



**JULIETE GOMES DE LARA DE SOUZA**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO POR BACTÉRIAS  
DO ÁCIDO LÁTICO**

**LAVRAS-MG  
2022**

**JULIETE GOMES DE LARA DE SOUZA**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO POR BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias  
Orientador

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso  
Coorientador

**LAVRAS-MG**  
**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Juliete Gomes de Lara de.

Produção de ácido L-glutâmico por bactéria de ácido láctico /  
Juliete Gomes de Lara de Souza. - 2022.

67 p. : il.

Orientador(a): Disney Ribeiro Dias.

Coorientador(a): Danilo de Menezes Daloso.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Bactérias de ácido láctico. 2. Fermentação. 3. Ácido L-  
glutâmico. I. Dias, Disney Ribeiro. II. Daloso, Danilo de Menezes.  
III. Título.

**JULIETE GOMES DE LARA DE SOUZA**

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO POR BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO**  
**L-GLUTAMIC ACID PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de setembro de 2022.

Dr. Danilo de Menezes Daloso	UFC
Dra. Monique Suela Silva	UFLA
Dra. Angélica Cristina de Souza	UFLA
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias  
Orientador

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso  
Coorientador

**LAVRAS-MG**  
**2022**

*À Ciência.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Doutor Disney Ribeiro Dias, pelos ensinamentos, paciência, incentivo, apoio e orientação.

Às doutoras Angélica Cristina de Souza e Taís Teixeira das Neves, pesquisadoras que muito admiro, pela ajuda e por toda a energia despendida comigo nesta tese. Obrigada pela paciência, dedicação e palavras amigas com que sempre me presentearam.

A toda a equipe do laboratório de fermentações, em particular à Cidinha e ao Dirceu, por toda a colaboração e amizade.

A todos com quem partilhei as bancadas de laboratório durante o desenvolvimento deste trabalho, Andreísa, Pâmela, Rafael, Viviane, Gustavo e Iara, por toda a ajuda e pela companheirismo. Foi um prazer conhecê-los!

A todo o pessoal do laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela simpatia e auxílio durante o desenvolvimento dos experimentos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Programa de Microbiologia Agrícola, à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, ao CNPq e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus amigos, Kassina, Sadraque, Elisangela, Rafaela, Adriana, Adriele, Juliana Bento, Juliana Palumbo, Juliana Pinelli, Natalia, Luara, Tais, Amanda, Dérica e Mariana, pelos momentos de descontração e pelo incentivo constante.

Ao Pedro Y. Cavasin, pelo apoio, incentivo e companheirismo de sempre.

À minha família, pelo apoio e carinho diário, mesmo que distante.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*“A educação é um ato de amor, por isso, um ato de coragem”*

*(Paulo Freire)*

## RESUMO

O ácido L-glutâmico é um dos principais aminoácidos presentes em uma grande variedade de alimentos. É usado principalmente como um aditivo alimentar na forma de glutamato monossódico e a sua produção se dá, quase que exclusivamente, por processo fermentativo. Considerando o grande interesse comercial do ácido L-glutâmico, a descoberta de cepas com características bioquímicas e físico-químicas desejáveis, a partir de substratos diversificados, tais como alimentos e bebidas fermentadas é extremamente importante para o mercado de aminoácido. A descoberta de novas espécies e cepas produtoras de ácido L-glutâmico com novos atributos tais como a segurança e o potencial probiótico proporcionam a possibilidade de novas aplicações, bem como a obtenção do aminoácido de maneira mais eficaz, segura e barata. Assim, objetivou-se selecionar bactérias do ácido láctico isoladas de alimentos fermentados, com capacidade de produção de ácido glutâmico, bem como verificar alguns atributos probióticos *in vitro*, e os melhores parâmetros de produção do aminoácido. As bactérias provenientes da Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA) foram avaliadas de forma qualitativa, a capacidade de sintetizar L-glutâmico pela cromatografia de camada delgada (CCD) e, quantitativa, por espectrofotometria utilizando curva padrão. Quanto ao potencial probiótico, verificou-se as características de segurança, bem como a hidrofobicidade, autoagregação e co-agregação. A produção intracelular e extracelular do aminoácido foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As bactérias do ácido láctico isoladas de bebida indígena brasileira “Yakupa” pertencente à espécie *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0209 e CCMA 0205, apresentaram maior potencial na produção de ácido L-glutâmico, intracelular e extracelular, respectivamente. Os modelos de previsão empírica desenvolvidos foram considerados adequados ( $p < 0,05$ ) para descrever a produção extracelular e intracelular de ácido L-glutâmico da cepa CCMA 0205 ( $R^2 = 0,83$  e  $0,84$ ). As condições ótimas estabelecidas para a produção de ácido L-glutâmico pela cepa foram pH 4,5; temperatura de 35 °C e o tempo de 72 horas. O estudo apresenta o potencial promissor de bactérias do ácido láctico isoladas de bebida indígena brasileira na produção de ácido L-glutâmico, e fornece informações relevantes para a produção do aminoácido por *L. fermentum* (cepa CCMA 0205).

**Palavras-chave:** Ácido L-glutâmico. Processos fermentativos. DCCR. RSM. L-aminoácidos. Bactérias Ácidas Lácticas (BAL).

## ABSTRACT

L-glutamic acid is one of the main amino acids that is present in a wide variety of foods. It is mainly used as a food additive in the form of monosodium glutamate and is produced almost exclusively by fermentation. Considering the great commercial interest of L-glutamic acid, the discovery of strains with desirable biochemical and physicochemical characteristics, from diverse substrates, such as fermented foods and beverages, is extremely important for the amino acid market. The discovery of new species and strains producing L-glutamic acid with new attributes such as safety and probiotic potential provide the possibility of new applications, as well as obtaining the amino acid more effectively, safely and cheaply. Thus, the objective was to select lactic acid bacteria isolated from fermented foods with the capacity to produce glutamic acid, as well as to verify some probiotic attributes in vitro and to verify the best parameters of production of the amino acid. The bacteria from the agricultural microbiology culture collection (ACC) were qualitatively evaluated for their ability to synthesize L-glutamic by thin layer chromatography ( TLC ) and quantitatively by spectrophotometry using a standard curve. As for the probiotic potential, safety features were verified, as well as hydrophobicity, autoaggregation and coaggregation. The intracellular and extracellular production of the amino acid was quantified by High Performance Liquid Chromatography-HPLC. The lactic acid bacteria isolated from the Brazilian indigenous drink “Yakupa” belonging to the species *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0209 and CCMA 0205 showed greater potential in the production of L-glutamic acid, intracellular and extracellular, respectively. The empirical prediction models developed were considered adequate ( $p < 0.05$ ) to describe the extracellular and intracellular production of L-glutamic acid from the CCMA 0205 strain ( $R^2 = 0.83$  and  $0.84$ ). The optimal conditions established for the production of L-glutamic acid by the strain were pH 4.5; temperature of 35°C and time of 72 hours. The study presents the promising potential of lactic acid bacteria isolated from a Brazilian indigenous drink in the production of L-glutamic acid and provides relevant information for the production of the amino acid by *L. fermentum* (strain CCMA 0205).

**Keywords:** L-glutamic acid. Fermentation processes. DCCR. RSM. L-amino acids. Lactic Acid Bacteria (LAB).

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>11</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Aminoácidos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Metabolismo dos aminoácidos</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Biossíntese do ácido L-glutâmico</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Ácido glutâmico</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Microrganismos produtores de ácido L-glutâmico</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Bactérias ácido lácticas (BAL)</b> .....	<b>19</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>21</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS*</b> .....	<b>24</b>
	<b>ARTIGO 1 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO POR</b> <i>Limosilactobacillus fermentum</i> <b>ISOLADO DE BEBIDA INDÍGENA</b> <b>BRASILEIRA “YAKUPA”</b> .....	<b>25</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Microrganismos e condições de cultivo</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2</b>	<b>Seleção inicial de potenciais cepas produtoras de ácido L-glutâmico</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Padronização do inóculo e condições de cultivo</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Determinação qualitativa de ácido L-glutâmico por Cromatografia em camada delgada (CCD)</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.3</b>	<b>Determinação quantitativa de ácido L-glutâmico</b> .....	<b>29</b>
<b>2.3</b>	<b>Seleção de cepas produtoras de ácido L-glutâmico</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Extração de ácido L-glutâmico extracelular e intracelular</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Derivatização do ácido L-glutâmico extraído intracelular e extracelular</b> .....	<b>30</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Determinação do teor de ácido L-glutâmico</b> .....	<b>31</b>
<b>2.3.4</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>Potencial probiótico</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4.1</b>	<b>Testes de segurança: hemólise e DNAase</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Hidrofobicidade</b> .....	<b>32</b>
<b>2.4.3</b>	<b>Auto-agregação</b> .....	<b>33</b>

2.4.4	Coagregação .....	33
3	RESULTADOS .....	34
4	DISCUSSÃO .....	40
5	CONCLUSÃO .....	42
	REFERÊNCIAS.....	43
	<b>ARTIGO 2 - EFEITO DO PH, TEMPERATURA E TEMPO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO POR BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁTICO USANDO ABORDAGEM DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL.....</b>	<b>46</b>
1	INTRODUÇÃO.....	47
2	METODOLOGIA.....	48
2.1	Microrganismos .....	48
2.2	Produção de ácido L-glutâmico .....	48
2.3	Extração de ácido L-glutâmico extracelular .....	48
2.4	Extração de ácido L-glutâmico intracelular.....	49
2.5	Derivatização do ácido L-glutâmico extraído .....	49
2.6	Determinação do teor de L-glutâmico .....	49
2.7	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	50
3	RESULTADOS .....	51
4	DISCUSSÃO .....	62
5	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS.....	65

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

Os L-aminoácidos são os principais componentes biológicos usados comercialmente como aditivos em alimentos, suplementos alimentares, compostos de infusão, agentes terapêuticos e precursores para a síntese de peptídeos ou produtos químicos baseados na agricultura (BASHIR *et al.*, 2022; YUGANDHAR *et al.*, 2006).

O ácido L-glutâmico foi o primeiro aminoácido produzido comercialmente e é o aminoácido mais utilizado mundialmente (SHYAMKUMAR *et al.*, 2014). Trata-se de um aminoácido multifuncional usado principalmente como um aditivo alimentar e intensificador de sabor (MALULY; ARISSETO-BRAGOTTO; REYES, 2017). Além disso, é um dos principais precursores específicos para outros aminoácidos, como arginina e prolina, e de outras moléculas bioativas como o ácido gama-aminobutírico (GABA) (ZAREIAN *et al.*, 2012).

Diferentes microrganismos podem excretar ácido glutâmico por meio de processo fermentativos, em destaque *Corynebacterium glutamicum* amplamente utilizado na indústria. Além disso, outras cepas potencialmente capazes de produzir ácido L-glutâmico tem sido estudadas (KEERTHI *et al.*, 2016; YUGANDHAR *et al.*, 2010), dentre elas as bactérias ácido lácticas (BAL) (ZAREIAN *et al.*, 2012).

O grupo das BAL compreende diferentes gêneros de bactérias gram positivas, dentre eles, os *Lactobacillus* (atualmente reorganizados em vários gêneros) (ZHENG *et al.*, 2020) que consiste em um amplo e diverso grupo de espécies bacterianas, que em geral não são patogênicas (MARTINEZ *et al.*, 2014; WORAHARN *et al.*, 2015). São bactérias frequentemente encontradas em diferentes alimentos fermentados e ainda que não possam, por definição, serem consideradas probióticas, muitas delas são evolutivamente relacionadas a microrganismos probióticos e compartilham as mesmas características responsáveis pelas propriedades promotoras da saúde (REZAC *et al.*, 2020). Contudo, pouco se sabe sobre a produção de ácido glutâmico por estes microrganismos. Assim, o rastreamento de BALs capazes de produzir o aminoácido com características produtivas, competitivas e com elevadas capacidades metabólicas, pode ser um potencial tecnológico bastante interessante para a indústria. Tendo em vista seu caráter seguro e a sua constante aplicabilidade no setor alimentício.

Os principais fatores de otimização do processo de fermentação do ácido L-glutâmico (pH, tempo, temperatura) podem ser usados para gerar informações preditivas precisas. Estas

informações permitem compreender a via metabólica de biossíntese do ácido glutâmico por BAL, e vislumbrar a aplicação em processos de bioprodução eficazes no futuro, como por exemplo, maximização das taxas de produção deste aminoácido.

Diante desse contexto, o presente trabalho objetivou selecionar bactérias do ácido láctico isoladas de alimentos fermentados com capacidade de produção ácido glutâmico, bem como verificar algumas características probióticas das cepas selecionadas e otimizar o processo de produção dos principais parâmetros.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aminoácidos

Os aminoácidos possuem um  $\alpha$ -carbono que está ligado a quatro grupos funcionais: um grupo amina (-NH<sub>2</sub>), um grupo carboxila (-COOH), um átomo de hidrogênio (H) e uma cadeia lateral (-R). O carbono  $\alpha$  é um estereocentro (ou centro quiral) da molécula, pois depende do arranjo espacial desses quatro grupos diferentes. Assim, os aminoácidos, com exceção da glicina, apresentam duas formas isoméricas: o levógiro (L) e dextrógiro (D) que ocorrem na natureza (ALIASHKEVICH; ALVAREZ; CAVA, 2018). Sendo que, os L-aminoácidos também denominados proteínogênicos são utilizados pelas células para sintetizar proteínas (ALIASHKEVICH; ALVAREZ; CAVA, 2018).

Existem principalmente 3 tipos diferentes de produção de aminoácidos: extração a partir de hidrolisados protéicos (majoritariamente de origem vegetal), síntese química (por vezes mais acessível economicamente que a síntese microbiana, porém o produto é obtido em uma mistura racêmica, opticamente inativa de isômeros D e L) e a produção microbiológica por meio da fermentação (SATO, 2001).

Os aminoácidos são moléculas orgânicas bioquimicamente atrativas e promissoras. Sua aplicabilidade varia de aditivos de ração animal, intensificadores de sabor, ingredientes em cosméticos, nutrientes especiais em campos farmacêuticos e médicos (D'ESTE; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2018).

Devido a demanda mundial, o mercado de aminoácidos deverá aumentar significativamente, com taxa de crescimento de aproximadamente de 5,6% sobre 2017-2022 e segundo estimativas atingindo 25,6 bilhões dólares em 2022. O constante aumento se deve principalmente aos setores alimentícios, farmacêutico, cosméticos, sobretudo ao aumento da procura por produtos dos segmentos relacionados a aditivos para ração animal e suplementos alimentares (INDUSTRY EXPERTS, 2018; TMR, 2018; MORDOR INTELLIGENCE, 2018).

Assim, a disseminação do uso dos aminoácidos e o aprimoramento de sua ciência nos últimos anos, principalmente em relação a técnicas de engenharia genética, processos biotecnológicos e, em particular, a fermentação com o auxílio de cepas como *C. glutamicum* ou *Escherichia coli* (geneticamente modificado), desempenham um papel significativo na produção industrial da maioria dos aminoácidos (HASHIMOTO, 2016). Contudo, apesar das

inúmeras vantagens da produção de aminoácidos fermentativos, o processo ainda precisa de melhorias significativas, com aumento da produtividade e redução dos custos de produção (D'ESTE; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2018).

### 2.1.1 Metabolismo dos aminoácidos

O microrganismo modelo para os estudos da biossíntese de aminoácidos é o *C. glutamicum*. Três principais vias foram identificadas como responsáveis em gerar aminoácidos: Embden-Meyerhof- Via de Parnas (glicólise), a via das pentoses fosfato (PPP) e em destaque, o ciclo do ácido tricarboxílico ou ácido cítrico (krebs). Um complexo aparato enzimático está envolvido na conversão do carbono nestes diferentes processos, gerando moléculas intermediárias, que por sua vez são precursoras de diferentes aminoácidos (EGGELING; SAHM, 2011).

Na glicólise, responsável pelo catabolismo dos açúcares, a glicose é convertida em piruvato e transportadores de energia, como ATP e NADH. Já no ciclo de Krebs, o acetil-CoA, produzido pela degradação de açúcares, é oxidado através de várias etapas em CO<sub>2</sub>, gerando NADH na sua fase catabólica. Além destes também pode produzir dois precursores dos aminoácidos; glutamato e aspartato, a partir de diferentes intermediários tais como succinil-CoA. Já a PPP é responsável por fornecer o poder redutor NADPH, ribose 5-fosfato e eritrose 4-fosfato, sendo os dois últimos precursores para a biossíntese dos aminoácidos (D'ESTE; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2018).

