



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA**  
**DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR RIZÓBIOS EM MEIOS**  
**DE CULTIVO COM COPRODUTOS LÁCTEOS**

**CAROLINA HERRERA GONZÁLEZ**

**PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT**

Orientador

**RIO GRANDE, RS**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA  
DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR RIZÓBIOS EM MEIOS  
DE CULTIVO COM COPRODUTOS LÁCTEOS**

**CAROLINA HERRERA GONZÁLEZ**

**PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT**

Orientador

**RIO GRANDE, RS**

**2019**

## Ficha catalográfica

H565p Herrera González, Carolina.  
Produção de exopolissacarídeos por rizóbios em meios de cultivo com coprodutos lácteos / Carolina Herrera González. – 2019. 84f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

1. Biopolímeros 2. Bactérias Diazotróficas 3. Permeado de Soro 4. Colostro 5. Viscosidade Aparente I. Burkert, Carlos André Veiga II. Título.

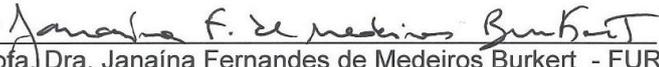
CDU 579.67:664

## APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Carolina Herrera González e aprovada em 01 de março de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

  
Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG

  
Profa. Dra. Patrícia Diaz de Oliveira - UFPEL

  
Profa. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert - FURG

  
Profa. Dra. Jaqueline Garda Buffon – FURG



**A mami y papi, gracias por tanto.**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente aos meus pais por seu amor, educação, apoio, e confiança em mim, a vida não vai alcançar para agradecer.

Aos meus irmãos por fazerem a minha vida mais divertida e cheia de vida e por sempre cuidarem de mim.

Aos meus melhores amigos por cada palavra de motivação e por compartilhar a existência em tempo e espaço.

Ao professor André por aceitar trabalhar junto, pela orientação, paciência e amabilidade no caminho andado.

Aos professores participantes da banca por terem aceitado acrescentar os seus conhecimentos e experiências no meu trabalho.

A cada um dos colegas dos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos e Análise Sensorial por me acolherem tão bem, pela paciência, pelas risadas, por entender o meu portunhol e, infinitamente agradecida, por terem compartilhado seus conhecimentos e experiências profissionais comigo.

Às meninas Tati e Margarita pela linda amizade, pelas conversas, pelo conhecimento compartilhado e por fazer a estadia no Brasil muito especial.

Ao Laboratório de Controle Ambiental, Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade, Laboratório de Tecnologia de Alimentos e Laboratório de Engenharia Bioquímica pela ajuda e apoio em cada análise e serviço.

Ao Laboratório de Pesquisa em Biotransformações de C e N do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria e ao Laboratório de Espectroscopia da Universidade Federal do Pampa, Campus Bagé.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Código de financiamento 001 e OEA pelo apoio financeiro.

Ao Brasil e sua gente por ter me acolhido e permitir uma experiência maravilhosa.



¡Vivan siempre el trabajo y la paz!  
(Gutiérrez, M. Himno Nacional de Costa Rica)



## RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros sintetizados por micro-organismos, apresentam ampla variedade de combinações estruturais que dão origem a diferentes propriedades (alta viscosidade, capacidade de gelificação, emulsificação e atividade antioxidante) e, assim, possibilidades de aplicação, sendo os rizóbios bactérias sintetizadoras destas macromoléculas. A síntese dos EPS por rizóbios envolve o uso de uma fonte de carbono no meio de cultivo, normalmente são utilizados açúcares como sacarose ou glicose, representando altos custos, motivando assim a exploração de outras fontes como coprodutos ou resíduos das indústrias. No presente estudo, a produção e as características de EPS sintetizados por bactérias da família *Rhizobiaceae* foram investigadas utilizando meios contendo permeado de soro e colostro bovinos como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente. Os meios utilizados foram *Yeast Manitol Agar* (YMA) com razão C/N de 96,5 como meio de comparação, meio a base de permeado de soro (P) e meio com permeado de soro e colostro (PC), ambos com razão C/N de 20. Os cultivos bacterianos foram realizados em frascos agitados a 30 °C e 200 rpm por 96 h, avaliando a biomassa, pH e produção final de EPS. Os EPS foram recuperados por precipitação alcoólica, dialisados e liofilizados para caracterizá-los. Posteriormente foram selecionados os EPS provenientes dos cultivos mais promissores em produção e comportamento reológico, sendo caracterizados quanto à viscosidade aparente em soluções salinas de NaCl e KCl, massa molar, espectroscopia de infravermelho (FT-IR) para verificação de grupamentos funcionais, potencial zeta e propriedades térmicas por Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). As maiores produções foram apresentadas pelas bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454 no meio P, com  $4,86 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$  e  $6,15 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, seguidas pelas produções destas mesmas bactérias no meio YMA. O emprego do meio PC resultou em baixa produção de EPS e soluções com baixa viscosidade. No cultivo com emprego do meio YMA, todas as soluções estudadas apresentaram comportamento pseudoplástico, obtendo-se as mais altas viscosidades aparentes para as soluções de EPS de *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454. Apesar destas bactérias produzirem maiores quantidades dos biopolímeros no meio P, apresentaram menor viscosidade quando comparadas com o meio YMA, porém mantiveram o comportamento pseudoplástico. Os biopolímeros obtidos a partir de *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454 cultivados em meio P, denominados respectivamente EPS-PM816 e EPS-PM6454, foram caracterizados como macromoléculas de alta massa molar, de alta estabilidade térmica em possíveis condições de aplicação e com altos valores de potencial eletrostático. Além disso, os espectros de FT-IR detectaram a presença de grupos funcionais característicos destas biomoléculas. A viscosidade aparente das soluções salinas de NaCl e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e  $1 \text{ mol L}^{-1}$  com 1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) de EPS demonstrou uma diminuição em relação à solução aquosa sem adição de sais, sendo mais marcante no caso das soluções do EPS-PM6454 (55-60%) e menos pronunciada no caso de EPS-PM816 (12-24%), porém não afetando o comportamento pseudoplástico. Desta forma, os resultados observados neste estudo indicam o potencial de uso do permeado de soro na área biotecnológica, para ser metabolizado por rizóbios na síntese de biopolímeros com características e propriedades de interesse industrial.

**Palavras-chave:** biopolímeros; bactérias diazotróficas; permeado de soro; colostro; viscosidade aparente.



# EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCTION BY RHIZOBIA IN CULTURE MEDIUM WITH DAIRY BYPRODUCTS

## ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are biopolymers synthesized by microorganisms; they present a wide variety of structural combinations that give a rise to different properties (high viscosity, gelation, emulsification properties and antioxidant activity) and thus possibilities of application; being rhizobia bacteria synthesizers of these macromolecules. The synthesis of EPS by rhizobia involves the use of a carbon source in the culture medium. Moreover, sugars such as sucrose or glucose are usually used representing high costs, thus motivating the exploration of other sources as byproducts or wastes of the industries. In the present study, the production and characteristics of EPS synthesized by bacteria of the family *Rhizobiaceae* were investigated using media containing whey permeate and colostrum as carbon and nitrogen source, respectively. The media used were Yeast Manitol Agar (YMA), with C/N ratio of 96.5, as the comparison medium, whey permeate (P) medium and whey permeate and colostrum (PC) medium, both with C/N ratio of 20. The bacterial cultures were performed in shaken flasks at 30 °C and 200 rpm for 96 h, evaluating the biomass, pH and final EPS production. EPS were recovered by alcohol precipitation, dialyzed and lyophilized, in order to characterize them. Afterwards, the EPS selected from most promising cultures, in relation to production and rheological behavior, were characterized in terms of apparent viscosity in NaCl and KCl saline solutions, molecular weight, infrared spectroscopy (FT-IR), for the verification of functional groups, zeta potential and thermal properties by Thermogravimetric Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). The highest culture was presented by the bacteria *Mesorhizobium* sp. Semia 816 and *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454 in the medium P, with  $4.86 \pm 0.19 \text{ g L}^{-1}$  and  $6.15 \pm 0.29 \text{ g L}^{-1}$ , respectively, followed by productions of the same bacteria in the YMA medium. The PC medium was not sufficiently effective in the synthesis of EPS because of the low production observed and low viscosity of the solutions of the biopolymers. In the YMA medium, all solutions studied presented pseudoplastic behavior, obtaining high apparent viscosities for the solutions of EPS from *Mesorhizobium* sp. Semia 816 and *M. huakuii* Semia 6454. Although these bacteria produced larger amounts of the biopolymers in the P medium, they presented lower viscosity when compared with the YMA medium, but they maintained the pseudoplastic behavior. The biopolymers obtained from *Mesorhizobium* sp. Semia 816 and *M. huakuii* Semia 6454 produced with the P medium, denominated respectively EPS-PM816 and EPS-PM6454, were characterized as macromolecules of high molecular weight, with high thermal stability under possible conditions of application and high values of electrostatic potential. In addition, FT-IR spectra detected the presence of functional groups characteristic of these biomolecules. The apparent viscosity of EPS in  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  and  $1 \text{ mol L}^{-1}$  NaCl and KCl solutions with 1% (m v<sup>-1</sup>) of EPS showed a decrease in relation to the aqueous solution without addition of salts, being more striking in the case of EPS-PM6454 solutions (55-60%) and lighter in the case of EPS-PM816 (12-24%), but the pseudoplastic behavior was maintained. Thus, the results observed in this study indicate the potential of the use of whey permeate in the biotechnology area, to be metabolized by rhizobia in the synthesis of biopolymers with characteristics and properties of industrial interest.

