouco reaproveitados. Com base nessa ideia, o propósito deste trabalho foi o de produzir ácido láctico pelo método de FES, utilizando como microrganismo a bactéria *Lactobacillus casei* e como substrato as cascas de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill), um substrato que, apesar de rico em nutrientes e enzimas, ainda não possui uso comercial. A quantidade de ácido láctico produzida foi de 0,0556 g L⁻¹, que é pequena diante dos valores obtidos em outros trabalhos, indicando a necessidade de ajuste dos parâmetros empregados neste processo.

Palavras-chave: Substrato alternativo; bactéria; reaproveitamento; biotecnologia ambiental.

Abstract

Lactic acid is one of the most widely used organic acids nowadays, with applications in various sectors, such as the pharmaceutical, chemical, foodstuffs, among others. It can be obtained in two ways: by chemical syntheses, which accounts for a small fraction (~10%) of all acid production due to its high cost; and by fermentation, which accounts for 90% of all lactic acid production. To produce this acid via fermentation, the solid-state fermentation method (SSF) can be used, which is widely used because it pollutes less the environment than liquid fermentation, and it requires less water, which on a large scale can be more economical and sustainable. By the SSF method, it is possible to use organic compounds waste as substrates, which would initially be discarded for having no or little use. Based on this idea, this work aimed to produce lactic acid by the SSF method, using the bacterium *Lactobacillus casei* as a microorganism and pineapple peels (*Ananas comosus* (L.) Merrill) as a substrate, a substrate that, despite being rich in nutrients and enzymes, is not yet in commercial use. The amount of lactic acid produced was 0.0556 g L⁻¹, which is small amount compared to values obtained in other studies, indicating the need to adjust the parameters used in this process.

Keywords: Alternative substrate; bacteria; reuse; environmental biotechnology.

***Autor para correspondência:** Rosângela de Carvalho Goulart Guedes Prado, E-mail: rosangela.prado@unifeb.edu.br

Recebido: 31 de novembro de 2023

Aceito para publicação: 21 de dezembro de 2023

Introdução

O ácido láctico ($C_3H_6O_3$) é um ácido orgânico muito utilizado em vários setores industriais. Na indústria alimentícia, é empregado como acidulante para diminuir o pH de alimentos e como conservante. Porém, o seu uso não se restringe somente a esse setor; essa substância também é encontrada no ramo farmacêutico, medicinal e químico (Silva et al., 2010; Souza et al., 2019). O método mais aplicado na obtenção do ácido láctico é a fermentação, e um dos microrganismos mais usados nesse processo são as bactérias da família *Lactobacillus* (Kourkoutas et al., 2005).

Por ser um ácido muito comercializado, sua produção tem sido escopo de várias pesquisas, com o objetivo de torná-la mais barata e menos agressiva ao meio ambiente, utilizando, por exemplo, substratos de baixo custo e microrganismos que possuem alto rendimento de produção ou que tenham o ácido láctico como metabólito principal (Bustos et al., 2005).

Em 1940, a fermentação mais utilizada era a fermentação líquida, que empregava grandes quantidades de água e energia. Após anos de estudos, chegou-se à conclusão de que a fermentação em estado sólido (FES) era a opção mais viável.

A fermentação sólida, como o próprio nome diz, faz uso de um substrato sólido, podendo ter líquidos que auxiliam no processo metabólico (Qi & Yao, 2007). O substrato deve possuir umidade o suficiente para estimular o crescimento e o metabolismo dos microrganismos desejados (Bhargav et al., 2008). A FES recebeu grandes investimentos para que se tornasse tão viável quanto a fermentação líquida, o que a fez se tornar muito utilizada nas indústrias farmacêutica e química e no campo ambiental (Chen, 2013). Na fermentação sólida, os microrganismos catalisam os nutrientes e sintetizam os metabólitos secundários, podendo completar suas outras atividades fisiológicas de modo aeróbico e anaeróbico, sendo de extrema importância se atentar à escolha do substrato (Pandey, 2003; Chen, 2013).