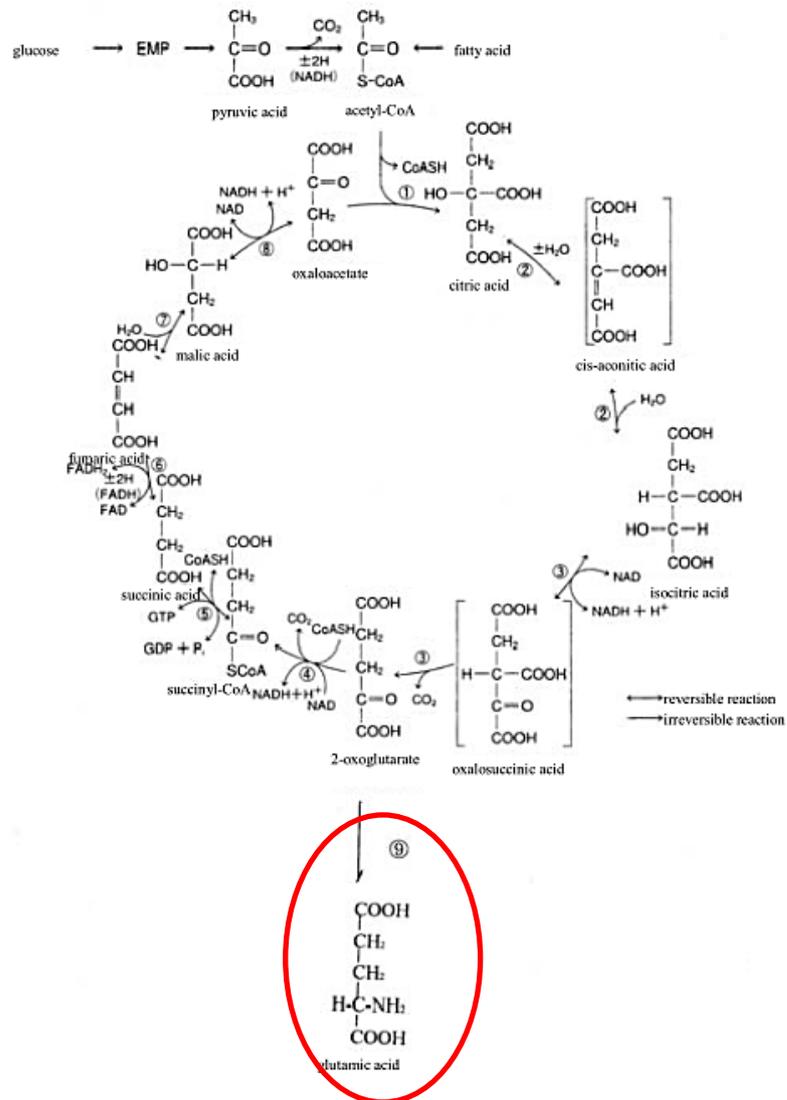
### 2.1.2 Biossíntese do ácido L-glutâmico

Para a biossíntese do ácido glutâmico, a glicose é decomposta em fosfoenol piruvato e depois em piruvato, por diferentes reações enzimáticas pela via glicolítica. O piruvato é convertido em acetil-CoA. O fosfoenol piruvato (pela enzima fosfoenol piruvato carboxilase) pode ser independentemente convertido em oxaloacetato. Ambas as reações de carboxilação requerem biotina como cofator (SATO, 2001).

A próxima série de reações que se seguem são conhecidas como reações pertencentes ao ciclo do ácido cítrico (Krebs), em que o metabólito chave,  $\alpha$ -cetoglutarato, é produzido. Rotineiramente, no ciclo de ácido cítrico,  $\alpha$  - cetoglutarato é influenciado pela enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase para formar succinil CoA (D'ESTE; ALVARADO-MORALES;

ANGELIDAKI, 2018). Contudo, para a produção de ácido glutâmico, o  $\alpha$ -cetoglutarato é convertido em ácido L-glutâmico (FIGURA 1) pela enzima glutamato desidrogenase (GDH). O fornecimento e a utilização de  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  ocorre de forma cíclica por meio da participação das duas enzimas, nomeadamente isocitrato desidrogenase e glutamato desidrogenase. Assim, a partir de uma molécula de glicose pode ser formada uma molécula de ácido glutâmico (HIRASAWA; SHIMIZU, 2016).

Figura 1 - Biossíntese do ácido glutâmico (reação 9) a partir da glicose.



Fonte: Nakamori (2008).

O requisito essencial para a produção de ácido glutâmico é a alta capacidade de fornecimento dos metabólitos do ciclo do ácido cítrico. Isso é possível por uma conversão eficiente de fosfoenol piruvato, bem como piruvato para oxaloacetato. Portanto, existem duas enzimas (fosfoenol piruvato carboxilase e piruvato carboxilase) para produzir oxaloacetato

eficientemente, enquanto há apenas uma enzima (piruvato desidrogenase) para a formação de acetil CoA. Outra enzima chave que pode facilitar a produção ideal de ácido glutâmico é a  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase do ciclo do ácido cítrico. Sua atividade tem que ser substancialmente baixa para uma boa síntese do ácido glutâmico, como é o caso de *C. glutamicum* (IKEDA, NAKAGAWA, 2003).

Sabe-se que expor as células a antibióticos (por exemplo, penicilina) e surfactantes reduz a atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, enquanto a atividade da glutamato desidrogenase permanece inalterada. Deste modo, para regulação da biossíntese do aminoácido, a oxidação do  $\alpha$ -cetoglutarato através do ciclo do ácido cítrico deve ser minimizada, enquanto a formação do ácido glutâmico é maximizada (SATO, 2001; IKEDA, NAKAGAWA 2003).

### 2.1.3 Ácido glutâmico

O ácido glutâmico (símbolo Glu ou E) também conhecido como glutamato, é um dos 20-22 aminoácidos que é utilizado por quase todos os seres vivos na biossíntese de proteínas. Não é essencial em humanos, o que significa que o corpo pode sintetizá-lo, especificamente no fígado. São produzidos mediante os códons genéticos GAA e GAG. O glutamato representa cerca de 9% dos aminoácidos das proteínas do organismo humano. É o mais frequente dos aminoácidos na sequência primária de nossas proteínas. É também um neurotransmissor excitatório, de fato o mais abundante no sistema nervoso dos vertebrados. Além disso, serve como precursor para a síntese do ácido gama-aminobutírico inibitório (GABA), neurotransmissor inibitório do sistema nervoso dos animais (YIN; CHENG; FANG, 2018).

O ácido glutâmico pode ser precursor de diferentes aminoácidos, incluindo a ornitina e a arginina. Quando aminado, o ácido glutâmico forma o importante aminoácido glutamina. O ácido glutâmico é um dos dois aminoácidos (o outro é o ácido aspártico) que possui uma carga negativa no pH fisiológico. Esta carga negativa torna o ácido glutâmico uma molécula bastante polar e presente no exterior de proteínas e enzimas, ficando livre para interagir com os meios celulares aquosos que o cercam (SATO, 2001).

O ácido glutâmico é o aminoácido mais importante como um intensificador de sabor, usado como um aditivo alimentar na forma de glutamato monossódico (MSG), muito

conhecido devido ao seu sabor único “Umami” (MALULY; ARISSETO-BRAGOTTO; REYES, 2017).

Inicialmente, o MSG era produzido pela hidrólise vegetal, principalmente de glúten de proteína de trigo ou soja desengordurada, um subproduto da produção de molho de soja, com o uso de ácidos. Contudo, novos métodos para produzir ácido glutâmico foram necessários devido ao aumento da demanda por MSG e a escassez de matérias-primas para a produção. Assim, os pesquisadores começaram a investigar a produção de ácido glutâmico por células microbianas (HIRASAWA; SHIMIZU, 2016).

Diversas técnicas de fermentação têm sido utilizadas para a produção de ácido glutâmico (como fermentação contínua e batelada) (AMIN; AL-TALHI, 2007). E para tal, além de glicose, o ácido glutâmico foi produzido com vários tipos de matérias-primas utilizando fermentação de hidrolisado de resíduos de palma (DAS *et al.*, 1995; TAVAKKOLI; HAMIDI-ESFAHANI; AZIZI, 2012), amido de mandioca (JYOTHI *et al.*, 2005) e bagaço de cana-de-açúcar (AMIN; AL-TALHI, 2007; ABOU-TALEB, 2015).

O processo convencional de produção envolve várias etapas, como fermentação, centrifugação, adsorção de carbono, evaporação, cristalização, troca iônica e outras diferentes etapas, para obter o ácido glutâmico na concentração e purificação desejadas. Apesar do potencial e variável aplicação em larga escala, a produção econômica de ácido glutâmico de alta pureza tem permanecido um desafio por décadas, principalmente devido às várias etapas de processamento e aos fatores de custo associados (KUMAR; VIKRAMACHAKRAVARTHI; PAL, 2014).

## 2.2 Microrganismos produtores de ácido L-glutâmico

Em termos de quantidade de aminoácidos produzidos por fermentação, o L-glutamato é o aminoácido mais importante produzido por ano (3,3 milhões de toneladas), seguido por L-lisina (2,2 milhões de toneladas) (SANCHEZ *et al.*, 2018). O ácido L-glutâmico foi o primeiro aminoácido a ser produzido por microrganismos.

A bactéria *C. glutamicum* foi usada pela primeira vez para a fabricação em larga escala de ácido glutâmico e continua sendo usada com sucesso até hoje (SANCHEZ; DEMAÏN, 2014; HIRASAWA; SHIMIZU, 2016).

*C. glutamicum* é um bacilo aeróbio, gram-positivo, capaz de crescer em meio salino mineral simples com glicose, desde que a biotina não seja adicionada. Além da limitação da

biotina, uma variedade surpreendentemente grande de outros tratamentos também resultam em excreção de L-glutamato, por exemplo, adição de detergentes selecionados, como Tween-40, adição de penicilina, uso de cepas auxotróficas de ácido graxo entre outros (EGGELING; SAHM, 2011). No geral, o metabolismo do glutamato desempenha um papel importante na resistência ao estresse ácido e em várias outras condições ambientais em bactérias bem estudadas, como *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (FEEHILY; KARATZAS, 2013).

Outros microrganismos, embora usados em menor grau devido ao baixo rendimento, já foram empregados para a produção de ácido glutâmico. Os gêneros *Arthrobacter* (VELDKAMP; VAN DEN BERG; ZEVENHUIZEN, 1963), *Micobacteria*, *Brevibacterium* (CHOI; NIHIRA; YOSHIDA, 2004), *Pseudomonas* (SHYAMKUMAR *et al.*, 2014) e *Bacillus* (CHAO ; FOSTER, 1958; LAWAL *et al.*, 2011; ABOU-TALEB, 2015) já foram utilizados. Todos estes microrganismos têm certos caracteres morfológicos e fisiológicos comparáveis ao *C. glutamicum*. Bioquimicamente, as bactérias produtoras de ácido glutâmico têm alta atividade da glutamato desidrogenase e baixa atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (HIRASAWA; WACHI, 2016).

### 2.2.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)

As Bactérias do Ácido Láctico (BAL) estão presentes em diferentes tipos de alimentos fermentados, como vegetais (kimchi e chucrute) e laticínios (iogurte e queijo). Algumas BALs tem características probióticas, incluindo a manutenção da microbiota intestinal, e propriedades antioxidantes, antialérgicas e anticancerígenas, e seu uso aumentou com o objetivo de melhorar a saúde ou nutrição (LEE; PAIK, 2017).

O antigo gênero *Lactobacillus*, que recentemente foi redistribuído e reorganizado filogeneticamente em diferentes outros gêneros (ZHENG *et al.*, 2020), compreende um grande e heterogêneo número de espécies das bactérias do ácido láctico (BAL). Estas bactérias têm por características serem gram-positivas, anaeróbias facultativas ou microaerófilas. Apresentam muitas propriedades funcionais, incluindo melhoria do sistema imunológico, prevenção de infecção fúngica e equilíbrio da microbiota intestinal (DE ANGELIS *et al.*, 2016).

Além disso, as espécies de BAL podem aumentar a vida útil, melhorar qualidade nutricional e a segurança microbiana de alimentos fermentados, visto que a maioria dos lactobacilos são considerados não patogênicos e geralmente reconhecidos como seguros

(*Generally Recognized As Safe -GRAS*), segundo a designação da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (LEE *et al.*, 2017).

A produção de ácido glutâmico em bactérias é principalmente dependente da glutamato desidrogenase citoplasmática (GDH) que catalisa essa formação de aminoácidos a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato. Demonstrou-se que esta enzima ocorre em alta frequência e atividade na espécie *Lactiplantibacillus plantarum*, com o gene codificador de GDH (*gdh*) implicando uma atividade elevada (TANOUS *et al.*, 2005; ZAREIAN *et al.*, 2012).

A seleção de novos microrganismos produtores de ácido glutâmico como cepas de bactérias do ácido láctico isoladas de alimentos fermentados, possibilita produzir aminoácidos sob condições diferenciadas das conhecidas até o momento (como em alta temperatura, condições ácidas e fontes de carbono de baixo custo) tornando-se inovações que podem aumentar a produção de ácido glutâmico de forma mais econômica e sustentável (HIRASAWA; SHIMIZU, 2016).

## REFERÊNCIAS

- ABOU-TALEB, K. A. Enhancing Production of Amino Acids from *Bacillus* spp . Using Batch and Fed-batch Fermentation Strategies. **British Microbiology Research Journal**, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 257–272, 2015.
- ALIASHEVICH, A.; ALVAREZ, L.; CAVA, F. New insights into the mechanisms and biological roles of D-amino acids in complex eco-systems. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 9, n. APR, p. 683, 2018.
- AMIN, G. A.; AL-TALHI, A. Production of L-glutamic Acid by Immobilized Cell Reactor of the Bacterium *Corynebacterium glutamicum* Entrapped into Carrageenan Gel Beads. **World Applied Sciences Journal**, [S.l.], v. 2, n. 1, p. 62–67, 2007.
- BASHIR, S. *et al.* RSM-Based Optimization of Fermentation Conditions and Kinetic Studies of Glutamic Acid and Lysine Production by *Corynebacterium glutamicum*. **Journal of Nanomaterials**, [S.l.], v. 2022, 2022.
- CHAO, K-C.; FOSTER, J. W. A glutamic acid-producing bacillus. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 77, n. 6, p. 715, 1959.
- CHOI, S. U.; NIHIRA, T.; YOSHIDA, T. Enhanced glutamic acid production of *Brevibacterium* sp. with temperature shift-up cultivation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S.l.], v. 98, n. 3, p. 211–213, 2004.
- DAS, K. *et al.* Fermentation and recovery of glutamic acid from palm waste hydrolysate by ion-exchange resin column. **Biotechnology and Bioengineering**, [S.l.], v. 48, n. 5, p. 551–555, 1995.
- DE ANGELIS, M. *et al.* Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. **Proteomics**, [S.l.], v. 16, n. 6, p. 946–962, 2016.
- D'ESTE, M.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. Amino acids production focusing on fermentation technologies—A review. **Biotechnology advances**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 14-25, 2018.
- EGGELING, L.; SAHM, H. Amino Acid Production. **Food Ingredients**, [S.l.], v. 3, p. 531–539, 2011.
- FEEHILY, C.; KARATZAS, K. A. G. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. **Journal of Applied Microbiology**, [S.l.], v. 114, n. 1, p. 11–24, 2013.
- HASHIMOTO, S-I. Discovery and History of Amino Acid Fermentation. **Adv Biochem Eng Biotechnol.**, [S.l.], v. 159, p. 15-34, 2017.
- HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Glutamic acid fermentation: Discovery of glutamic acid-producing microorganisms, analysis of the production mechanism, metabolic engineering, and industrial production process. *Industrial Biotechnology*. **Products and Processes**, [S.l.], [S.v.], [S.n.], p. 339–360, 2016.

IKEDA, M.; NAKAGAWA, S. The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 62, n. 2, p. 99-109, 2003.

INDUSTRY EXPERTS. **Global Amino Acids Market** – Products and Applications (Out 2017), 2018.