**Keywords:** Biopolymers; diazotrophic bacteria; whey permeate; colostrum; apparent viscosity.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Exopolissacarídeos bacterianos: características e aplicações.....	26
<b>Tabela 2-</b> Condições de cultivo na produção de EPS por rizóbios.....	33
<b>Tabela 3 -</b> Análise elementar dos coprodutos lácteos e extrato de levedura .....	45
<b>Tabela 4 –</b> Composição centesimal dos coprodutos lácteos (média $\pm$ desvio padrão) e valores de referência.....	46
<b>Tabela 5 -</b> Parâmetros avaliados nos cultivos das bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816, <i>M. huakuii</i> Semia 6454 e <i>R. galegae</i> Semia 6448 nos meios YMA, P e PC.....	52
<b>Tabela 6 -</b> Parâmetros reológicos das soluções 1% m v <sup>-1</sup> dos EPS sintetizados nos meios YMA, P e PC obtidos com o modelo Ostwald-de-Waele (Lei da Potência).....	61
<b>Tabela 7-</b> Parâmetros moleculares para EPS-PM816 e EPS-PM6454.....	64

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura química do EPS produzido por <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> .	28
<b>Figura 2</b> - Estrutura química do EPS produzido por <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 4S. .....	28
<b>Figura 3</b> - Estrutura química do EPS produzido por <i>Sinorhizobium meliloti</i> .	28
<b>Figura 4</b> – Acompanhamento da Ln (DO) para a bactéria <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 ....	46
<b>Figura 5</b> - Acompanhamento da Ln (DO) para a bactéria <i>R. galegae</i> Semia 6448 .....	47
<b>Figura 6</b> - Acompanhamento da Ln (DO) para a bactéria <i>M. huakuii</i> Semia 6454 .....	47
<b>Figura 7</b> – Acompanhamento da biomassa no meio YMA para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (■), <i>R. galegae</i> Semia 6448 (▲) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (●) .....	48
<b>Figura 8</b> – Acompanhamento do pH no meio YMA para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (■), <i>R. galegae</i> Semia 6448 (▲) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (●) .....	48
<b>Figura 9</b> - Acompanhamento da biomassa no meio P para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (■), <i>R. galegae</i> Semia 6448 (▲) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (●) .....	49
<b>Figura 10</b> - Acompanhamento do pH no meio P para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (■), <i>R. galegae</i> Semia 6448 (▲) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (●) .....	49
<b>Figura 11</b> - Acompanhamento da biomassa no meio PC para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (■) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (●) .....	50
<b>Figura 12</b> - Acompanhamento do pH no meio PC para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (■) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (●) .....	51
<b>Figura 13</b> – Comportamento da viscosidade para EPS (1% m v <sup>-1</sup> ) produzido em meio YMA para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (●), <i>R. galegae</i> Semia 6448 (■) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (▲) .....	57
<b>Figura 14</b> - Comportamento da viscosidade para EPS (1% m v <sup>-1</sup> ) produzido em meio P para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (●), <i>R. galegae</i> Semia 6448 (■) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (▲) .....	57
<b>Figura 15</b> - Comportamento da viscosidade para EPS (1% m v <sup>-1</sup> ) produzido em meio PC para as bactérias <i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816 (●) e <i>M. huakuii</i> Semia 6454 (■) .....	58
<b>Figura 16</b> - Comportamento da viscosidade de soluções aquosas salinas de NaCl e KCl do EPS-PM816 .....	62
<b>Figura 17</b> - Comportamento da viscosidade de soluções aquosas salinas de NaCl e KCl do EPS-PM6454 .....	63
<b>Figura 18</b> - Espectro de FT-IR dos principais grupos funcionais para EPS-PM816 (a) e EPS- PM6454 (b) .....	65
<b>Figura 19</b> - Análise termogravimétrica (TGA) para os EPS-PM816 e EPS- .....	66
<b>Figura 20</b> - Termograma DSC para os EPS-PM816 e EPS-PM6454. ....	67