O ácido láctico pode ser produzido de duas formas: por meio de síntese química e por via fermentativa, porém apenas 10% da produção do ácido láctico é feita por síntese química em razão de seu alto custo (Guilherme, 2009).

A obtenção do ácido láctico por via fermentativa pode ser feita por bactérias, fungos, leveduras, algas e cianobactérias. Contudo, os microrganismos

mais utilizados são as bactérias lácticas (Souza, 2014). Com o avanço da Biotecnologia, vêm sendo realizadas pesquisas com o objetivo de fazer alterações genéticas nos microrganismos produtores de ácido láctico, para a obtenção de um maior rendimento e de substratos de menor custo (Dornelles, 2021; Beitel et al., 2020; Horlacher et al., 2023).

As bactérias lácticas são microrganismos que produzem ácido láctico por via fermentativa, e seus formatos são, principalmente, cocos e bacilos. Elas utilizam como substrato compostos que possuem açúcar (Guilherme, 2009), porém são bactérias exigentes, necessitando também de outros nutrientes, como sais minerais, fontes de nitrogênio, vitaminas e aminoácidos (Jagnow & Dawid, 1991). Os principais gêneros das bactérias empregadas na fermentação são: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (Davidson et al., 1995; Ercolini et al., 2001; Guilherme, 2009; Jay, 2000; Holzapfel et al., 2001; Stiles & Holzapfel, 1997).

O *Lactobacillus casei*, uma bactéria láctica que tem o ácido láctico como seu principal metabólito, é considerado uma bactéria homofermentativa que produz, principalmente, o L(+)-ácido láctico, sendo um dos microrganismos mais utilizados para a obtenção deste ácido orgânico (Guilherme, 2009; Tanaka et al., 2006; Oliveira, 2014; Buvukkileci & Harsa, 2000).

O *L. casei* é um microrganismo descrito como anaeróbico facultativo, é Gram-positivo e, assim como as outras bactérias dos mesmos gêneros, necessita de uma nutrição complexa, isto é, de um substrato que possua vitaminas, sais minerais e aminoácidos (Oliveira, 2014).

Com grande importância comercial, o abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill) pode ser empregado para vários fins. Por possuir alto teor nutricional, esta fruta é usada não só em sua forma natural, mas também como ingrediente de muitos alimentos, como doces, geleia e sucos engarrafados (Granada et al., 2004).

O abacaxi é uma fruta típica de regiões tropicais e subtropicais, porém, mesmo o Brasil possuindo regiões com ótimas condições climáticas para seu plantio, é apenas o quarto maior produtor de abacaxi do mundo (Bengozi et al., 2007).

A utilização do abacaxi não se limita apenas ao seu fruto; a planta que a origina (abacaxizeiro) também possui uso comercial. O caule do

abacaxizeiro é matéria-prima para a produção de álcool etílico e gomas, enquanto seu pedúnculo é aproveitado na alimentação animal (Granada et al., 2004). No entanto, ainda há algumas partes que possuem pouca ou quase nenhuma utilização comercial, como a sua casca, que é descartada quase totalmente sem ser empregada (Granada et al., 2004; Medina et al., 1987).

A casca do abacaxi, apesar do pouco aproveitamento atualmente e dos poucos estudos a seu respeito, possui alto valor nutricional. Sua composição é de aproximadamente 4,74% de minerais e 17,92% de fibras alimentares (Pacheco et al., 2022; Neres et al., 2015). Mesmo contendo todos esses componentes, até agora só há uma utilização comercial para a casca do abacaxi, que é como ingrediente em barra de cereais (Fonseca et al., 2011).

Desse modo, o objetivo deste trabalho foi analisar um método de produção de ácido lático utilizando a bactéria *L. casei*, um microrganismo que possui o ácido lático como metabólito principal, e empregando a FES, por ser um método de menor custo e alto rendimento. Levando em consideração a necessidade de encontrar uma utilização para a casca de abacaxi, neste trabalho ela foi empregada como substrato de uma fermentação sólida.