JYOTHI, A. N. *et al.* Optimisation of glutamic acid production from cassava starch factory residues using *Brevibacterium divaricatum*. **Process Biochemistry**, [S.l.], v. 40, n. 11, p. 3576–3579, 2005.

KEERTHI, U. *et al.* Fermentative Production of L-Glutamic Acid by the Bacillus Species Isolated from Sewage Contaminated Soil. **European Journal of Pharmaceutical and medical Research.**, [S.l.], v. 3, n. 2, p. 214-218, 2016.

KUMAR, R.; VIKRAMACHAKRAVARTHI, D.; PAL, P. Production and purification of glutamic acid: A critical review towards process intensification. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [S.l.], v. 81, p. 59–71, 2014.

LAWAL, A. K. *et al.* L-Glutamic acid production by Bacillus spp. isolated from vegetable proteins. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 10, n. 27, p. 5337–5345, 2011.

LEE, N-K.; PAIK, H-D. Bioconversion Using Lactic Acid Bacteria: Ginsenosides, GABA, and Phenolic Compounds. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 869–877, 2017.

LEE, S. B. *et al.* Mass-Based Metabolomic Analysis of Lactobacillus sakei and Its Growth Media at Different Growth Phases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 925–932, 2017.

MALULY, H. D. B.; ARISSETO-BRAGOTTO, A. P.; REYES, F. G. R. Monosodium glutamate as a tool to reduce sodium in foodstuffs: Technological and safety aspects. **Food Science and Nutrition**, [S.l.], v. 5, n. 6, p. 1039–1048, 2017.

MARTINEZ, R. M. *et al.* Molecular analysis and clinical significance of lactobacillus spp. Recovered from clinical specimens presumptively associated with disease. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.l.], v. 52, n. 1, p. 30–36, 2014.

MORDOR INTELLIGENCE. **Global Food Amino Acid Market** - Growth, Trends and Forecasts (2019 - 2024), 2018.

NAKAMORI, S. Survey Report on the Systematization of Amino Acid M Fermentation Technology. **National Museum of Nature and Science Survey Report on the Systematization of Technology**, [S.l.], v. 11, March. 2008.

REZAC, S. *et al.* Fermented foods as a dietary source of live organisms. **Frontiers in microbiology**, [S.l.], v. 9, p. 1785, 2018.

SANCHEZ, S. *et al.* Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids. **Journal of Antibiotics**, [S.l.], v. 71, n. 1, p. 26–36, 2018.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Production of Amino Acids. **Encyclopedia of Food Microbiology**, [S.l.], v. 1, n. 2, p. 778–784, 2014.

SATO, S. Produção de Aminoácidos. *In*: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e enzimáticos*. 1. Ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. V. 3, p. 155-177, 2001.

SHYAMKUMAR, R. *et al.* Production of L-glutamic Acid with *Corynebacterium glutamicum* (NCIM 2168) and *Pseudomonas reptilivora* ( NCIM 2598 ): A Study on Immobilization and Reusability. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 163–168, 2014.

TANOUS, C. *et al.* The Gene Encoding the Glutamate Dehydrogenase. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 187, n. 14, p. 5019–5022, 2005.

TAVAKKOLI, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; AZIZI, M. H. Optimization of *Corynebacterium glutamicum* Glutamic Acid Production by Response Surface Methodology. **Food and Bioprocess Technology**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 92–99, 2012.

TMR. Transparency Market Research. **D-amino Acid Market** – Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast, 2018–2026, 2018.

VELDKAMP, H.; VAN DEN BERG, G.; ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Glutamic acid production by *Arthrobacter globiformis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 35–51, 1963.

WORAHARN, S. *et al.* Screening and kinetics of glutaminase and glutamate decarboxylase producing lactic acid bacteria from fermented Thai foods. **Food Science and Technology**, [S.l.], v. 34, n. 4, p. 793–799, 2015.

YIN, Y.; CHENG, C.; FANG, W. Effects of the inhibitor of glutamate decarboxylase on the development and GABA accumulation in germinating fava beans under hypoxia-NaCl stress. **RSC Advances**, [S.l.], v. 8, n. 36, p. 20456–20461, 2018.

YUGANDHAR, N. M. *et al.* Optimization of glutamic acid production by *Brevibacterium roseum*. **Research Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 5, n. 11, p. 1150-1154, 2010.

ZAREIAN, M. *et al.* A Glutamic Acid-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Fermented Foods. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 5, p. 5482–5497, 2012.

ZHENG, J. *et al.* 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**, [S.l.], v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS\***

**Artigos redigidos conforme a norma para publicação periódica científica NBR6022  
(ABNT, 2018).**

## **ARTIGO 1 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO POR *Limosilactobacillus fermentum* ISOLADO DE BEBIDA INDÍGENA BRASILEIRA “YAKUPA”**

### **RESUMO**

O ácido L-glutâmico é um dos principais aminoácidos presentes em uma variedade de alimentos. É usado principalmente como aditivo alimentar e intensificador de sabor, além de ser um importante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso humano. Dessa forma, aumentou-se a necessidade de pesquisas sobre sua produção usando novos microrganismos, bem como etapas do processo fermentativo. Objetivou-se selecionar bactérias do ácido láctico isoladas de alimentos fermentados com capacidade de produção de ácido L-glutâmico, e verificar características probióticas das cepas isoladas. As bactérias provenientes da coleção de cultura de microrganismo (CCMA) foram cultivadas em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e avaliadas de forma qualitativa, quanto à capacidade de sintetizar L-glutâmico pela cromatografia de camada delgada (CCD); e quantitativa, por espectrofotometria com curva padrão. A produção intracelular e extracelular do aminoácido foi quantificada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência-CLAE e, posteriormente, foi avaliado o potencial probiótico. A cepa *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0209 obteve maior concentração de ácido L-glutâmico intracelular (44,83 mmol / L), enquanto a cepa CCMA 0205, da mesma espécie, apresentou maior concentração extracelular do aminoácido (31,97 mmol / L), e ambas apresentaram atributos probióticos *in vitro*. Conclui-se que as cepas CCMA 0209 e CCMA 0205 isoladas de bebida indígena brasileira “Yakupa”, apresentam potencial probiótico e são produtoras de ácido L-glutâmico.

**Palavras-chave:** Aminoácido. Ácido L-glutâmico. BAL. Screening. *Limosilactobacillus fermentum*.

### **L-GLUTAMIC ACID PRODUCTION BY *Limosilactobacillus fermentum* ISOLATED FROM BRAZILIAN INDIGENOUS BEVERAGE “YAKUPA”**

#### **ABSTRACT**

L-glutamic acid is one of the main amino acids present in a variety of foods. It is mainly used as a food additive and flavor enhancer, as well as being an important excitatory neurotransmitter in the human nervous system. Thus, the need for research on its production using new microorganisms, as well as stages of the fermentation process, has increased. The objective was to select lactic acid bacteria isolated from fermented foods with the capacity to produce L-glutamic acid, and to verify the probiotic characteristics of the isolated strains. Bacteria from the microorganism culture collection (CCMA) were cultivated on De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) and qualitatively evaluated for their ability to synthesize L-glutamic by thin layer chromatography (TLC); and quantitative, by spectrophotometry with a standard curve. The intracellular and extracellular production of the amino acid was quantified by High Performance Liquid Chromatography-HPLC and, subsequently, the probiotic potential was evaluated. The strain *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0209 had a higher concentration of intracellular L-glutamic acid (44.83 mmol / L), while the strain CCMA 0205, of the same species, had a higher extracellular concentration of the amino acid

(31.97 mmol / L), and both showed probiotic attributes in vitro. It is concluded that the strains CCMA 0209 and CCMA 0205 isolated from the Brazilian indigenous drink “Yakupa”, have probiotic potential and are producers of L-glutamic acid.

**Keywords:** Amino acid. L-glutamic acid. BAL. Screening. *Limosylactobacillus fermentum*.

## 1 INTRODUÇÃO

Os L-aminoácidos têm amplo espectro de uso comercial como aditivos e suplementos alimentares, compostos de infusão, agentes terapêuticos e precursores para a síntese de peptídeos ou agroquímicos (D'ESTE; ALVARADO-MORALES; ANGELIDAKI, 2018). Dentre eles, o ácido L-glutâmico é o mais produzido e utilizado mundialmente (SHYAMKUMAR *et al.*, 2014; WENDISCH, 2014).

O ácido L-glutâmico é um aminoácido não essencial, proteínogênico e multifuncional, que desempenha função gástrica, discernimento do quinto sabor básico do paladar humano denominado “Umami”, e ainda tem função importante na sinalização de neurotransmissores. Além disso, é precursor de outros aminoácidos como prolina, arginina e do ácido gama-aminobutírico (GABA) (ZAREIAN *et al.*, 2012; MALULY; ARISSETO-BRAGOTTO; REYES, 2017).

O principal método para a produção industrial de aminoácidos é a fermentação (KUMAR; VIKRAMACHAKRAVARTHI; PAL, 2014), sendo que o microrganismo mais utilizado na indústria é a bactéria gram-positiva *Corynebacterium glutamicum*. A produção de ácido glutâmico em *C. glutâmico* é a partir do  $\alpha$ -cetoglutarato (precursor no ciclo do ácido cítrico) com a supressão da atividade da enzima  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e, conseqüentemente, a maior atividade da enzima glutamato desidrogenase (SHIMIZU *et al.*, 2003).

Devido as crescentes aplicações deste aminoácido, baixo custo no processo de produção e alta produtividade são os principais objetivos da biotecnologia moderna (SANCHEZ *et al.*, 2018). Para tanto, a escolha de uma cepa produtora eficiente de ácido L-glutâmico é essencial.

Alguns estudos selecionaram e identificaram bactérias do ácido láctico (BAL) com produção promissora de ácido L-glutâmico isolados de substratos e alimentos fermentados. Dentre elas estão a cepa *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*) MNZ isolada de

alimento fermentado tradicional da Málasia (ZAREIAN *et al.*, 2012) e a cepa *Lactococcus lactis* HY7803 isolada de produto lácteo (LEE *et al.*, 2021). Além disto, BALs apresentam o status de ‘geralmente reconhecida como segura’ ou *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e *Qualified Presumption of Safety* (QPS) nos EUA e UE, respectivamente (YAZGAN *et al.*, 2021), o que aumenta seu potencial de aplicação biotecnológica (LEE *et al.*, 2017).

Alimentos fermentados, principalmente bebidas, são fontes de microrganismos industrialmente importantes que devem ser estudados para se conhecer o potencial biotecnológico. Uma vez que microrganismos nativos podem ser mais competitivos e com capacidades metabólicas elevadas para a produção de metabolitos como os aminoácidos. Dessa forma, objetivou-se selecionar cepas de bactérias do ácido láctico isoladas de diferentes alimentos fermentados quanto a sua capacidade de produção de ácido L-glutâmico e verificar algumas características probióticas.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas 142 bactérias do ácido láctico (BAL): *Levilactobacillus brevis* (*L. brevis*), *Lacticaseibacillus casei* (*L. casei*), *Lacticaseibacillus paracasei* (*L. paracasei*), *Lactiplantibacillus plantarum* (*L. plantarum*) e *Limosilactobacillus fermentum* (*L. fermentum*) provenientes de alimentos fermentados (TABELA 1) pertencentes a Coleção de Cultura de Microbiologia Agrícola, CCMA (Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Brasil). As cepas foram reativadas em caldo MRS (deMan, Rogosa e Sharpe).

Tabela 1 - Cepas de bactérias do ácido láctico isoladas de alimentos fermentados utilizadas nesse estudo (n = 142). (continua)

Cepa	Nº de isolados	Código	Alimento/bebida fermentado
<i>Levilactobacillus brevis</i>	9	CCMA 0369, CCMA 0370, CCMA 0383, CCMA 0351, CCMA 0353, CCMA 0355, CCMA 1284, CCMA1057, CCMA 0063	café despolpado, var. Ouro amarelo cauim de semente de algodão cauim/amendoim e arroz fruto (Cerrado) Muxiba leite caprino linguiça fresca industrial
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	4	CCMA 0411, CCMA 0412, CCMA 0413, CCMA 0414	Chicha- arroz

Tabela 1 - Cepas de bactérias do ácido lático isoladas de alimentos fermentados utilizadas nesse estudo (n = 142). (conclusão)

Cepa	Nº de isolados	Código	Alimento/bebida fermentado
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	25	CCMA 0201, CCMA 0203, CCMA 0204, CCMA 0205, CCMA 0206, CCMA 0207, CCMA 0208, CCMA 0209, CCMA 0210, CCMA 0211, CCMA 0212, CCMA 0213, CCMA 0214, CCMA 0362, CCMA 0363, CCMA 0364, CCMA 0365, CCMA 0366, CCMA 0367, CCMA 0368, CCMA 0753, CCMA 0360, CCMA 0745, CCMA 0751, CCMA 0752	calugi/milho e mandioca/arroz cauim/ semente de algodão e arroz fermentação de cacau mandioca/ bebida indígena “Yakupa”
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	35	UFLA SAU 130, CCMA 0354, CCMA 0490, CCMA 0492, CCMA 0495, CCMA 0499, CCMA 0500, CCMA 0502, CCMA 0504, CCMA 0505, CCMA 0506, CCMA 0507, CCMA 0511, CCMA 0512, CCMA 0513, CCMA 0514, CCMA 0515, CCMA 0516, CCMA 0517, CCMA 0518, CCMA 0519, CCMA 0520, CCMA 0521, CCMA 0522, CCMA 0527, CCMA 0530, CCMA 0531, CCMA 0532, CCMA 0533, CCMA 0534, CCMA 0535, CCMA 0536, CCMA 0537, CCMA 0538, CCMA 0539	kefir feito com suco de maçã leite caprino linguiça suína maças
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	69	CCMA 0359, UFLA SAU 1, UFLA SAU 11, CCMA 0125, UFLA SAU 18, CCMA 0126, CCMA 0127, CCMA 0128, UFLA SAU 73, UFLA SAU 86, UFLA SAU 87, CCMA 0129, UFLA, SAU 101, UFLA SAU 125, UFLA SAU 127, UFLA SAU 131, UFLA SAU 132, CCMA 0130, UFLA SAU 145, CCMA 0131, CCMA 0132, UFLA SAU 186, CCMA 0133, UFLA SAU 204, UFLA SAU 213, UFLA SAU 217, UFLA SAU 220, CCMA 0134, CCMA 0135, UFLA SAU 245, CCMA 0202, CCMA 0489, CCMA 0509, CCMA 0528, CCMA 0529, CCMA 0361, CCMA 0238, CCMA 0670, CCMA 0676, CCMA 0677, CCMA 0678, CCMA1058, CCMA1059, CCMA1060, CCMA1061, CCMA1062, CCMA1063, CCMA1064, CCMA1065, CCMA1066, CCMA1067, CCMA1068, CCMA1069, CCMA1070, CCMA1071, CCMA1072, CCMA1073, CCMA1074, CCMA1075, CCMA1076, CCMA1077, CCMA1078, CCMA1079, CCMA1080, CCMA 0673, CCMA 0099, CCMA 0743, CCMA 0746, CCMA 0744	café despolpado, var. Catuaí vermelho café despolpado, var. Mundo novo café despolpado, var. Ouro amarelo cauim/ semente de algodão e arroz fermentação de cacau fruto (Cerrado) Pequi fruto/ cacau kefir feito com suco de maçã linguiça suína maçã mandioca/bebida indígena “Yakupa”

Fonte: Da autora (2022).

## **2.2 Seleção inicial de potenciais cepas produtoras de ácido L-glutâmico**

### **2.2.1 Padronização do inóculo e condições de cultivo**

A concentração da suspensão bacteriana foi realizada por comparação de turvação com o padrão de leitura 0,5 na escala McFarland e a absorbância da suspensão lida em espectrofotômetro ( $A_{600} = 0,3$ ), que corresponde a  $10^8$  UFC/mL. Após, foram realizadas diluições decimais até  $10^6$  UFC/mL.