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>23</b>
3.1 EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS.....	23
3.2 RIZOBIOS E PRODUÇÃO DE EPS .....	27
3.3 FATORES ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE EPS.....	30
<b>3.3.1 Composição do meio de cultivo</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.2 Fatores ambientais na produção de EPS</b> .....	<b>31</b>
3.4 FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO ALTERNATIVAS.....	34
<b>3.4.1 Permeado de soro</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.2 Colostro</b> .....	<b>35</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1 MICRO-ORGANISMOS .....	37
4.2 COPRODUTOS LÁCTEOS .....	37
<b>4.2.1 Análise elementar dos coprodutos lácteos e extrato de levedura</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2.2 Proteína total</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2.3 Lipídeos</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2.4 Cinzas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2.5 Umidade</b> .....	<b>38</b>
4.3 CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE EPS .....	38
<b>4.3.1 Ativação das bactérias</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3.2 Preparo do inóculo</b> .....	<b>38</b>
<b>4.3.3 Meios de cultivo</b> .....	<b>39</b>
<b>4.3.4 Cultivos em frascos agitados</b> .....	<b>39</b>
4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS NOS CULTIVOS.....	40
<b>4.4.1 Biomassa</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4.2 pH</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4.3 Quantificação e recuperação dos EPS</b> .....	<b>40</b>
4.5 PARÂMETROS CINÉTICOS .....	41
<b>4.5.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5.2 Produtividade</b> .....	<b>41</b>
<b>4.5.3 Fator de conversão biomassa em produto</b> .....	<b>41</b>
4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS EPS .....	42
<b>4.6.1 Propriedades reológicas de soluções de EPS</b> .....	<b>42</b>
<b>4.6.2 Viscosidade de soluções de EPS em presença de sais</b> .....	<b>43</b>
<b>4.6.3 Massa molar</b> .....	<b>43</b>
<b>4.6.4 Análises térmicas</b> .....	<b>43</b>
<b>4.6.5 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)</b> .....	<b>44</b>
<b>4.6.6 Potencial Zeta</b> .....	<b>44</b>

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COPRODUTOS LÁCTEOS E EXTRATO DE LEVEDURA .....	45
5.2 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO .....	46
5.3 CULTIVOS RIZOBIANOS.....	47
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EPS .....	56
5.4.1 Propriedades reológicas dos EPS.....	56
5.4.2 Comportamento da viscosidade em presença de sais .....	60
5.4.3 Massa molar.....	63
5.4.4 FT-IR.....	64
5.4.5 Análises térmicas: TGA e DSC .....	65
5.4.6 Potencial Zeta .....	67
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros constituídos por monossacarídeos e seus derivados, sendo sintetizados por micro-organismos e acumulados no ambiente extracelular, apresentando ampla variedade de combinações estruturais que dão origem a diferentes propriedades e, assim, possibilidades de aplicação (MOSCOVICI, 2015). Os rizóbios são bactérias capazes de fixar nitrogênio em simbiose com plantas leguminosas e são conhecidos como sintetizadores de EPS em importantes quantidades (PRIYANKA et al., 2015). Nesse contexto, diversos estudos têm sido realizados para explorar a produção de EPS por rizóbios e as suas características físico-químicas e propriedades (ANDHARE et al., 2017; CASTELLANE et al., 2015; CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014; MORETTO et al., 2015; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018; PRIYANKA et al., 2015; ZHOU et al., 2014).