Material e Métodos

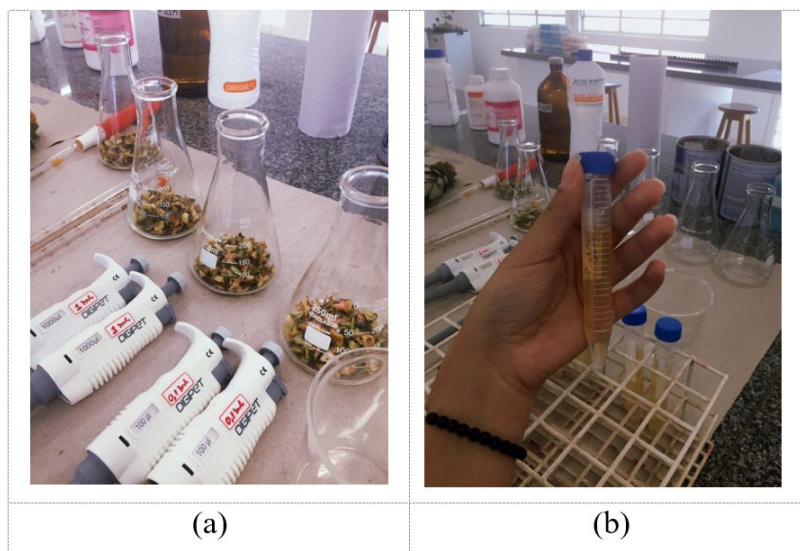
Preparo do substrato

O substrato usado neste trabalho foi a casca de abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill), obtido em pontos comerciais da cidade de Barretos/SP. Inicialmente, as cascas de abacaxi foram cortadas em pequenos pedaços. Foram colocados 20 gramas das cascas em 8 Erlenmeyers de 250 mL, conforme Figura 1a, e autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

Ativação do microrganismo *Lactobacillus casei*

O microrganismo *L. casei* foi obtido em farmácia de manipulação da cidade de Barretos. Para sua ativação, foi preparado o caldo nutriente com a seguinte composição (g/L): 1,0 g de extrato de carne, 2,0 g de extrato de levedura, 5,0 g de peptona e 5,0 g de cloreto de sódio. Os compostos foram diluídos em água destilada. Posteriormente, foram fracionados 10 mL do caldo em 8 tubos falcon de 15 mL, com pH final (25°C) $6,8 \pm 0,2$ (Figura 1b).

Para obter o desenvolvimento de colônias e manter a cepa do microrganismo em estudo, foi utilizado o meio de cultura ágar nutriente, com a adição de 15 g de ágar-ágar na mesma formulação



Fonte: Autoria própria.

Figura 1. Cascas de abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill). a) Dispostas no Erlenmeyer; b) Meio de cultura caldo nutriente utilizado para ativação do microrganismo *Lactobacillus casei*.

do caldo. Os meios foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

Após a esterilização dos meios de cultura, foi inoculado 0,18 g do microrganismo *L. casei* em tubos com caldo nutriente. Os tubos foram levados à estufa bacteriológica por um período de 24 horas em uma temperatura de 35°C.

Caracterização da linhagem do microrganismo utilizado

Para verificar a morfologia do microrganismo empregado, foi realizada a técnica de coloração de Gram, a partir de colônias desenvolvidas em meio de cultura ágar nutriente, previamente incubado por 24 horas a 35°C.

Inoculação de *Lactobacillus casei* no substrato

Foram inoculados 2 mL (corresponde a 10% da massa de abacaxi) do caldo contendo o microrganismo (inoculado previamente por 24 horas) nas cascas de abacaxi já autoclavadas (Figura 2). Após a inoculação, os Erlenmeyer foram novamente levados à estufa bacteriológica por um período de 24 horas em uma temperatura de 35°C.