Utilizou-se 1 mL de cada inóculo padronizado de cada cepa em 15 mL de caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) em tubos de ensaio de 15 mL e incubados microaerobicamente em estufa ( $30\text{ }^\circ\text{C}$  /7 dias) (ZAREIAN *et al.*, 2012). Para a condição de microaerobiose, os tubos foram vedados com rolhas de borracha visando obter um ambiente com menor concentração de  $\text{O}_2$  (COSTA *et al.*, 2012). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.2.2 Determinação qualitativa de ácido L-glutâmico por Cromatografia em camada delgada (CCD)**

Cromatografia em camada delgada (CCD) foi empregada para a detecção do ácido L-glutâmico no meio de cultura MRS. Após a fermentação, o meio de cultivo fermentado foi centrifugado e o sobrenadante coletado foi aplicado juntamente com o padrão de ácido glutâmico em placas contendo sílica (0,2 mm) e a corrida cromatográfica se deu em fase móvel contendo uma mistura de n-butanol: ácido acético: água (2:1:1). A visualização dos *spots* foi realizada por pulverização da solução de ninidrina/etanol (0,15%) e mantidos em estufa  $110\text{ }^\circ\text{C}$  por 3 min. Os valores de fator de retenção ( $R_f$ ) das amostras, que trata-se da razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel foram comparados ao valor  $R_f$  do padrão (SHYAMKUMAR *et al.*, 2014).

### **2.2.3 Determinação quantitativa de ácido L-glutâmico**

A determinação quantitativa de ácido L-glutâmico foi estimada por reação de cor de ninidrina e a absorbância foi medida a 570 nm. Foi utilizado 1 mL de cada amostra e, posteriormente, foi adicionado a 1 mL da solução de reagente de ninidrina a 2 % (p/v) em etanol a 95 % (v/v). A mistura foi aquecida em banho-maria por 2 min e em seguida resfriada em água corrente. A absorbância da solução colorida foi lida com espectrofotômetro a 570 nm

contra um branco (água substituindo a amostra). A quantidade de ácido glutâmico presente em cada amostra foi estimada a partir da curva padrão para ácido L-glutâmico (LAWAL *et al.*, 2011). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.3 Seleção de cepas produtoras de ácido L-glutâmico**

As cepas que apresentaram ácido L-glutâmico acima de 4 mg/mL foram selecionadas para produção de ácido L-glutâmico e avaliadas quanto a produção extracelular e intracelular. A produção do inóculo e cultivo foram os mesmos descritos no item 2.2.1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **2.3.1 Extração de ácido L-glutâmico extracelular e intracelular**

Para a extração extracelular, primeiramente as células foram separadas por centrifugação (8000 rpm/ 15 min/ 4 °C) e o sobrenadante foi diluído 50 vezes com ácido acético glacial 7% (v/v). Posteriormente, o mesmo foi centrifugado (8000 rpm/ 15 min/ 4 °C) e subsequente foi filtrado (membrana porosidade 0,22 µm) e por fim, recolhido para análise posterior (ZAREIAN *et al.*, 2012).

Para a extração intracelular, as células cultivadas no caldo MRS foram centrifugadas (8000 rpm/ 15 min/ 4 °C), lavadas com NaCl 0,9% (m/v) três vezes e ressuspensas em 20 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,0) (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,91 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,12 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/L). Posteriormente, foi acrescido 1,0 mL de etanol a 75% (v/v). O homogenato foi centrifugado (8000 rpm/ 15 min/ 4 °C) e o sobrenadante filtrado utilizando uma membrana filtrante (0,22 µm) (ZAREIAN *et al.*, 2012). O produto filtrado foi coletado e reservado para a análise quantitativa da concentração de ácido glutâmico.

#### **2.3.2 Derivatização do ácido L-glutâmico extraído intracelular e extracelular**

Uma alíquota de 500 µL de sobrenadante da amostra (ou solução padrão de ácido glutâmico para o controle) foi seca em dessecador sob vácuo em temperatura ambiente. Em seguida, o resíduo foi dissolvido em 100 µL de solução de etanol, água e trietilamina [2:2:1 (v/v)] e seco em estufa a 50 °C. Após, foram adicionados 150 µL de solução de etanol, água e trietilamina-PITC [7:1:1:1 (v/v)] ao resíduo e este permaneceu reagindo por 20 min à

temperatura ambiente. O reagente em excesso foi removido por meio de secagem em estufa 50 °C. A curva padrão do glutamato foi determinada aplicando o mesmo procedimento às soluções padrão de glutamato em diferentes concentrações (0,125; 0,100; 0,075; 0,050 e 0,025 mM) (ROSSETTI; LOMBARD, 1996).

### **2.3.3 Determinação do teor de ácido L-glutâmico**

A quantificação do ácido glutâmico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras derivatizadas foram dissolvidas em 250 µL de fase móvel inicial, consistindo de uma mistura de 80% de solução A (solução aquosa de 8,205 g de acetato de sódio, 0,5 mL de trietilamina e 0,7 mL de ácido acético em 1000 mL de água, pH final de 5,8) e 20% de solução B (acetonitrila- água (60:40), pH final de 5,8), acrescido de 250 µL de Hidróxido de sódio 6 M (NaOH) e subsequente mantido em banho maria (50 °C). Posteriormente, cada amostra foi filtrada utilizando-se membrana filtrante (0,22 µm). A separação foi realizada por cromatografia líquida em um aparelho HPLC 20AT Shimadzu (Shimadzu Corp., Japão). A coluna Prevail C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., Alltech, Illinois,) foi utilizada durante a análise. A fase móvel para eluição isocrática foi bombeada à vazão de 0,6 mL/min, temperatura de 27 °C e a detecção do ácido glutâmico foi a 254 nm (ROSSETTI; LOMBARD, 1996). O ácido glutâmico foi detectado por comparação dos valores de tempo de retenção (Rt) e espectros com padrão e determinados pela área de pico do cromatograma do HPLC. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **2.3.4 Análise Estatística**

A produção intracelular e extracelular quantificação de ácido glutâmico foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste de média (Scott Knott) utilizando o programa estatístico R ([S.d.]).

## 2.4 Potencial probiótico

### 2.4.1 Testes de segurança: hemólise e DNAse

A segurança das cepas que mais produziram ácido glutâmico foi investigada pela avaliação da hemólise e da atividade da DNAse (FONSECA *et al.*, 2021). A atividade hemolítica foi determinada inoculando as cepas em placas de ágar sangue contendo 5% de sangue de ovelha após 48 h de incubação a 37 °C. A ausência de efeito sobre as placas sanguíneas ( $\gamma$ -hemólise) foi considerada não hemolítica. As zonas esverdeadas ao redor das colônias ( $\alpha$ -hemólise) foram consideradas como atividade hemolítica parcial, e as cepas com áreas claras de hidrólise resultantes da lise das células sanguíneas ao redor das colônias foram classificadas como cepas hemolíticas ( $\beta$ -hemólise). Para o teste de DNAse, as cepas foram riscadas no meio de ágar de teste de DNAse (Difco, EUA) e as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h. Após este tempo, uma solução de HCl 1 M foi adicionada à placa. Uma zona clara ao redor das colônias após a incubação foi considerada positiva para a produção de DNAse. Para todos os testes, a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usada como controle positivo.

### 2.4.2 Hidrofobicidade

A hidrofobicidade da superfície celular de cada cepa foi avaliada medindo a afinidade microbiana ao xileno (FONSECA *et al.*, 2021). Após cultivo de 16 horas as células foram coletadas e centrifugadas (10.000 rpm por 10 min). O sedimento resultante foi lavado duas vezes com solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS) (pH = 7,2) e ressuspenso no mesmo tampão. A densidade óptica no comprimento de onda de 600 nm (OD600) da suspensão foi mensurada (A0) usando um espectrofotômetro (Spectrum, SP-2000UV). Em seguida, 1 mL de xileno foi adicionado a 3 mL de suspensão de células e misturado por vortex por 2 min. Em seguida, as fases água e xileno foram separadas por incubação por 1 h a 37 °C. A fase aquosa foi removida e a nova OD600 foi medida (A1). A porcentagem da hidrofobicidade da superfície celular foi calculada usando a Fórmula 1.

$$\text{Hidrofobicidade \%} = (1 - A1 / A0) \times 100 \quad (1)$$

As cepas foram então classificadas em microrganismos de baixa (0-34%), moderada (35-69%) e alta hidrofobicidade (70-100%).

### 2.4.3 Auto-agregação

As células LAB foram colhidas de uma cultura de 16 h em caldo MRS, lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2), ressuspensas no mesmo tampão e diluídas para uma DO600 de  $0,6 \pm 0,1$  (aproximadamente 7-8 Log CFU/mL). As suspensões de células bacterianas foram agitadas em vórtex por 10 s e posteriormente incubadas a 37 °C por 5 h. A porcentagem de autoagregação foi determinada usando Equação 1.

$$\text{Autoagregação \%} = (1 - A_t / A_0) \times 100 \quad (1)$$

Onde  $A_t$  representa a absorvância no tempo  $t = 5$  h e  $A_0$  representa a absorvância no tempo  $t = 0$  h (FONSECA *et al.*, 2021).

### 2.4.4 Coagregação

Para a coagregação, as cepas LAB foram cultivadas em caldo MRS por 16 h a 37 °C, enquanto *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) CDC 055 e *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis ATCC 564 foram cultivadas em caldo BHI (Brain-Heart Infusion) por 24 h a 37 °C. As suspensões bacterianas foram preparadas conforme descrito no teste de autoagregação acima. Volumes iguais (2 mL) de LAB e suspensões de patógenos humanos foram misturados por vortex (10 s) e incubados à temperatura ambiente sem agitação por 4 h. Os tubos de controle continham 2 mL da suspensão de cada cepa bacteriana. As absorvâncias (OD600) das misturas e controles foram medidas após incubação. A porcentagem de coagregação foi calculada usando a seguinte Fórmula 2.

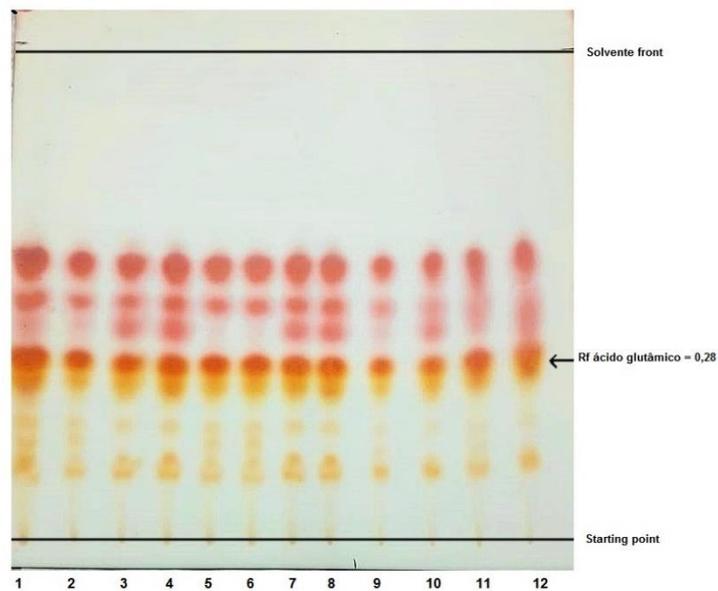
$$\text{Co-agregação \%} = [(A_{lab} + A_{pat}) - 2 A_{mix} / (A_{lab} + A_{pat})] \times 100$$

Onde  $A_{lab}$  e  $A_{pat}$  referem-se ao OD600 da célula LAB em suspensão e suspensão de células patogênicas, respectivamente, em tubos de controle e  $A_{mix}$  representa a absorvância da suspensão bacteriana mista testada após 4 h (FONSECA *et al.*, 2021).

### 3 RESULTADOS

Cepas BALs isoladas de diferentes substratos e alimentos fermentados foram examinadas individualmente em seu potencial para produzir ácido glutâmico. A detecção qualitativa de ácido L-glutâmico foi realizada por CCD. Todas as 142 cepas apresentaram a presença de uma mancha visível correspondente para o ácido glutâmico com fator de retenção (Rf) igual 0,28 comparado ao padrão de ácido glutâmico (FIGURA 1). As amostras apresentaram resultado idêntico ao padrão.

Figura 1 - Perfil cromatográfico (CCD) da produção de ácido glutâmico por cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de alimentos fermentados. Linha 1 e 2: *L. fermentum* (CCMA 0364); 3 e 4: *L. plantarum* (CCMA 1066); 5 e 6: *L. brevis* (CCMA 0383); 7 e 8: *L. fermentum* (CCMA 0362); 9 e 10: *L. fermentum* (CCMA 0211); 11 e 12: padrão de ácido glutâmico.



Fonte: Da autora (2022).

A média geral de produção encontrada foi de 2,94 mg/ mL entre as diferentes espécies de BAL, com mínimo de 1,56 e máximo de 4,97 mg/ mL (TABELA 2).

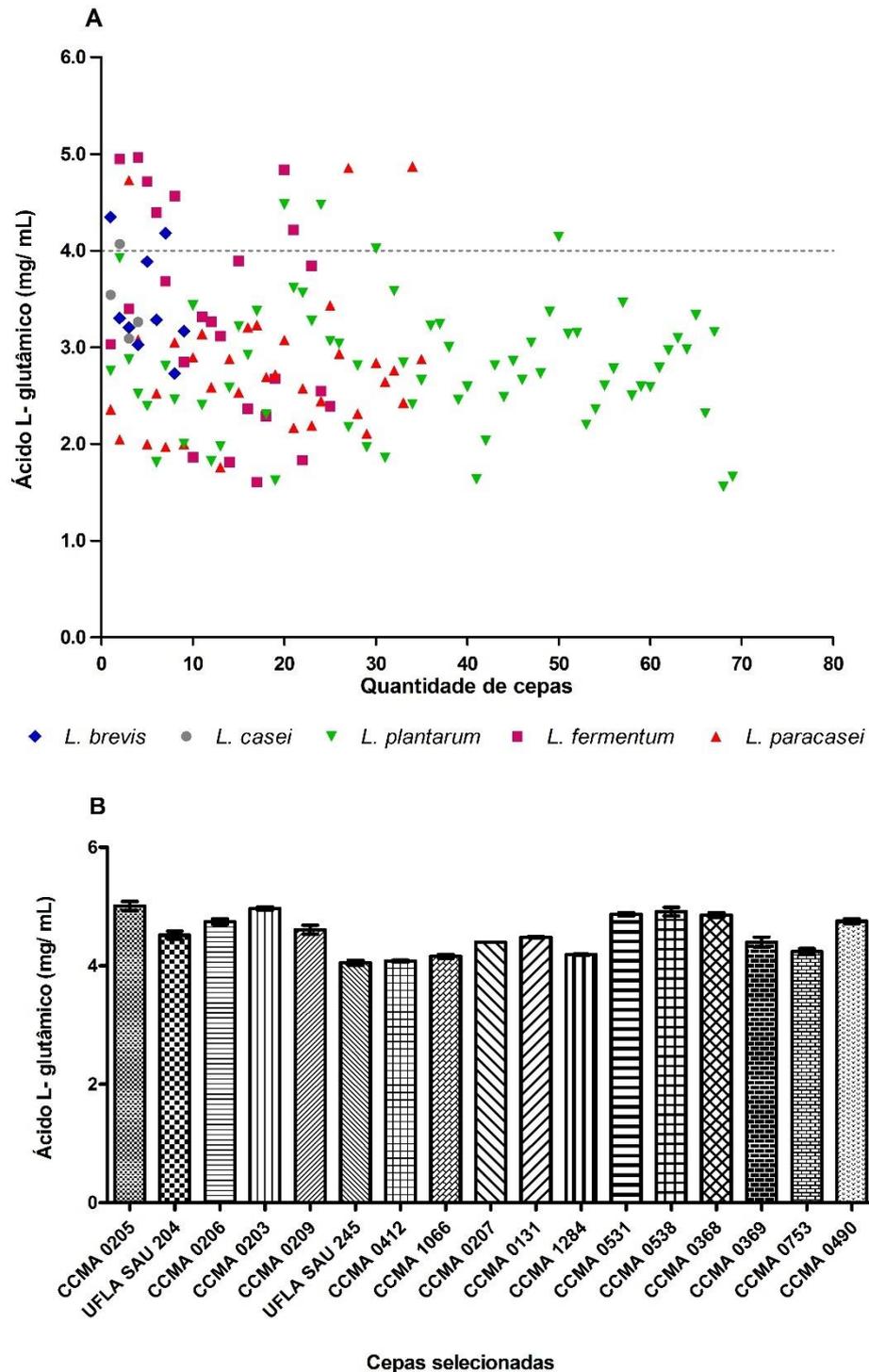
Tabela 2 - Quantificação ácido glutâmico em caldo MRS das cepas de BAL.