O interesse nestes biopolímeros rizobianos é gerado pelas características que apresentam, assim como pelos possíveis usos em aplicações comerciais em bionanotecnologia, nas indústrias alimentícia e cosmética, em setores ambientais (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014), em produtos e processos médicos e farmacêuticos (FREITAS; ALVES; REIS, 2011). Os EPS apresentam propriedades de pseudoplasticidade, tixotropia, alta viscosidade, gelificação, emulsificação e atividade antioxidante (PRIYANKA et al., 2015), sendo considerados como possíveis agentes espessantes, de ligação, de comportamento polieletrólítico (FREITAS; ALVES; REIS, 2011), biodegradáveis, inócuos e capazes de formar estruturas de rede tridimensional na liberação controlada de fármacos (MOSCOVICI, 2015).

Além das características e propriedades dos EPS, desde uma perspectiva de processamento industrial, a produção destes biopolímeros por cultivos microbianos tem vantagens como altas taxas de crescimento dos micro-organismos, alto rendimento e produtividade assim como a possibilidade de controlar condições de produção e assim conseguir a manipulação de algumas de suas propriedades (MARQUES et al., 2017).

Nos processos produtivos de EPS bacterianos, o meio de cultivo representa um custo importante, devido a ser normalmente composto por açúcares como sacarose e glicose, motivando assim a exploração de outras fontes de carbono como coprodutos ou resíduos da indústria alimentícia ou da agricultura para serem aproveitados (FREITAS; TORRES; REIS, 2017), gerando assim uma possibilidade de melhorar a rentabilidade, características e propriedades.

De acordo com essas tendências e necessidades das indústrias relacionadas com estes materiais, o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) iniciou estudos em 2012 que envolvem a produção e caracterização de EPS provenientes de bactérias diazotróficas da família *Rhizobiaceae* cultivadas em meios contendo coprodutos industriais, gerando uma base de conhecimento que tem permitido explorar mais aspectos destes biopolímeros.

Neste contexto, o permeado de soro é gerado na remoção das proteínas e outros sólidos lácteos do soro de queijo por técnicas físicas de separação na obtenção de concentrados de proteína. Este coproduto em pó é composto principalmente de lactose, assim como de outros componentes em menor quantidade como cinzas e nitrogênio solúvel (FITZPATRICK; AHRENS; SMITH, 2001), tendo um grande potencial de disponibilidade no Brasil, onde é produzido aproximadamente 9 bilhões de litros anuais de soro de queijo (MILKPOINT, 2016). Por outro lado, o colostro bovino é o primeiro leite que o bezerro recebe, secretado durante os primeiros dias após o parto, contendo proteínas, carboidratos (lactose), gorduras, vitaminas, minerais e moléculas biologicamente ativas, como fatores de crescimento e antimicrobianos (PAKKANEN; AALTO, 1997), normalmente apresenta excedentes já que não é totalmente consumido pelo bezerro, sendo estimado que no Brasil são descartados anualmente dois bilhões de litros (SAALFELD, 2017).