Determinação de ácido láctico produzido

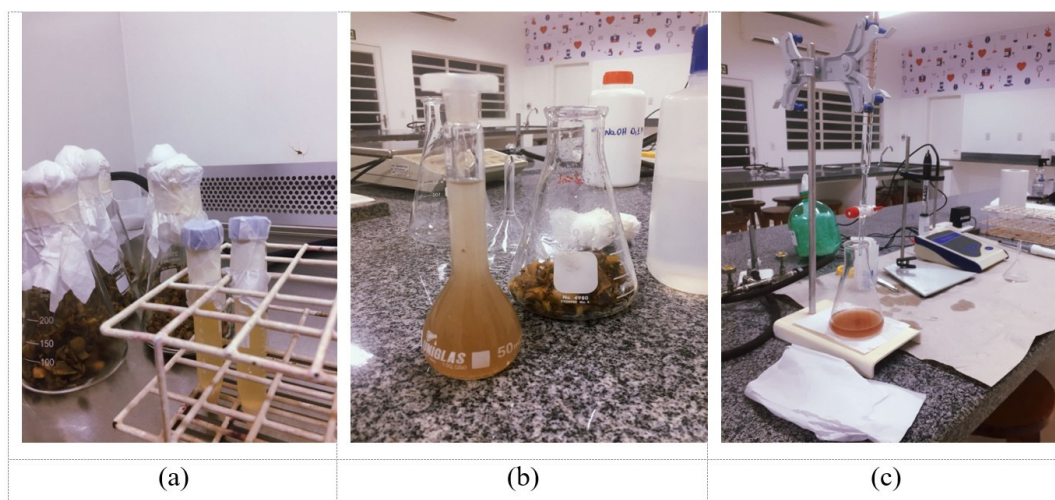
Decorrido o período de incubação de 24 horas, as cascas de abacaxi foram lavadas com 50 mL

de água destilada esterilizada e filtrada, obtendo uma solução com o ácido produzido neste processo fermentativo (Figura 2b). Para a determinação de ácido láctico, foi realizada a técnica de titulação ácido-base, em que foi utilizada uma solução de NaOH 0,1 mol/L como titulante e 50 mL da amostra obtida na fermentação. Foi empregada a fenolftaleína como indicador. O equipamento RQflex 20 (Figura 3) foi usado para determinar a quantidade de ácido láctico produzido.

Resultados e Discussões

A coloração de Gram utilizada para caracterizar a linhagem do microrganismo *L. casei* apresentou a morfologia de bacilos Gram-positivos, não esporulados (Figura 4), indicando a característica típica deste microrganismo, conforme observado por Oliveira (2014).

A quantidade de ácido láctico produzido pela linhagem de microrganismo empregada neste experimento apresentou 0,9008 g/L de ácido, por meio do método de titulação ácido-base. Na determinação de ácido láctico a partir do uso do equipamento Reflectoquant RQflex 20, a quantidade de ácido láctico produzida foi de 0,0556 g/L. Essa diferença se deve ao fato de que, na titulação ácido-base, determinam-se todos os ácidos produzidos no processo fermentativo, enquanto o Reflectoquant RQflex 20 determinou apenas a quantidade de ácido láctico produzido.



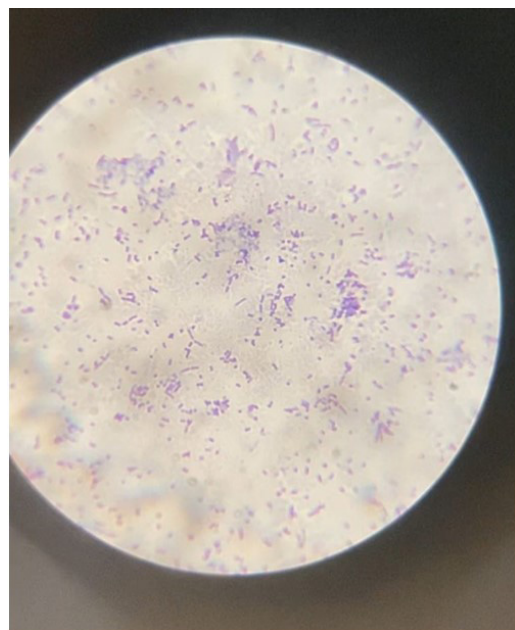
Fonte: autoria própria.

Figura 2. a) Substrato e cultura de microrganismo pronto para ser inoculado; b) Preparo da solução a ser titulada; c) Titulação para determinação da produção de ácido.



Fonte: autoria própria.