<b>Espécie</b>	<b>Faixa de produção (mg/ mL)</b>
<i>L. brevis</i>	2,73 - 4,35
<i>L. casei</i>	3,09 - 4,07
<i>L. fermentum</i>	1,61 - 4,97
<i>L. paracasei</i>	1,76 - 4,87
<i>L. plantarum</i>	1,56 - 4,48

Fonte: Da autora (2022).

Das 142 cepas de BAL derivadas de alimentos fermentados, 17 cepas apresentaram potencial de produção de ácido glutâmico superior a 4 mg/ mL (FIGURA 2A e 2B). Dentre elas, 8 cepas foram isoladas de bebidas fermentados indígenas tais como Yakupa, Calugi, Chicha e Caium. As 9 cepas restantes foram isoladas de linguiça fresca suína, cacau, kefir de suco de maçã, maçã e café despulpado.

Figura 2 - Produção de ácido glutâmico por cepas de BAL isoladas de Alimentos fermentados (A) Quantificação de todas as cepas avaliadas testadas (B) Cepas selecionadas: *L. fermentum* (CCMA 0205, CCMA 0206, CCMA 0209, CCMA 0207, CCMA 0368 e CCMA 0753), *L. plantarum* (UFLA SAU 204, CCMA 0203, UFLA SAU 245, CCMA 1066 e CCMA 0131), *L. casei* (CCMA 0412), *L. brevis* (CCMA 1284 e CCMA 0369) e *L. paracasei* (CCMA 0531, CCMA 0538 e CCMA 0490).

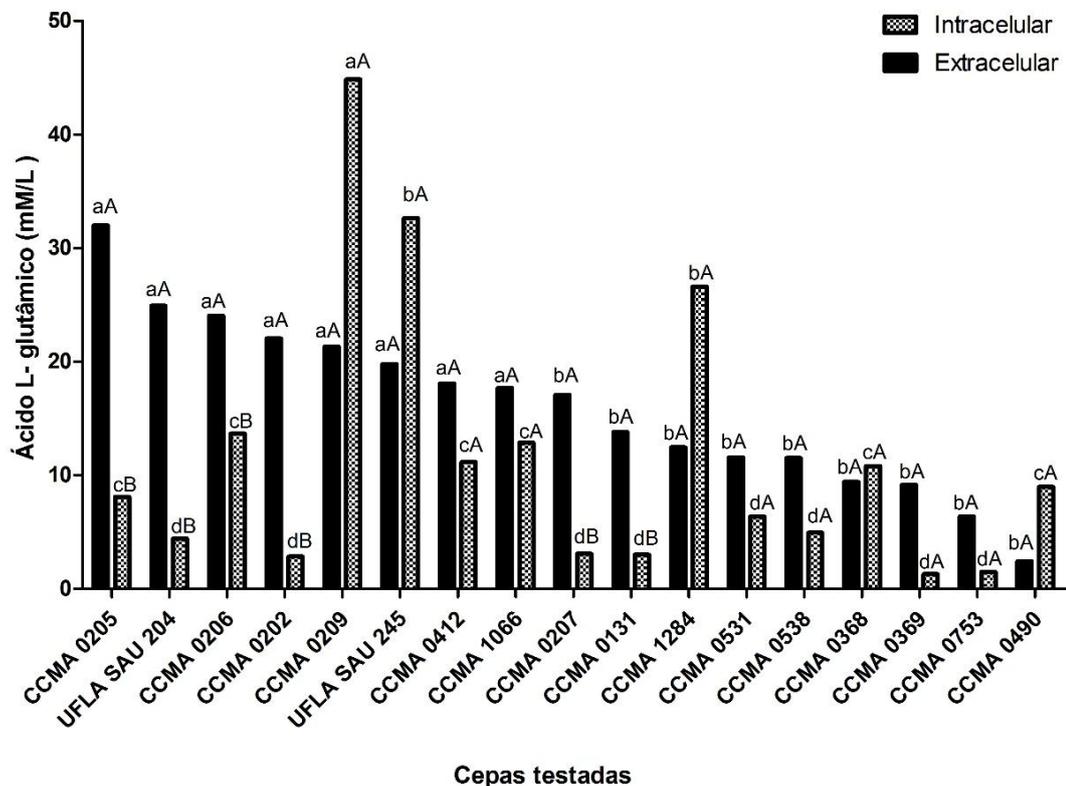


Fonte: Da autora (2022).

As cepas selecionadas foram avaliadas quanto a produção intracelular e extracelular em meio de cultivo MRS e quantificadas por meio da técnica de HPLC. Verifica-se também, diferenças significativas nos rendimentos intracelular e extracelular das cepas de BAL avaliadas (FIGURA 3). De modo geral, os isolados estudados produziram ácido L-glutâmico intracelular entre 1,26 a 44,83 mmol / L e extracelular entre 2,42 a 31,97 mmol / L.

O maior teor de ácido glutâmico intracelular (44,83 mmol / L) foi alcançado pela cepa CCMA 0209. Enquanto a maior biossíntese extracelular do aminoácido atingiu 31,97 mmol / L, foi alcançada pela cepa CCMA 0205. Ambas, as cepas são da espécie *L. fermentum* e foram isoladas de alimentos fermentados indígena “Yakupa”.

Figura 3 - Produção intracelular e extracelular de ácido L-glutâmico de BAL isoladas de alimentos fermentados *L. fermentum* (CCMA 0205, CCMA 0206, CCMA 0209, CCMA 0207, CCMA 0368 e CCMA 0753), *L. plantarum* (UFLA SAU 204, CCMA 0203, UFLA SAU 245, CCMA 1066 e CCMA 0131), *L. casei* (CCMA 0412), *L. brevis* (CCMA 1284 e CCMA 0369) e *L. paracasei* (CCMA 0531, CCMA 0538 e CCMA 0490). Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si (para as diferentes cepas) e médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si (para a produção intracelular e extracelular de cada cepa). Os resultados foram comparados usando o teste de teste de Scott Knott ( $p > 0,05$ ).



Fonte: Da autora (2022).

A cepa UFLA SAU 245 da espécie *Lactiplantibacillus plantarum* isolada de linguiça suína, também que se destacou em produção de ácido L-glutâmico foi a UFLA SAU 245 com produção de ácido L-glutâmico intracelular (32,63 mmol / L) e extracelular (19,75 mmol / L) (FIGURA 3).

Para verificar a segurança das cepas avaliadas foram determinadas as atividades hemolíticas e de DNase. As quatro cepas testadas não mostraram atividade hemolítica e de DNase quando comparadas à cepa de controle positivo, comprovando seus *status* de não patogênicas. Em relação a capacidade de hidrofobicidade, todas as cepas apresentaram alta capacidade de hidrofobicidade com perfis semelhantes (TABELA 2).

Tabela 3 - Porcentagem de hidrofobicidade, auto agregação, e co-agregação das cepas BAL selecionadas.

Cepas	Hidrofobicidade	Autoagregação	Co-Agregação	
			<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>
<b>C1 SAU 245</b>	97,89 ± 0,01 a	19,01 ± 3,20 a	7,04 ± 0,04 c	4,99 ± 1,23 b
<b>CCMA 1284</b>	89,79 ± 0,46 b	25,85 ± 9,75 a	28,51 ± 0,41 b	3,29 ± 0,45 b
<b>CCMA 0209</b>	97,54 ± 0,04 a	29,60 ± 1,29 a	34,69 ± 0,72 b	6,01 ± 0,80 b
<b>CCMA 0205</b>	98,15 ± 0,01 a	17,20 ± 1,37 a	65,71 ± 5,57 a	65,39 ± 3,27 a

Média de 3 experimentos, cada um foi realizado em triplicata ± erro padrão. Letras diferentes para valores à mesma coluna significam valores diferentes significativos de acordo com o teste de Tukey a um nível de confiança de 95%. Cepas selecionadas: *L. fermentum* (CCMA 0205 e CCMA 0209); *L. plantarum* (UFLA SAU 245) e *L. brevis* (CCMA 1284).

Fonte: Da autora (2022).

Todas as cepas também apresentaram auto-agregação e foram capazes de co-agregar com os dois patógenos testados; *E.coli* e *S. Enteritidis*. Sendo assim, estas podem ser escolhidas para estudos sobre o provável potencial probióticos destas cepas.

#### 4 DISCUSSÃO

Cepas de BAL isoladas de alimentos fermentados são capazes de produzir ácido glutâmico. 17 cepas apresentaram potencial de produção superior a 4 mg/ mL. Houve diferenças significativas entre a produção intracelular e extracelular das cepas avaliadas. As cepas da espécie *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0209 e a cepa CCMA 0205 apresentaram maior concentração intracelular (44,83 mmol / L) e extracelular (31,97 mmol / L) de ácido L-glutâmico, respectivamente. Ambas as cepas foram isoladas de bebida indígena “Yakupa”.

A produção de ácido glutâmico por diferentes espécie e cepas de BAL foram relatadas anteriormente como *L. paracasei* (ZALÁN *et al.*, 2010) e em diferentes cepas de BAL (EL-NEMR MOSTAFA, 2010). O grupo das BAL é reconhecido como os microrganismos mais produtores de ácido glutâmico em produtos de fermentação (PRIHANTO *et al.*, 2021) e são isolados principalmente de alimentos e bebidas fermentadas (SAHAB *et al.*, 2020).

As cepas de *L. fermentum* (CCMA 0209 e CCMA 0205) são bactérias isoladas de um produto fermentado de mandioca, denominada “yakupa”. Trata-se de uma bebida tradicional não alcoólica produzida pelo povo indígena brasileiro “Juruna” que habita o parque do Xingu, Mato Grosso, Brasil (FREIRE *et al.*, 2017; FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2015; FREIRE *et al.*, 2014).

*L. plantarum* é uma bactéria frequentemente isolada de diferentes alimentos fermentados em todo o mundo. Pesquisadores isolaram de alimentos fermentados tradicionais do povo de Minangkabau, na Sumatra Ocidental, uma cepa de *L. plantarum* denominada VM e verificaram a produção de ácido glutâmico de até 680,525 mg/ L após otimização de parâmetros como tempo de incubação, pH do meio, temperatura, fonte carbono e fonte nitrogênio (MASLAMI *et al.*, 2018). A mesma espécie identificada como MNZ também foi isolada de alimento fermentado tradicional da Malásia, apresentando 489,46  $\mu\text{mol} / \text{L}$  de ácido glutâmico após o processo fermentativo (ZAREIAN *et al.*, 2012).

No presente trabalho foram observadas diferenças na produção intracelular e extracelular de ácido L-glutâmico pelas cepas de BAL testadas. Sendo assim, a seleção

critérioria é necessária para identificar as possíveis cepas produtoras de aminoácidos. Uma vez que há grandes diferenças entre as cepas, mesmo pertencendo à mesma espécie como visto neste estudo. A quantidade de ácido L-glutâmico produzido difere de um microrganismo para outro devido a diferença de potencial genético de cada cepa. Além disso, a capacidade em excretar ácido glutâmico é definitivamente afetado pela sua interação com o meio de cultivo, bem como as condições de crescimento, como pH e temperatura (PATIL *et al.*, 2019).

As espécies em destaque neste estudo, para a produção de ácido L-glutâmico, foram *Limosilactobacillus fermentum* e *Lactiplantibacillus plantarum*, com via heterofermentativa e homofermentativa, respectivamente (ZHENG *et al.*, 2020; RHEE *et al.*, 2011). As BAL são fortes produtores de amina, uma vez que usam estas vias metabólicas (no lugar da respiração) para criar um gradiente de prótons e, portanto, energia, e para alcalinizar o ambiente muito ácido, devido aos principais produtos da fermentação serem ácidos (ácido láctico para o BAL homofermentativas e ácido láctico + fórmico + acético nos heterofermentadores) (PESSIONE; CIRRINCIONE, 2016).

O ácido L-glutâmico é formado nas células bacterianas a partir da  $\alpha$ -cetogluturato precursor no ciclo do ácido tricarboxílico pela enzima glutamato desidrogenase (GDH) (SAHAB *et al.*, 2020) usando NADH ou NADPH como coenzima (SAWADA *et al.*, 2021). A elevada atividade desta enzima já foi relatada em *L. plantarum*, bem como o gene que codifica GDH (*gdh*) (DE ANGELIS *et al.*, 2010). Ademais, a produção de ácido glutâmico geralmente é relacionada a uma diminuição na atividade da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase (ODHC), conseqüentemente acúmulo na célula (SANCHEZ; DEMAIN, 2008).

Contudo, os mecanismos da secreção do ácido L-glutâmico pelas bactérias não são totalmente elucidados. Acredita-se que, para gerenciar a pressão de turgor da membrana em diferentes ambientes, a maioria das bactérias excreta ácido L-glutâmico para reduzir o gradiente osmótico (NAKAYAMA, 2021).

Além disto, a ativação dos canais mecanossensíveis do tipo MscCG estudado em *C. glutamicum* podem explicar a modulação da excreção do aminoácido. A tensão da membrana devido a fatores físicos ou químicos (antibióticos, surfactantes, limitação de biotina, temperatura), podem inibir a síntese de lipídios da membrana ou a síntese da parede celular, resultando na ativação dos canais e, conseqüentemente, na exportação do ácido L-glutâmico através do poro aberto dos canais mecanossensíveis do tipo MscCG (NAKAYAMA, 2021).

A seleção de cepas em diferentes processos fermentativos de alimentos pode ajudar a alcançar a expressão *in situ* da propriedade desejada (OWUSU-KWARTENG *et al.*, 2015)

como produção de aminoácido, tal como o ácido L-glutâmico. Portanto, o estudo da biodiversidade BAL, de diferentes ambientes, como apresentado neste estudo, pode revelar cepas com características desejadas para aplicações industriais.

A hidrofobicidade e auto-agregação são características desejáveis para bactérias probióticas, pois podem auxiliar evitando a colonização de patógenos à mucosa intestinal, formando uma barreira de defesa do hospedeiro (ABUSHELAIBI *et al.*, 2017).

As cepas BAL *L. fermentum* (CCMA 0205 e CCMA 0209); *L. plantarum* (UFLA SAU 245) e *L. brevis* (CCMA 1284) isoladas de alimentos fermentados, demonstraram atributos probióticos *in vitro* indicando o seu potencial para serem usadas como cultura iniciadoras em produtos alimentícios fermentados.

A ausência de atividade hemolítica é um critério de seleção para culturas probióticas, pois indica que essas bactérias não são virulentas. Ademais, a falta de atividade hemolítica é considerada um requisito para a classificação de bactérias como GRAS de acordo com a EFSA (European Food Safety Authority) (LEE *et al.*, 2014 ).

Além disso, as BAL são geralmente consideradas seguras, e devido à produção de ácido L-glutâmico podem ser empregadas para o desenvolvimento de novos alimentos fermentados funcionais. Demonstrando assim, a importância do estudo da biodiversidade microbiana para aplicações em biotecnologia.

## 5 CONCLUSÃO

BAL provenientes de alimentos fermentados foram capazes de produzir ácido L-glutâmico. Houve diferenças significativas na produção intracelular e extracelular das cepas avaliadas. As cepas da espécie *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0209 e CCMA 0205, ambas isoladas de bebida indígena brasileira Yakupa, apresentaram maior capacidade de produção de ácido L-glutâmico intracelular e extracelular, respectivamente. Adicionalmente, as cepas BAL avaliadas demonstraram atributos probióticos *in vitro*, apresentando, portanto, potencialidade para usá-los como culturas iniciadoras em alimentos fermentados.