No presente estudo, bactérias diazotróficas da família *Rhizobiaceae* foram estudadas a fim de avaliar a sua capacidade de metabolizar permeado de soro e colostro bovino em pó como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, para produzir EPS e determinar se, ao estudar algumas de suas características, são potencialmente interessantes a nível industrial, ampliando uma possibilidade destes coprodutos serem aproveitados em processos biotecnológicos, minimizando o impacto ambiental, devido a que são potencialmente contaminantes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção e características de EPS sintetizados por bactérias da família *Rhizobiaceae* utilizando meios contendo coprodutos lácteos na composição.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Para as bactérias em estudo (*Mesorhizobium* sp. Semia 816, *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454 e *Rhizobium galegae* Semia 6448), cultivadas em meios contendo permeado de soro (P), permeado de soro e colostro (PC) e manitol (YMA), determinar os parâmetros cinéticos relativos ao crescimento celular, produção de EPS e comportamento reológico de soluções aquosas de EPS;
- Para os EPS mais promissores, avaliar o comportamento da viscosidade de soluções aquosas em presença de sais, massa molar, grupamentos funcionais da estrutura, termoestabilidade e potencial zeta dos EPS selecionados.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

Polissacarídeos são macromoléculas poliméricas constituídas por monossacarídeos e seus derivados, alguns de interesse industrial, que podem ser extraídos de plantas, algas, fungos e bactérias, constituindo uma matéria prima de elevada importância pelas características e possíveis funções. Porém, os biopolímeros bacterianos estão incrementando a sua participação e produção no mundo por serem de base biológica e detentores de características com grande potencial industrial (RÜHMANN; SCHMID; SIEBER, 2015), apresentando, além de características mais conhecidas, como geração de viscosidade, gelificação e emulsificação, potencial uso na formação de micro e nanoestruturas com substâncias de interesse (FREITAS; ALVES; REIS, 2011) assim como aplicações médicas (MOSCOVICI, 2015).

Alguns autores relatam que os EPS bacterianos, além de tecnologicamente serem funcionais, apresentam vantagens quando comparados com aqueles derivados de plantas ou macroalgas: a produção pode ser em tempos mais curtos, a extração mais simples e, por serem produzidos em biorreatores, não competem com cultivos para produção de alimentos (FREITAS; TORRES; REIS, 2017), a produção não é afetada por fatores ambientais (ROCA et al., 2015) e se torna fácil o controle dos parâmetros de produção, dando como resultado reprodutibilidade e alta qualidade no produto final (MOSCOVICI, 2015).

Nas células bacterianas são identificados três possíveis tipos de polissacarídeos: citosólicos (fonte de carbono e energia celular), estruturais (constituintes da parede celular) e exopolissacarídeos (formados dentro da célula e excretados ao ambiente extracelular como cápsulas ou biofilmes) (DONOT et al., 2012). Especificamente, os exopolissacarídeos (EPS) são acumulados fora das células e apresentam uma variedade de combinações estruturais, que são as responsáveis pelas propriedades particulares que os caracterizam (MOSCOVICI, 2015).

Freitas, Alves e Reis (2011) explicam que estas macromoléculas são compostas por unidades de açúcares repetitivas que geram diferentes possibilidades de estruturas moleculares (lineares ou ramificadas), graus de ramificação, massa molar e substituintes orgânicos. Unidades de D-glicose, D-manose, D-galactose e ácido glicurônico podem estar frequentemente na composição, e L-ramnose ou L-fucose são menos comuns (SUTHERLAND, 2001).

De acordo com a composição química, os EPS são divididos em homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos: os homopolissacarídeos são constituídos por um

único tipo de monômero (normalmente D-glicose) enquanto que os heteropolissacarídeos podem conter vários tipos de unidades repetitivas dispostas, desde dissacarídeos até octassacarídeos, e com a possibilidade de ter na estrutura outros grupos, tais como acetil (SUTHERLAND, 2001).

Os comportamentos referentes à síntese e acúmulo de EPS por parte dos micro-organismos podem ser diferentes dependendo da fase da curva de crescimento. Liu et al. (2017) afirmam que, em muitos casos, a produção está relacionada com o crescimento microbiano, alcançando níveis máximos quando este crescimento atinge a fase estacionária. No estudo realizado por Radchenkova et al. (2013), a produção de EPS por *Aeribacillus pallidus* 418 começou na fase exponencial inicial e continuou durante a fase estacionária inicial.

O processo de síntese de EPS demanda complexas rotas bioquímicas com requerimentos específicos, mas pode ser dividida, de acordo com Donot et al. (2012), em três etapas principais: assimilação do substrato que é a fonte de carbono, síntese intracelular do polissacarídeo e exsudação do EPS para fora da célula.