Figura 3. Equipamento Reflectoquant RQflex 20 utilizado para determinação de ácido láctico.



Fonte: autoria própria.

Figura 4. Visualização microscópica (1.000x) da coloração de Gram do microrganismo *Lactobacillus casei* utilizado neste experimento.

Os valores obtidos nestes experimentos foram baixos quando comparados com o trabalho de

Oliveira et al. (2009), que produziram ácido láctico a partir do melaço de cana-de-açúcar empregando *L. casei*. Observa-se que a produção de ácido láctico no trabalho de Oliveira et al. (2009) foi de 25,57, de 40,65 e de 58,86 g/L de ácido láctico para os meios contendo suplementação de 0% de extrato de levedura e 0% de peptona, 1% de extrato de levedura e 1% de peptona, e 2% de extrato de levedura e 2% de peptona, respectivamente, mostrando, assim, que a produção de ácido láctico aumenta em função da concentração da suplementação.

Neste experimento, não houve adição de suplemento nutritivo, como extrato de levedura, peptona ou extrato de carne, para estimular e otimizar o processo fermentativo de *L. casei* utilizando cascas e abacaxi como substrato, o que indica que a suplementação é uma alternativa que deverá ser considerada em trabalhos futuros.

O substrato utilizado por Oliveira et al. (2009) foi o melaço de cana-de-açúcar, que apresenta a glicose livre para ser metabolizada e convertida em ácido láctico, indicando ser um substrato de alto rendimento para esse processo fermentativo. Ao empregar a casca de abacaxi, parte-se de um substrato em que a glicose não está disponível imediatamente para metabolização, uma vez que o microrganismo precisa converter os componentes da casca do abacaxi em glicose para sua posterior metabolização.

Buvukkileci & Harsa (2000) usou o soro de leite como substrato para a produção de ácido láctico por *L. casei* e obteve um rendimento de 1,75 g/L de ácido láctico, indicando que o substrato é essencial para o rendimento do processo fermentativo quando comparado com o substrato utilizado por Oliveira et al. (2009).

A casca de abacaxi como substrato para processos fermentativos é pouco usada atualmente e apresenta-se como um substrato potencial, uma vez que pode ser utilizada para diferentes tipos de processo fermentativo.

A suplementação de nutrientes na fermentação proporciona maior rendimento no processo, mas, em contrapartida, aumenta os custos do processo e, muitas vezes, torna-se inviável economicamente.

Conclusão

Ao utilizar cascas de abacaxi como substrato, um resíduo subutilizado, foi demonstrado não apenas a viabilidade desse processo, mas também a possibilidade de dar um destino valioso a materiais

descartados. Os resultados obtidos indicam que o uso da casca de abacaxi é uma alternativa para a produção de ácido láctico por *L. casei*, porém a metodologia para esse processo precisa ser otimizada desde o preparo e apresentação do substrato até a granulometria e a adição de nutrientes economicamente viáveis para serem adicionados ao meio fermentativo, a fim de se obter quantidades de ácido láctico que sejam de interesse para uso industrial.