## REFERÊNCIAS

- ABUSHELAIBI, A.; AL-MAHADIN, S.; EL-TARABILY, K.; SHAH, N. P.; AYYASH, M. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. **LWT-Food Science and Technology**, [S.l.], v. 79, p. 316-325, 2017.
- COSTA, G. N. *et al.* Antimicrobial activity of Lactobacillus and Bifidobacterium strains against pathogenic microorganisms “in vitro”. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.l.], v. 33, n. 5, p. 1839–1846, 2012.
- DE ANGELIS, M. *et al.* NADP-glutamate dehydrogenase activity in nonstarter lactic acid bacteria: effects of temperature, pH and NaCl on enzyme activity and expression. **Journal of Applied Microbiology**, [S.l.], v. 109, n. 5, p. 1763-1774, 2010.
- D'ESTE, M.; ALVARADO-MORALES, M.; ANGELIDAKI, I. Amino acids production focusing on fermentation technologies—A review. **Biotechnology advances**, [S.l.], v. 36, n. 1, p. 14-25, 2018.
- EL-NEMR, M.; MOSTAFA, H. E. Screening of potential infants lactobacilli isolates for amino acids production. **African Journal of Microbiology Research**, [S.l.], v. 4, n. 4, p. 226-232, 2010.
- FONSECA, H. C.; SOUSA MELO, D.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Probiotic properties of lactobacilli and their ability to inhibit the adhesion of enteropathogenic bacteria to Caco-2 and HT-29 cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 102-112, 2021.
- FREIRE, A. L. *et al.* Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 248, p. 39-46, 2017.
- FREIRE, A. L. *et al.* Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of yakupa, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 30, n. 2, p. 567-577, 2014.
- FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **Food Research International**, [S.l.], v. 76, p. 787-795, 2015.
- KUMAR, R.; VIKRAMACHAKRAVARTHI, D.; PAL, P. Production and purification of glutamic acid: A critical review towards process intensification. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [S.l.], v. 81, p. 59–71, 2014.
- LAWAL, A. K. *et al.* L-Glutamic acid production by Bacillus spp. isolated from vegetable proteins. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 10, n. 27, p. 5337–5345, 2011.

LEE, J. *et al.* Selection of *Lactococcus lactis* HY7803 for Glutamic Acid Production Based on Comparative Genomic Analysis. **J Microbiol Biotechnol.**, [S.l.], v. 28, n. 31, p. 298-303, Feb. 2021.

LEE, S. B. *et al.* Mass-Based Metabolomic Analysis of *Lactobacillus sakei* and Its Growth Media at Different Growth Phases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S.l.], v. 27, n. 5, p. 925–932, 2017.

LEE, N. K.; KIM, S. Y.; HAN, K. J.; EOM, S. J.; PAIK, H. D. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. **LWT-Food Science and Technology**, [S.l.], v. 58, n. 1, p. 130-134, 2014.

MALULY, H. D. B.; ARISSETO-BRAGOTTO, A. P.; REYES, F. G. R. Monosodium glutamate as a tool to reduce sodium in foodstuffs: Technological and safety aspects. **Food Science and Nutrition**, [S.l.], v. 5, n. 6, p. 1039–1048, 2017.

MASLAMI, V. *et al.* Optimization of Glutamate Production from *Lactobacillus plantarum* Originating from Minangkabau Fermented Food as a Feed Supplement for Broiler. **Pakistan Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 17, n.8, p. 336-343,2018.

NAKAYAMA, Y. *Corynebacterium glutamicum* mechanosensing: From osmoregulation to L-glutamate secretion for the avian microbiota-gut-brain axis. **Microorganisms**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 201, 2021.

OWUSU-KWARTENG, J. *et al.* Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. **BMC Microbiology**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 1-10, 2015.

PATIL, V. M. *et al.* Screening of different *Pseudomonas* and *Bacillus* Spp. for production of L-glutamic acid and impact of their cell-free filtrate on growth and yield of brinjal (*Solanum melongena*). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 14-18, 2019.

PESSIONE, E.; CIRRINCIONE, S. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: encrypted peptides and biogenic amines. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 7, p. 876, 2016.

PRIHANTO, A. A. *et al.* Physicochemical and sensory properties of terasi (an Indonesian fermented shrimp paste) produced using *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Microbiological Research**, [S.l.], v. 242, p. 126619, 2021.

R. **The R Project for Statistical Computing**. [S.d.]. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 22 abr. 2022.

RHEE, S. J.; LEE, J-E.; LEE, C-Ho. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. In: *Microbial Cell Factories*. **BioMed Central**, [S.l.], [S.v.], [S.n.], p. 1-13, 2011.

ROSSETTI, V.; LOMBARD, A. Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [S.l.], v. 681, n. 1, p. 63-67, 1996.

SAHAB, N. R. *et al.*  $\gamma$ -Aminobutyric acid found in fermented foods and beverages: current trends. **Heliyon**, [S.l.], v. 6, n. 11, p. e05526, 2020.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. **Microbial Biotechnology**, [S.l.], v. 1, n. 4, p. 283-319, 2008.

SANCHEZ, S. *et al.* Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids. **Journal of Antibiotics**, [S.l.], v. 71, n. 1, p. 26–36, 2018.

SAWADA, K. *et al.* The relationships between microbiota and the amino acids and organic acids in commercial vegetable pickle fermented in rice-bran beds. **Scientific Reports**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.

SHIMIZU, H. *et al.* Effects of the changes in enzyme activities on metabolic flux redistribution around the 2-oxoglutarate branch in glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S.l.], v. 25, n. 5, p. 291-298, 2003.

SHYAMKUMAR, R. *et al.* Production of L-glutamic Acid with *Corynebacterium glutamicum* (NCIM 2168) and *Pseudomonas reptilivora* (NCIM 2598): A Study on Immobilization and Reusability. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. 163–168, 2014.

WENDISCH, V. F. Microbial production of amino acids and derived chemicals: synthetic biology approaches to strain development. **Current Opinion in Biotechnology**, [S.l.], v. 30, p. 51-58, 2014.

YAZGAN, H. *et al.* The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products. **Journal of Food Processing and Preservation**, [S.l.], v. 45, n. 1, p. e15085, 2021.

ZALÁN, Z. *et al.* of organic acids by Lactobacillus strains in three different media. **European Food Research and Technology**, [S.l.], v. 230, n. 3, p. 395-404, 2010.

ZAREIAN, M. *et al.* A Glutamic Acid-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Fermented Foods. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 5, p. 5482–5497, 2012.

ZHENG, J. *et al.* 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**, [S.l.], v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

## **ARTIGO 2 - EFEITO DO PH, TEMPERATURA E TEMPO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO L-GLUTÂMICO POR BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO USANDO ABORDAGEM DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL**

### **RESUMO**

O ácido L-glutâmico é uma molécula bioativa que desempenha um papel importante em diferentes processos celulares e pode ser produzido por algumas espécies de bactérias do ácido láctico (BAL). Devido a sua demanda, a produção via fermentação tem aumentado consideravelmente, exigindo, dessa forma, a otimização do processo. A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi utilizada neste estudo para otimizar os parâmetros de produção de ácido L-glutâmico (pH, temperatura e tempo) por quatro cepas bacterianas do ácido láctico isoladas de alimentos fermentados (SAU 245: *Lactiplantibacillus plantarum*; CCMA 1284: *Levilactobacillus brevis*; CCMA 0209 e CCMA 0205: *Limosilactobacillus fermentum*). A produção extracelular variou entre 0,6 a 5,36 mM/L, enquanto a produção intracelular variou 0,4 a 10,43 mM/L entre as quatro cepas testadas. Os modelos de previsão empírica desenvolvidos foram considerados adequados ( $p < 0,05$ ) para descrever a produção extracelular e intracelular de ácido L-glutâmico da cepa CCMA 0205 (*Limosilactobacillus fermentum*) ( $R^2 = 0,83$  e  $0,84$ ). A temperatura e o tempo foram os fatores que mais afetaram a produção de ácido glutâmico. A predição das condições ótimas estabelecidas para a produção de ácido L-glutâmico pela cepa CCMA 0205 foram pH 4,5; temperatura de 35 °C e o tempo de 72 horas. A produção de ácido L-glutâmico por bactérias do ácido láctico pode ser otimizada utilizando a estratégia RSM com abordagem DCCR e os resultados deste estudo são uma diretriz para a produção microbiana de ácido L-glutâmico pela bactéria do ácido láctico *L.fermentum* (CCMA 0205).

**Palavras-chaves:** Ácido L-glutâmico. Fermentação. DCCR. Alimentos fermentados.

### **EFFECT OF PH, TEMPERATURE AND TIME ON L-GLUTAMIC ACID PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA USING COMPOUND ROTATIONAL CENTRAL DESIGN APPROACH**

#### **ABSTRACT**

L-glutamic acid is a bioactive molecule that plays an important role in different cellular processes and can be produced by some species of lactic acid bacteria (LAB). Due to its demand, production via fermentation has increased considerably, thus requiring process optimization. The Response Surface Methodology (RSM) of the Rotational Central Composite Design (DCCR) was used in this study to optimize the L-glutamic acid production parameters (pH, temperature and time) by four lactic acid bacteria strains isolated from fermented foods (SAU 245: *Lactiplantibacillus plantarum*; CCMA 1284: *Levilactobacillus brevis*; CCMA 0209 and CCMA 0205: *Limosilactobacillus fermentum*). Extracellular production ranged from 0.6 to 5.36 mM/L, while intracellular production ranged from 0.4 to

10.43 mM/L among the four tested strains. The empirical prediction models developed were considered adequate ( $p < 0.05$ ) to describe the extracellular and intracellular production of L-glutamic acid from the CCMA 0205 strain (*Limosilactobacillus fermentum*) ( $R^2 = 0.83$  and  $0.84$ ). Temperature and time were the factors that most affected glutamic acid production. The predicted optimal conditions established for the production of L-glutamic acid by the CCMA 0205 strain were pH 4.5; temperature of  $35^\circ\text{C}$  and time of 72 hours. The production of L-glutamic acid by lactic acid bacteria can be optimized using the RSM strategy with DCCR approach and the results of this study are a guideline for the microbial production of L-glutamic acid by the lactic acid bacteria *L. fermentum* (CCMA 0205).

**Keywords:** L-glutamic acid. Fermentation. DCCR. Fermented foods.

## 1 INTRODUÇÃO

Importante metabólito intermediário de diferentes vias bioquímicas do nosso corpo, neurotransmissor excitatório de mamíferos, propicia a percepção do gosto Umami pelo paladar, são algumas das funções do ácido L- glutâmico (L-GLU), um aminoácido não essencial (ADEGOKE *et al.*, 2022). A grande maioria de L-GLU é produzida industrialmente através de fermentação microbiana, método de fácil escalonagem e que produz o aminoácido na forma proteínogênica- levogiro (L-aminoácido) (ALHARBI *et al.*, 2020). O microrganismo destaque na indústria de produção microbiana de L-GLU é a bactéria *Corynebacterium glutamicum*, contudo, novas cepas são pesquisadas quanto a este potencial.

Dentre elas estão as bactérias do ácido láctico (BAL) que são geralmente reconhecidas como seguras (em inglês GRAS) de acordo com a designação da *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos e têm sido amplamente utilizadas em vários setores da indústria alimentícia, como laticínios, carnes fermentadas e vegetais. Em 2020, os membros do gênero *Lactobacillus* foram reclassificados em 23 novos gêneros com base nas propriedades de nucleotídeo, aminoácido, gene central, filogenia do genoma central e genes de assinatura incluindo aspectos metabólicos e/ou ecológicos (ZHENG *et al.*, 2020).

Visando aumentar a produção de ácido glutâmico diferentes estratégias têm sido implementadas, como a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) pelo Delineamento composto central rotacional (DCCR), que objetiva explorar o impacto de vários fatores e suas relações na produção do aminoácido (HIRASAWA; SHIMIZU, 2017; SUNITHA; RAO; AYYANNA, 1998; TAVAKKOLI *et al.*, 2012).

Neste estudo, as condições ótimas de fermentação, incluindo pH, temperatura e tempo, foram determinadas usando a abordagem de DCCR e RSM, visando a produção de L-GLU

extracelular e intracelular por quatro cepas de bactérias do ácido lático isoladas de alimentos fermentados.

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 Microrganismos**

Foram utilizadas quatro bactérias do ácido láticas (BAL): SAU 245: *Lactiplantibacillus plantarum* isolada de linguiça suína; CCMA 1284: *Levilactobacillus brevis* isolada de bebida fermentada indígena brasileira “Caium”; CCMA 0209: *Limosilactobacillus fermentum e CCMA 0205: Limosilactobacillus fermentum*; ambas isoladas de bebida fermentada indígena brasileira “Yakupa”. Todas as bactérias são pertencentes à Coleção de Cultura de Microbiologia Agrícola, CCMA (Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Brasil). As cepas foram reativadas em caldo MRS (deMan, Rogosa e Sharpe).

### **2.2 Produção de ácido L-glutâmico**

A concentração da suspensão bacteriana foi realizada por comparação de turvação com o padrão de leitura 0,5 na escala McFarland e a absorbância da suspensão lida em espectrofotômetro ( $A_{600} = 0,3$ ), que corresponde a  $10^8$  UFC/mL. Após, foram realizadas diluições decimais até  $10^6$  UFC/mL.

Utilizou-se 1 mL de cada inóculo padronizado de cada cepa em 15 mL de caldo MRS em tubos de ensaio de 15 mL (ZAREIAN *et al.*, 2012). Para a condição de microaerobiose, os tubos foram vedados com rolhas de borracha visando obter um ambiente com menor concentração de  $O_2$  (COSTA *et al.*, 2012).

### **2.3 Extração de ácido L-glutâmico extracelular**

Primeiramente, as células foram separadas por centrifugação (8000 rpm/ 15 min/ 4 °C) e o sobrenadante foi diluído 50 vezes com 7% (v/v) de ácido acético glacial. O sobrenadante diluído foi centrifugado (8000 rpm/ 15 min/ 4 °C) e o sobrenadante filtrado (membrana porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ ) e, por fim, recolhido para análise posterior (ZAREIAN *et al.*, 2012).

## 2.4 Extração de ácido L-glutâmico intracelular

As células cultivadas no caldo MRS foram centrifugadas (8000 rpm/ 15 min/ 4 °C), lavadas com NaCl 0,9% (m/v) três vezes e ressuspensas em 20 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,0) (8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 0,91 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,12 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/L). Posteriormente, foi acrescido 1,0 mL de etanol a 75% (v/v), o homogenato foi centrifugado (8000 rpm/ 15 min/ 4 °C) e o sobrenadante filtrado utilizando uma membrana filtrante (0,22 µm) (ZAREIAN *et al.*, 2012). O sobrenadante filtrado foi coletado e reservado para a análise quantitativa da concentração de ácido glutâmico.

## 2.5 Derivatização do ácido L-glutâmico extraído

Uma alíquota de 500 µL de sobrenadante (ou solução padrão de ácido glutâmico) foi seca sob vácuo. Em seguida, o resíduo foi dissolvido em 100 µL de solução de etanol, água e trietilamina [2:2:1 (v/ v)] e seco em estufa a 50 °C. Após, foram adicionados 150 µL de solução de etanol, água e trietilamina-PITC [7:1:1:1 (v/v)] ao resíduo e este permaneceu reagindo por 20 min à temperatura ambiente. O reagente em excesso foi removido por meio de secagem em estufa 50 °C. A curva padrão do glutamato foi determinada aplicando o mesmo procedimento às soluções padrão de glutamato em diferentes concentrações (0,125; 0,100; 0,075; 0,050 e 0,025 mM) (ROSSETTI; LOMBARD, 1996).

## 2.6 Determinação do teor de L-glutâmico

A quantificação do ácido glutâmico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras derivatizadas foram dissolvidas em 250 µL de fase móvel inicial, consistindo de uma mistura de 80% de solução A (solução aquosa de 8,205 g de acetato de sódio, 0,5 mL de trietilamina e 0,7 mL de ácido acético em 1000 mL de água, pH final de 5,8) e 20% de solução B (acetonitrila- água (60:40), pH final de 5,8), acrescido de 250 µL de Hidróxido de sódio 6 M (NaOH). Posteriormente, cada amostra foi filtrada utilizando-se membrana filtrante (0,22 µm). A separação foi realizada por cromatografia líquida em um aparelho HPLC 20AT Shimadzu (Shimadzu Corp., Japão). Uma coluna Prevail C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., Alltech, Illinois,) foi utilizada durante a análise. A fase móvel para eluição isocrática foi bombeada a vazão de 0,6 mL/min, temperatura de 27 °C e a

detecção do ácido glutâmico foi a 254 nm (ROSSETTI; LOMBARD, 1996). O ácido glutâmico foi detectado por comparação dos valores de tempo de retenção (Rt) e espectros com padrão e determinados pela área de pico do cromatograma do HPLC. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.7 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O DCCR é uma estratégia estatística para otimizar variáveis e foi usado neste estudo para investigar as interações de parâmetros que afetam a fermentação de L-Glu e estabelecer as melhores condições usando bactérias do ácido lático. O software Design-Expert versão 12.0.3.0 foi usado para o *design* do experimento e análise estatística (dx-12, State-Ease Inc). Três variáveis (pH, temperatura e tempo) foram alocadas em três níveis: mais e menos 1 (pontos fatoriais) e o ponto central. A Tabela 2 apresenta as 17 corridas experimentais que compuseram o DCCR (FAHIMITABAR *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Matriz do delineamento composto central rotacional 2<sup>3</sup> para otimizar a produção do ácido L-glutâmico de cada cepa. Temperatura (°C); tempo (horas).