Naturalmente, os EPS apresentam funções específicas nos diferentes habitats onde estão presentes, sendo que a maioria das funções atribuídas a eles são de natureza protetora, por exemplo à dessecação e à predação por protozoários (KUMAR; MODY; JHA, 2007). Também exercem proteção contra estresse biótico (competição entre organismos) e tensões abióticas como temperatura, intensidade luminosa ou pH e, em alguns casos, ajudam na adaptação a condições extremas (DONOT et al., 2012). Mann e Wozniak (2012) mencionam que este material favorece a colonização dos micro-organismos, ao permitir a formação de agregados, assim como a aderência e tolerância às superfícies.

Quando os EPS são produzidos e recuperados para uso, são atribuídas características de relevância industrial, especialmente em soluções aquosas. São usados como agentes de espessamento, estabilização e aglutinação, resultado de seu comportamento não newtoniano e alta viscosidade em meios aquosos, sendo essas as funções mais reconhecidas (FREITAS; ALVES; REIS, 2011).

Kumar, Mody e Jha (2007) indicam que podem ser gelificantes com boa estabilidade, emulsificantes e removedores de metais pesados. Porém outras funções são reportadas, como funções de cicatrização de feridas, pró-angiogênicas, antioxidantes, anticoagulantes e antivirais (FREITAS; ALVES; REIS, 2011).

Em aplicações na indústria alimentícia, devem ser capazes de manter suas propriedades quando são incorporados nas formulações, onde poderiam experimentar uma variabilidade significativa do pH e força iônica, junto com a influência de outros componentes

do alimento (FREITAS; ALVES; REIS, 2011). Além dos EPS satisfazerem funções industriais específicas, apresentam baixa toxicidade, maior degradabilidade, melhor compatibilidade com o meio ambiente, alta atividade específica a temperaturas extremas, pH e salinidade (IYER; MODY; JHA, 2006).

As propriedades funcionais dos EPS são dependentes da sequência e composição dos açúcares, a conformação estrutural e a massa molar, fazendo com que gerem desde soluções viscosas até materiais com comportamento pseudoplástico (REHM, 2010). Sendo assim, as variáveis que influenciem na estrutura dos EPS em consequência também influirão sobre as características tecnológicas e propriedades.

Seguindo com as características de composição, carga e funções tecnológicas em diferentes segmentos industriais, Radchenkova et al. (2013) indicam que a natureza aniônica dos EPS coincide com um aumento do teor de ácidos urônicos e que a natureza polianiônica de EPS está relacionada com a presença de ácidos urônicos ou piruvato na ligação cetálica, afetando assim as propriedades em soluções aquosas (viscosidade intrínseca, conformação molecular e flexibilidade, entre outras) (FREITAS; ALVES; REIS, 2011). Além disso, segundo Castellane et al. (2015), a presença de grupos hidrofóbicos dentro dessas macromoléculas pode contribuir com as propriedades emulsionantes dos EPS.

Nesse sentido, as diferenças estruturais e de carga dos EPS, que também são dependentes do tipo de micro-organismo, rota bioquímica envolvida e da fonte de carbono aproveitada, vão influenciar as propriedades, comportamento reológico e interação com outros componentes nos sistemas aplicados, sejam alimentares ou farmacêuticos, por exemplo.

Atualmente, os micro-organismos produtores de EPS usados em níveis industriais são provenientes de espécies de *Xanthomonas*, *Leuconostoc*, *Sphingomonas* e *Alcaligenes*, produzindo xantana, dextrana, gelana e curdlana (TOKSOY, 2013). Maiores detalhes destes EPS são apresentados na Tabela 1, incluída a fonte microbiana, componentes, carga, propriedades e principais aplicações. Como pode ser observado, alguns dos biopolímeros podem ser sintetizados por diferentes micro-organismos, a glicose é o monossacarídeo mais comumente apresentado nas estruturas e apresentam vários grupos funcionais como piruvato, acetato e succinato que podem definir propriedades ou características. Além disso, a carga global destes EPS é neutra ou aniônica e as propriedades mais destacadas são relacionadas a sua reologia, gerando soluções viscosas e atuando como agentes gelificantes. Esta variedade de características faz com que sejam aplicados em várias indústrias, sendo mais comumente aplicados na área de alimentos, farmacêutica e cosmética.