Referências

- Beitel, S. M., Coelho, L. F., & Contiero, J. (2020). Efficient conversion of agroindustrial waste into D (-) lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii* using fed-batch fermentation. *BioMed Research International*, 2020, 4194052.
- Bengozi, F. J., Sampaio, A. C., Spoto, M. H. F., Mischan, M. M., & Pallamin, M. L. (2007). Qualidades físicas e químicas do abacaxi comercializado na CEAGESP São Paulo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 29(3), 540-545.
- Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M., & Javedb, S. (2008). *Solid-state fermentation: an overview*. New Delhi: Pharmaceutical Biotechnology Laboratory, Faculty of Pharmacy, Jamia Hamdard.
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., & Domínguez, J. M. (2005). Production of lactic acid from vine-trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(3), 466-472.
- Buvukkileci, A. O., & Harsa, S. (2000). *L(+)* lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* NRRL B-441 (Tese de doutorado). Izmir Institute of Technology, Izmir, Turquia.
- Chen, H. (2013). *Modern solid state fermentation: theory and practice*. Beijing: Springer Science & Business Media.
- Davidson, B. E., Llanos, R. M., Cancilla, M. R., Redman, N. C., & Hillier, A. J. (1995). Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5(8), 763-784.
- Dornelles, E. S. (2021). *Produção de ácido láctico: panorama de melhorias de processos* (Tese de doutorado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., & Coppola, S. (2001). Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. *Current Microbiology*, 42(3), 199-202.
- Fonseca, R. S., Del Santo, V. R., Souza, G. B., & Pereira, C. A. M. (2011). *Elaboração de barra de cereais com casca de abacaxi*. São Carlos: Centro Universitário Central Paulista.
- Granada, G. G., Zambiasi, R. C., & Mendonça, C. R. B. (2004). Abacaxi: produção, mercado e subprodutos. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 22(2), 405-422.
- Guilherme, A. (2009). *Otimização da produção de ácido Láctico por Lactobacillus casei NRRL B-442 em suco de caju clarificado* (Dissertação de mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Holzappel, W., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365-373.
- Horlacher, N., Oey, I., & Agyei, D. (2023). Learning from tradition: health-promoting potential of traditional lactic acid fermentation to drive innovation in fermented plant-based dairy alternatives. *Fermentation*, 9(5), 452.
- Jagnow, G., & Dawid, W. (1991). *Biotecnología: introducción con experimentos modelos*. Zaragoza: Acribia.
- Jay, J. M. (2000). Fermentation and fermented dairy products. In J. M. Jay, M. J. Loessner & D. A. Golden (Eds.), *Modern food microbiology* (6th ed., pp. 113-130). Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., & Kanellaki, M. (2005). *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruits pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, 40(1), 411-416.
- Medina, J. C., Bleinroth, E. W., Martin, Z. J., Tocchini, R. P., Soler, M. P., Baldini, V. L. S.,

- Takuo, H., Moretti, V. A., Almeida, L. A. S. B., Bicudo Neto, L. C., & Marques, J. F. (1987). *Abacaxi: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos* (285 p.). Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos.
- Neres, J. P. G., Souza, R. L. A., & Bezerra, C. F. (2015). Iogurte com polpa e farinha da casca do abacaxi. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70, 262-269.
- Oliveira, P. M. (2014). *Produção de L(+)-ácido láctico por Lactobacillus casei Ke11 utilizando insumos agroindustriais* (Dissertação de mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- Oliveira, R. F., Sousdaleff, M., Lima, M. V. S., & Lima, H. O. S. (2009). Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melão de cana de açúcar por *Lactobacillus casei*. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2, 34-40.
- Pacheco, N. I., Mendes, L. A. P. P. F., Carneiro, G. S., Lopes, D. C., Coutinho, I. V. L., Silva, A. K. A. P., Rodrigues, K. B. R., Deus, L. R. S., Silva, A. P., & Sousa, T. Y. L. L. (2022). Caracterização do abacaxi e sua casca como alimento funcional: revisão narrativa. *Research, Social Development*, 11(3), e46011326840.
- Pandey, A. (2003). *Solid-state fermentation*. India: Regional Research Laboratory, Council of Scientific and Industrial Research.
- Qi, B., & Yao, R. (2007). *L-lactic acid production from Lactobacillus Casei by solid state fermentation using rice straw*. Hefei: Hefei University of Technology.
- Silva, M. V., Gonçalves, O. H., Lima, M. V. S., & Lima, H. O. S. (2010). Obtenção de ácido láctico via fermentação descontínua utilizando melão de cana-de-açúcar, farinha de varredura, frutose e fécula de mandioca. *Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos*, 1(2), 97-102.
- Souza, E. C. D., Dantas, L. F. O., & Silva, W. B. D. (2019). *Projeto industrial de produção de ácido láctico utilizando permeado de soro de leite como substrato para a fermentação* (Tese de doutorado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba.
- Souza, E. L. (2014). *Produção de ácido láctico empregando matérias-primas alternativas* (Tese de doutorado). Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. G. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Tanaka, T., Hoshina, M., Tanabe, S., Sakai, K., Ohtsubo, S., & Taniguchi, A. A. (2006). Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 97(2), 211-217.