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X1	X2	X3	pH	Temperatura	Tempo
1	-1	-1	-1	3.5	30	48
2	1	-1	-1	5.5	30	48
3	-1	1	-1	3.5	40	48
4	1	1	-1	5.5	40	48
5	-1	-1	1	3.5	30	96
6	1	-1	1	5.5	30	96
7	-1	1	1	3.5	40	96
8	1	1	1	5.5	40	96
9	-1,68	0	0	2.8	35	72
10	1,68	0	0	6.2	35	72
11	0	-1,68	0	4.5	27	72
12	0	1,68	0	4.5	43	72
13	0	0	-1,68	4.5	35	32
14	0	0	1,68	4.5	35	112
15	0	0	0	4.5	35	72
16	0	0	0	4.5	35	72
17	0	0	0	4.5	35	72

Fonte: Da autora (2022).

O coeficiente de regressão para o efeito quadrático não linear de variáveis individuais e seus efeitos interativos na síntese de L -Glu foram determinados. A significância do modelo

desenvolvido foi julgada estatisticamente pelo cálculo do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e probabilidade associada valor p ( $p < 0,05$ ).

### **3 RESULTADOS**

A produção de L -Glu extracelular, a cepa CCMA 0205 apresentou modelo significativo frente análise ANOVA pela abordagem DCCR (TABELA 2). As demais cepas submetidas à análise não apresentaram modelo estatisticamente significativo ao nível de confiança aplicado (95%). Isso não é incomum, uma vez que o modelo matemático muitas vezes não se adequa às condições biológicas dos experimentos, especialmente quando se utiliza microrganismos e meios complexos como bactérias do ácido lático e MRS.

Tabela 2 - Matriz do planejamento da produção ácido L-glutâmico extracelular.

Ensaio	Variáveis codificadas (Variáveis reais)			Produção de ácido L-glutâmico mM/L			
	X1 (pH)	X2 (Temperatura)	X3 (Tempo)	BAL			
				SAU 245	CCMA 1284	CCMA 0209	CCMA 0205
1	-1 (3.5)	-1 (30)	-1 (48)	2,87	2,691	1,626	3,723
2	1 (5.5)	-1 (30)	-1 (48)	2,092	1,153	0,805	<b>4,694</b>
3	-1 (3.5)	1 (40)	-1 (48)	2,553	1,291	1,108	0,261
4	1 (5.5)	1 (40)	-1 (48)	1,91	1,05	1,509	1,377
5	-1 (3.5)	-1 (30)	1 (96)	2,518	1,626	1,588	1,475
6	1 (5.5)	-1 (30)	1 (96)	1,418	0,802	0,814	1,081
7	-1 (3.5)	1 (40)	1 (96)	<b>3,017</b>	<b>3,009</b>	<b>0,734</b>	<b>0,887</b>
8	<b>1 (5.5)</b>	<b>1 (40)</b>	<b>1 (96)</b>	1,527	<b>5,358</b>	0,931	1,411
9	-1,68 (2.8)	0 (35)	0 (72)	2,677	<b>3,021</b>	<b>2,115</b>	2,529
10	1,68 (6.2)	0 (35)	0 (72)	2,571	2,2	1,659	1,019
11	0 (4.5)	-1,68 (27)	0 (72)	2,675	1,291	1,77	2,035
12	0 (4.5)	1,68 (43)	0 (72)	2,304	1,198	1,782	0,903
13	0 (4.5)	0 (35)	-1,68 (32)	1,851	2,876	1,546	2,188
14	0 (4.5)	0 (35)	1,68 (112)	2,458	3,686	0,773	0,924
15	0 (4.5)	0 (35)	0 (72)	2,007	3,086	0,579	1,535
16	0 (4.5)	0 (35)	0 (72)	1,208	2,785	0,63	0,95
17	0 (4.5)	0 (35)	0 (72)	0,871	0,86	0,6	0,952
p-valor modelo				>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,0467</b>

SAU 245: *Lactiplantibacillus plantarum*; CCMA 1284: *Levilactobacillus brevis*; CCMA 0209: *Limosilactobacillus fermentum*; CCMA 0205: *Limosilactobacillus fermentum*.

Fonte: Da autora (2022).

Contudo, a produção máxima de L-GLU extracelular das cepas foi 3,01 mM/L da cepa SAU 245 (ensaio 7), 5,35 mM/L da cepa CCMA 1284 (ensaio 8), 2,11 mM/L da cepa CCMA 0209 (ensaio 9) (TABELA 1). Os dados revelaram ainda, que para os ensaios 7 e 8, referentes às cepas de SAU 245 e CCMA 1284, apresentaram dois parâmetros (temperatura 40 °C e tempo 96 horas de incubação), em comum para a produção do extracelular do aminoácido. Neste caso, verificou-se o maior tempo de incubação e temperatura mais elevada independente do valor de pH e resultaram em maiores valores de ácido L-glutâmico.

O resultado mais relevante com relação metodologia de superfície de resposta (RSM) obtida com abordagem DCCR foi observado para a produção extracelular de ácido L-glutâmico da cepa CCMA 0205 (*Limosilactobacillus fermentum*) (TABELA 2). Um p-valor menor do que 0.05 na Tabela de ANOVA indica significância estatística com nível de confiança de 95%. Em relação a análise, A , B e C, são os efeitos lineares,  $A^2$  ,  $B^2$  e  $C^2$  são os efeitos de quadrados e AC , BC e AB são os efeitos de interação (TABELA 3).

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para modelo quadrático de superfície de resposta para produção de Ácido Glutâmico extracelular da cepa CCMA 0205.

Fonte	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	Valor F	Valor p	Observações
<b>Model</b>	16,79	9	1,87	3,78	<b>0,0467</b>	<b>Significativo</b>
A-pH	0,0076	1	0,0076	0,0154	0,9046	
B-Temperatura	5,85	1	5,85	11,86	<b>0,0108</b>	<b>Significativo</b>
C-Tempo	3,93	1	3,93	7,97	<b>0,0257</b>	<b>Significativo</b>
AB	0,1412	1	0,1412	0,2863	0,6092	
AC	0,4787	1	0,4787	0,9703	0,3574	
BC	5,32	1	5,32	10,77	<b>0,0134</b>	<b>Significativo</b>
A <sup>2</sup>	0,8503	1	0,8503	1,72	0,2307	
B <sup>2</sup>	0,3137	1	0,3137	0,6357	0,4515	
C <sup>2</sup>	0,4400	1	0,4400	0,8918	0,3764	
<b>Residual</b>	3,45	7	0,4934			
Falta de ajuste	3,23	5	0,6453	5,68	0,1565	Não significativo
Erro puro	0,2274	2	0,1137			
<b>Correlação Total</b>	20,24	16				

Fonte: Da autora (2022).

Além disto, o p-valor da falta de ajuste apresentou valor de 0,1565, que implica que a falta de ajuste não é significativa, indicando que o processo de otimização atingiu os pontos críticos para os fatores que foram escolhidos no modelo quadrático (pH, temperatura e tempo), e com valor para o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,83. O ajustado  $R^2$  ( $R^2_{adj}$ ) é de 0,61, e está mais próximo do valor de  $R^2$ , o que confirma que o modelo foi significativo (TABELA 3). A partir do valor de  $R^2$ , o modelo compreendeu 83% dos dados experimentais. Os valores dos coeficientes poderiam ser mais elevados pela adição de outros fatores tais como: agitação, concentração de indutor, meio de cultivo, dentre outros, o que elevaria o número de experimentos (TABELA 3).

Sendo assim, esses resultados sugerem que o modelo realizado para a cepa CCMA 0205 ajustou-se adequadamente aos dados experimentais quadráticos, explicando 83% da variabilidade na resposta para produção de ácido glutâmico extracelular. A temperatura e o tempo foram as variáveis que apresentaram significância estatística dentre as variáveis estudadas com nível de confiança de 95%. A interação entre a temperatura e o tempo de

encubação da cepa também foram significativas, diferentemente da variável pH que não apresentou significância.

A equação de regressão obtida após análise de variância (ANOVA) prevê os níveis de produção de ácido L-glutâmico extracelular pela cepa CCMA 0205 em função do pH, temperatura e tempo. Sendo assim, a produção pode ser predita segundo o modelo codificado com 95% de confiança (EQUAÇÃO 1)

$$\text{Glu} = +40,94234 - 2,69158X_A - 1,20664X_B - 0,263622X_C + 0,026575 (X_A * X_B) - 0,010193 (X_A * X_C) + 0,006793 (X_B * X_C) + 0,274636X_A^2 + 0,006672X_B^2 + 0,000343X_C^2 \quad (1)$$

Onde:

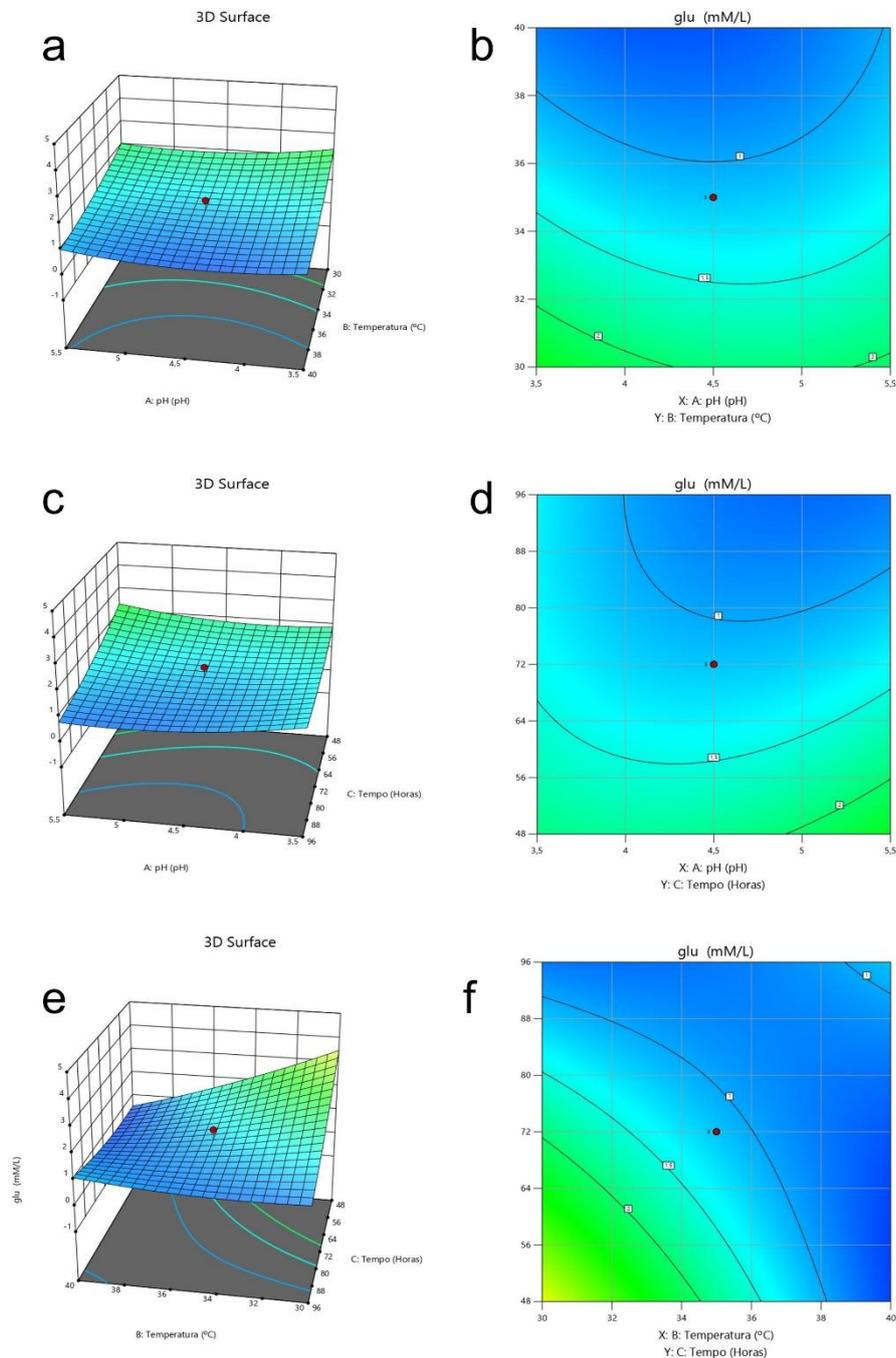
$X_A$  = pH

$X_B$  = Temperatura

$X_C$  = Tempo

Os diagramas gráficos (superfície de resposta 3D e contorno 2D) mostram o efeito de três variáveis (pH, temperatura e tempo) na produção de L-GLU extracelular pela cepa CCMA 0205 gerado pelo modelo previsto (FIGURA 1). Os diagramas são indicados como funções de duas variáveis independentes, enquanto a outra variável foi mantida no ponto central na produção máxima L-GLU.

Figura 1 - Gráficos de superfície e contorno dos efeitos dos fatores na **produção extracelular** de ácido L-glutâmico mM/L pela cepa CCMA 0205 (*Limosilactobacillus fermentum*). a, b: Interação de pH X temperatura; c, d: Interação de pH X tempo; e, f: Interação de temperatura X tempo.



Fonte: Da autora (2022).

Quanto a produção de L-GLU intracelular, a cepa CCMA 0205 novamente apresentou modelo significativo, diferentemente das demais cepas frente análise ANOVA pela abordagem DCCR (TABELA 4). Para as cepas SAU 245, CCMA 0209 e CCMA 1284 a

produção máxima de ácido L-glutâmico intracelular foram de 10,43; 4,09 e 3,91 mM/L, respectivamente. As maiores produção de ácido L-glutâmico das cepas foram atingidas com os parâmetros pH 3,5; em 30 °C durante 48 horas de incubação (ENSAIO 1).

Tabela 4 - Matriz do planejamento da produção ácido L-glutâmico intracelular.

Ensaio	Variáveis codificadas (Variáveis reais)			Produção de ácido L-glutâmico mM/L			
	X1 (pH)	X2 (Temperatura)	X3 (Tempo)	BAL			
				SAU 245	CCMA 1284	CCMA 0209	CCMA 0205
1	-1 (3.5)	-1 (30)	-1 (48)	<b>10,43</b>	3,91	4,09	0,56
2	1 (5.5)	-1 (30)	-1 (48)	1,09	1,06	1,46	2,02
3	-1 (3.5)	1 (40)	-1 (48)	0,88	2,53	1,63	0,93
4	1 (5.5)	1 (40)	-1 (48)	0,88	1,54	1,72	1,16
5	-1 (3.5)	-1 (30)	1 (96)	3,02	2,03	1,2	1,65
6	1 (5.5)	-1 (30)	1 (96)	1,95	1,97	1,45	1,68
7	-1 (3.5)	1 (40)	1 (96)	1,38	0,3	2,35	1,9
8	1 (5.5)	1 (40)	1 (96)	1,21	1,29	1,08	1,63
9	-1,68 (2.8)	0 (35)	0 (72)	1,73	0,68	1,6	0,48
10	1,68 (6.2)	0 (35)	0 (72)	2,68	1,48	2,68	2,31
11	0 (4.5)	-1,68 (27)	0 (72)	2,41	1,32	3,41	0,8
12	0 (4.5)	1,68 (43)	0 (72)	0,69	0,16	3,1	1,99
13	0 (4.5)	0 (35)	-1,68 (32)	0,48	0,06	1,49	0,51
14	0 (4.5)	0 (35)	1,68 (112)	0,53	0,13	1,49	0,16
15	0 (4.5)	0 (35)	0 (72)	1,28	3,6	2,39	4,22
16	0 (4.5)	0 (35)	0 (72)	1,13	0,71	2,74	5,02
17	0 (4.5)	0 (35)	0 (72)	1,83	0,64	2,58	3,16
Modelo p-valor				>0,05	>0,05	>0,05	<b>0,0344</b>

Fonte: Da autora (2022).

O resultado mais expressivo com relação à superfície de resposta obtida com abordagem DCCR foi observado **novamente** para a **produção intracelular de ácido L-glutâmico** da cepa CCMA 0205 (*Limosilactobacillus fermentum*) (TABELA 4). O modelo quadrático apresentou significância estatística com nível de confiança de 95% e p-valor da falta de ajuste de 0,7202. Já o ajuste do modelo foi avaliado pelo  $R^2$  que foi de 0,8458, ou seja, explica 84% da variabilidade na resposta a produção intracelular de ácido glutâmico pela cepa CCMA 0205. Além disto,  $R^2_{adj}$  é de 0,64, e está mais próximo do valor de  $R^2$ , indicando a significância do modelo. Contudo, não foi observada significância estatística para os fatores isolados (pH, temperatura e tempo) nem na interação deles, somente na análise quadrática de cada fator.

Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) para modelo quadrático de superfície de resposta para produção de Ácido Glutâmico intracelular da cepa CCMA 0205.

Fonte	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	Valor F	Valor p	Observações
<b>Modelo</b>	23,92	9	2,66	4,27	<b>0,0344</b>	<b>Significativo</b>
A-pH	1,50	1	1,50	2,41	0,1646	
B-Temperatura	0,2144	1	0,2144	0,3442	0,5758	
C-Tempo	0,1878	1	0,1878	0,3014	0,6001	
AB	0,2926	1	0,2926	0,4697	0,5152	
AC	0,4656	1	0,4656	0,7473	0,4160	
BC	0,0595	1	0,0595	0,0955	0,7663	
A <sup>2</sup>	7,91	1	7,91	12,70	<b>0,0092</b>	<b>Significativo</b>
B <sup>2</sup>	7,91	1	7,91	12,70	<b>0,0092</b>	<b>Significativo</b>
C <sup>2</sup>	16,58	1	16,58	26,60	<b>0,0013</b>	<b>Significativo</b>
<b>Residual</b>	4,36	7	0,6230			
Falta de ajuste	2,62	5	0,5240	0,6020	0,7202	Não significativo
Erro puro	1,74	2	0,8705			
<b>Correlação Total</b>	28,28	16				

Fonte: Da autora (2022).

Dessa forma, o modelo quadrático proposto na Equação 2 é adequado para prever a produção do ácido L-glutâmico intracelular pela cepa CCMA 0205.

$$\text{Glu} = -75,02628 + 9,93425X_A + 2,49128 \cdot X_B + 0,328106 \cdot X_C - 0,038250 (X_A \cdot X_B) - 0,010052 (X_A \cdot X_C) + 0,000719 (X_B \cdot X_C) - 0,837802X_A^2 - 0,033512X_B^2 - 0,002105X_C^2 \quad (2)$$

Onde:

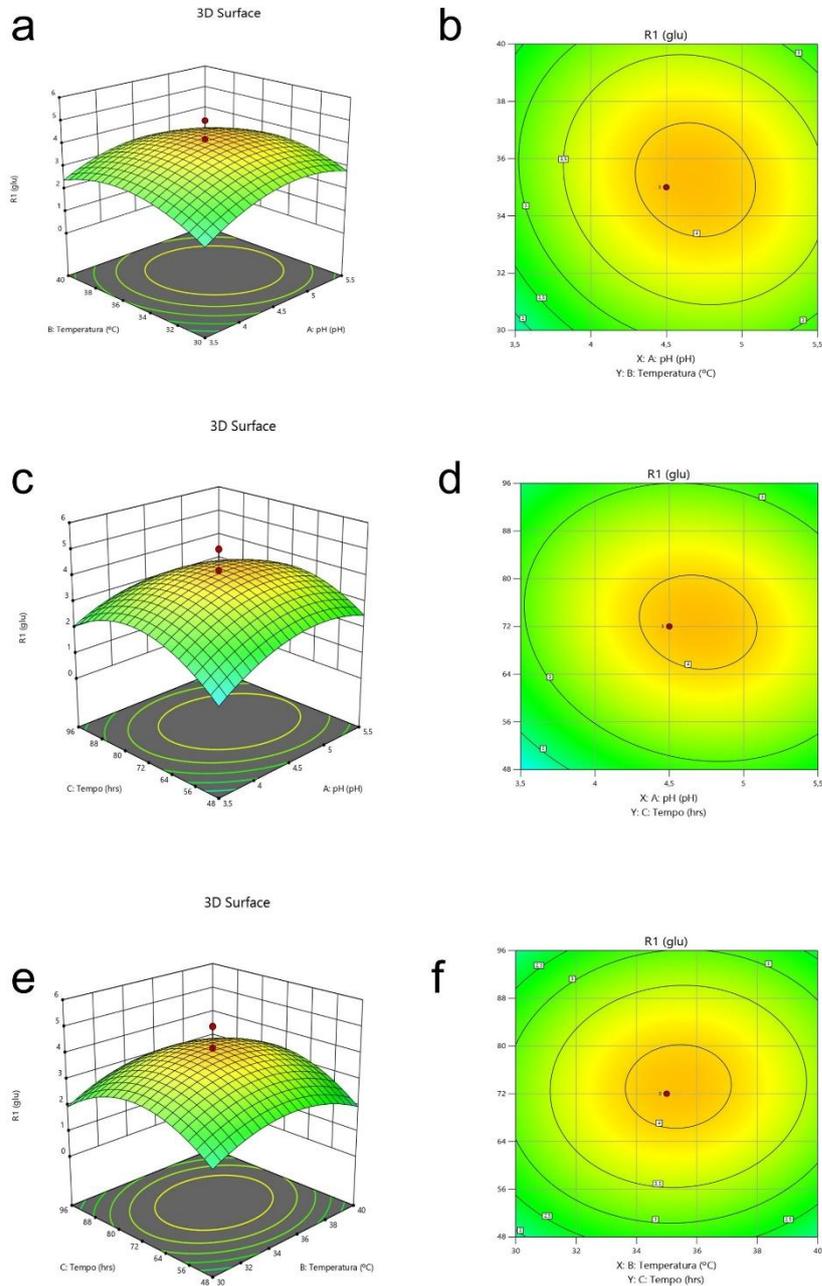
$X_A = \text{pH}$

$X_B = \text{Temperatura}$

$X_C = \text{Tempo}$

Os diagramas gráficos (superfície de resposta 3D e contorno 2D) mostram o efeito de três variáveis (PH, temperatura e tempo) na produção de L-GLU intracelular pela cepa CCMA 0205 gerado pelo modelo previsto (FIGURA 2).

Figura 2 - Gráficos de superfície e contorno dos efeitos dos fatores na **produção intracelular** de ácido L-glutâmico mM/L pela cepa CCMA 0205 (*Limosilactobacillus fermentum*). a, b: Interação de pH X temperatura; c, d: Interação de pH X tempo; e, f: Interação de temperatura X tempo.



Fonte: Da autora (2022).

Os dois modelos quadráticos, bem como os gráficos (FIGURAS 1 e 2), apresentaram as previsões médias dos fatores analisados sendo eles: pH 4,5, temperatura 35 °C de tempo médio de incubação 72 horas para a produção extracelular e intracelular de ácido L-glutâmico pela cepa CCMA 0205 (*Limosilactobacillus fermentum*). Os resultados indicaram ainda, que dentre os fatores avaliados, temperatura e tempo, respectivamente, são as variáveis que mais

influenciam no processo de fermentação e síntese de ácido L-glutâmico. Assim, a partir dos resultados, os modelos experimentais foram validados e explicaram a real conexão entre os fatores independentes e o resultado do L-GLU para o processo de fermentação da cepa CCMA 0205.

#### 4 DISCUSSÃO

A cepa escolhida, bem como as condições de crescimento, têm grande influência no crescimento celular e, conseqüentemente, na quantidade de metabólitos produzidos durante a fermentação, portanto, a otimização desses parâmetros pode melhorar a eficiência bacteriana (NAJAFI *et al.*, 2011; ALHARBI *et al.* 2020).

A maioria dos microrganismos produtores de ácido glutâmico e ácido gama-aminobutírico (GABA) produzem mais dos metabólitos quando submetidos em pH 5,0 ou abaixo (DHAKAL *et al.*, 2012), como observado no presente trabalho. Em estudo investigando o efeito de vários pH na produção de ácido glutâmico pela cepa LAB MNZ (*Lactiplantibacillus plantarum*), verificou-se que o valor de pH inicial de 4,5 foi o melhor em comparação com outros valores de pH. Ainda neste mesmo trabalho, verificou-se que entre 6 e 72 horas de fermentação, o pH imediatamente diminuiu de 6,2 para 4,2 seguido por um aumento lento ao longo do período restante de fermentação (ZAREIAN *et al.*, 2012).

A redução do pH pode refletir uma capacidade de produção de ácido pela bactéria como ácido láctico. Além disto, o declínio do pH é uma característica importante exigida pelas cepas iniciadoras para acidificar seu ambiente rapidamente (ZAREIAN *et al.*, 2012). Assim, O pH ácido, portanto, pode ser responsável por desencadear o gene *gdh* referente à enzima glutamato desidrogenase em bactérias do ácido láctico, resultando em produção elevada de ácido glutâmico (ZAREIAN *et al.*, 2013).

Temperaturas mais elevadas (> 30 °C) resultaram em maior produção de ácido L-glutâmico extracelular e intracelular das cepas de BAL avaliadas. O aumento da temperatura é o principal responsável por uma repressão ou inibição do complexo  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, que redireciona o fluxo de 2-oxoglutarato para a produção de ácido glutâmico e, conseqüentemente, aumenta a taxa de excreção de ácido glutâmico (ASAKURA *et al.*, 2007). Temperatura elevada (40 °C) também foi relatada como fator determinante para a produção máxima de ácido glutâmico pela BAL *Levilactobacillus brevis* (WORAHARN *et*

*al.*, 2014). Além disto, a cepa industrial de *C. glutamicum* apresenta condição de temperatura próxima de 30 °C (LIEBL, 2005).

No caso de *L. plantarum*, a temperatura de 34 °C foi relatada como sendo o ponto ótimo para a produção de GABA (TUNG *et al.*, 2011) e 37 °C para a produção de ácido glutâmico, sendo esta também, a temperatura ideal para a atividade da enzima Glutamato Desidrogenase GDH (ZAREIAN *et al.*, 2013).

O tempo é um dos fatores limitantes devido aos custos de produção industrial, dessa forma, o tempo deve ser otimizado no processo de produção microbiológica do aminoácido para se obter maiores rendimentos. No presente trabalho, verificou-se que o L-glu é produzido em maior quantidade a partir de 48 horas. O mesmo foi observado, para a cepa BAL MNZ, a produção total de ácido glutâmico aumentou entre 24 e 96 h, embora a relação de produção de ácido glutâmico/célula tenha diminuído. O aumento na produção de ácido glutâmico especialmente após 48 h foi devido ao aumento do número de células bacterianas na fase logarítmica, o que causou uma elevação no rendimento de ácido glutâmico. Já a concentração intracelular de ácido glutâmico diminui regularmente após 48 h devido a sua secreção no meio extracelular, um exportador de ácido glutâmico para o meio extracelular (ZAREIAN *et al.*, 2012).

A natureza complexa dos processos biológicos torna difícil prever todos os efeitos de cada parâmetro, bem como as múltiplas interações entre eles (NAJAFI *et al.*, 2011). Frente a isso, o DCCR, bem como RSM parecem ser estratégias úteis para a otimização da síntese de ácido L- glutâmico, pois são consideradas as interações multifatoriais (FAHIMITABAR *et al.*, 2021). No entanto, esta mesma complexidade pode ter influenciado os valores de cada parâmetro encontrado no processo de otimização da produção de ácido L-glutâmico produzido pela *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0205 e as demais cepas avaliadas.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a abordagem DCCR com RSM pode ser aplicada para avaliar as variáveis que influenciam na produção de L-GLU durante o processo fermentativo, e direcionam para as melhores condições de otimização do processo. As condições ótimas, previstas para a produção extracelular e intracelular da cepa *Limosilactobacillus fermentum* CCMA 0205 determinadas, foram pH 4,5, temperatura 35 °C e tempo 72 horas de incubação. Em conclusão, este estudo fornece as condições ideais de cultivo para a produção de L-GLU

pela cepa 0205 e indica que *L. fermentum* apresenta potencial promissor na produção deste aminoácido.

## REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, O. O.; KAREEM, S. O.; BALOGUN, S. A.; ADEOGUN, A. I. Optimization of Culture Conditions for L-Glutamic Acid production by *Bacillus flexus* Using Response Surface Methodology. **Research Square**, [S.l.], [S.v.], [S.n.], p. 1-13, 2022.
- ALHARBI, N. S.; KADAIKUNNAN, S.; KHALED, J. M.; ALMANAA, T. N.; INNASIMUTHU, G. M., RAJOO, B.; RAJARAM, S. K. Optimization of glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum* using response surface methodology. **Journal of King Saud University-Science**, [S.l.], v. 32, n. 2, p. 1403-1408, 2020.
- ASAKURA, Y.; KIMURA, E.; USUDA, Y.; KAWAHARA, Y.; MATSUI, K.; OSUMI, T.; NAKAMATSU, T. Altered metabolic flux due to deletion of *odhA* causes L-glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 73, n. 4, p. 1308-1319, 2007.
- COSTA, G. N. *et al.* Antimicrobial activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains against pathogenic microorganisms “in vitro”. **Semina: Ciências Agrárias**, [S.l.], v. 33, n. 5, p. 1839–1846, 2012.
- DHAKAL, R; BAJPAI, V. K.; BAEK, K-H. Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 43, p. 1230-1241, 2012.
- FAHIMITABAR, A.; RAZAVIAN, S. M. H.; REZAEI, S. A. Application of RSM for optimization of glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum* in bath culture. **Heliyon**, [S.l.], v. 7, n. 6, p. e07359, 2021.
- HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Glutamic acid fermentation: Discovery of glutamic acid-producing microorganisms, analysis of the production mechanism, metabolic engineering, and industrial production process. *Industrial Biotechnology*. **Products and Processes**, [S.l.], [S.v.], [S.n.], p. 339–360, 2016.
- LIEBL, W. **Corynebacterium taxonomy**. Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. FL: CRC Press, Boca Raton, 2005. p. 9-34.
- NAJAFI, A. R.; RAHIMPOUR, M. R.; JAHANMIRI, A. H.; ROOSTAAZAD, R.; ARABIAN, D.; SOLEIMANI, M.; JAMSHIDNEJAD, Z. Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S.l.], v. 82, n. 1, p. 33-39, 2011.
- ROSSETTI, V.; LOMBARD, A. Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [S.l.], v. 681, n. 1, p. 63-67, 1996.
- SUNITHA, I.; RAO, S.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-glutamic acid by the coimmobilized whole cells of *Micrococcus glutamicus* and *Pseudomonas reptilivora*. **Bioprocess Engineering**, [S.l.], v. 18, n. 5, p. 353-359, 1998

- TAVAKKOLI, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; AZIZI, M. H. Optimization of *Corynebacterium glutamicum* Glutamic Acid Production by Response Surface Methodology. **Food and Bioprocess Technology**, [S.l.], v. 5, n. 1, p. 92–99, 2012.
- TUNG, Y. T.; LEE, B. H.; LIU, C. F.; PAN, T. M. Optimization of culture condition for ACEI and GABA production by lactic acid bacteria. **Journal of Food Science**, [S.l.], v. 76, n. 9, p. M585-M591, 2011.
- WORAHARN, S.; LAILERD, N.; SIVAMARUTHI, B. S.; WANGCHAROEN, W.; SIRISATTHA, S.; PEERAJAN, S.; CHAIYASUT, C. Evaluation of factors that influence the L-glutamic and  $\gamma$ -aminobutyric acid production during *Hericium erinaceus* fermentation by lactic acid bacteria. **CyTA-Journal of Food**, [S.l.], v. 14, n. 1, p. 47-54, 2016.
- ZAREIAN, M.; EBRAHIMPOUR, A.; BAKAR, F. A.; MOHAMED, A. K. S.; FORGHANI, B.; AB-KADIR, M. S. B.; SAARI, N. A glutamic acid-producing lactic acid bacteria isolated from Malaysian fermented foods. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 13, n. 5, p. 5482-5497, 2012.
- ZAREIAN, M.; EBRAHIMPOUR, A.; MOHAMED, A. K. S.; SAARI, N. Modeling of glutamic acid production by *Lactobacillus plantarum* MNZ. **Electronic Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 16, n. 4, p. 12-12, 2013.
- ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M.; HARRIS, H. M.; MATTARELLI, P.; LEBEER, S. 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**, [S.l.], v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.