**Tabela 1-** Exopolissacarídeos bacterianos: características e aplicações.

<b>EPS/ Micro-organismo</b>	<b>Componentes</b>	<b>Carga</b>	<b>Principais propriedades</b>	<b>Principais aplicações</b>
Xantana <i>Xanthomonas</i> sp.	Glicose Manose Ácido glicurônico Acetato Piruvato	Aniônica	Hidrocoloide; Alta viscosidade com baixas taxas de cisalhamento; Estabilidade em ampla faixa de temperatura, pH e concentrações de sal.	Alimentos; Indústria petrolífera; Farmacêutica; Cosmética; Agricultura.
Gelana <i>Sphingomonas</i> <i>paucimobilis</i> <i>Alcaligenes</i> <i>faecalis</i>	Glicose Ramnose Ácido glicurônico Acetato Glicerato	Aniônica	Hidrocoloide; Estabilidade em ampla faixa de pH; Capacidade de gelificação; Géis termorreversíveis.	Alimentos; Farmacêutica; Pesquisa.
Dextrana <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Leucomostoc</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.	Glicose	Neutra	Não iônico; Boa estabilidade; Comportamento newtoniano.	Alimentos; Farmacêutica; Meios cromatográficos.
Curdiana <i>Agrobacterium</i> sp. <i>Alcaligenes</i> sp.	Glicose	Neutra	Formação de gel; Insolubilidade em água; Comestíveis e não tóxicos; Atividade biológica.	Alimentos; Farmacêutica; Remoção de metal pesado; Aditivo concreto.
Succinoglicana <i>Agrobacterium</i> sp. <i>Rhizobium</i> sp. <i>Alcaligenes</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	Glicose Galactose Acetato Piruvato Succinato 3-Hidroxitirato	Aniônica	Soluções aquosas viscosas; Estabilidade ácida.	Alimentos; Recuperação de óleo.
Levana <i>Bacillus subtilis</i> <i>Erwinia</i> sp. <i>Halomonas</i> <i>smyrensi</i> <i>Zymomonas</i> <i>mobilis</i>	Frutose	Neutra	Baixa viscosidade; Solubilidade em água; Atividade biológica: antitumoral e anti- inflamatória; Força adesiva; Capacidade de formação de filme.	Alimentos (prebióticos); Medicamentos; Cosméticos; Indústria.

Fonte: Adaptado de FREITAS; ALVES; REIS (2011)

### 3.2 RIZÓBIOS E PRODUÇÃO DE EPS

Os rizóbios são bactérias estudadas para produção de biopolímeros com potencial industrial e são classificados como bactérias diazotróficas. Os micro-organismos diazotróficos possibilitam a fixação biológica de N<sub>2</sub> ao reduzi-lo via enzimática à amônia, sendo desta forma acessível aos organismos vivos (REINHOLD; HUREK, 1998). Segundo os mesmos autores, as plantas constituem estas associações com bactérias diazotróficas (simbioses) para obter este benefício. Um exemplo é a simbiose entre leguminosas e rizóbios, onde estas bactérias fixam nitrogênio como endossimbiontes dentro de nódulos radiculares em um micro-ambiente rico em nutrientes. Estas associações são muito específicas entre estes parceiros simbióticos, significando que só certas combinações entre estes organismos são efetivas para o processo de fixação (SCHULTZE; KONDOROSI, 1998).

Poole e Allaway (2000) explicam que o principal benefício da simbiose entre a bactéria e a planta é a redução de gastos energéticos, pois a fixação do nitrogênio por parte da bactéria resulta em um gasto alto, precisando de alta quantidade de carbono fornecido pela planta, sendo uma troca altamente regulada de carbono e nitrogênio. A fixação é possível pela síntese de enzima nitrogenase e outras proteínas por parte dos rizóbios, recebendo da planta carboidratos que pode utilizar como fonte de carbono e energia (GHOSH; MAITI, 2016). Os rizóbios podem ser divididos em cinco gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium* (POOLE; ALLAWAY, 2000).

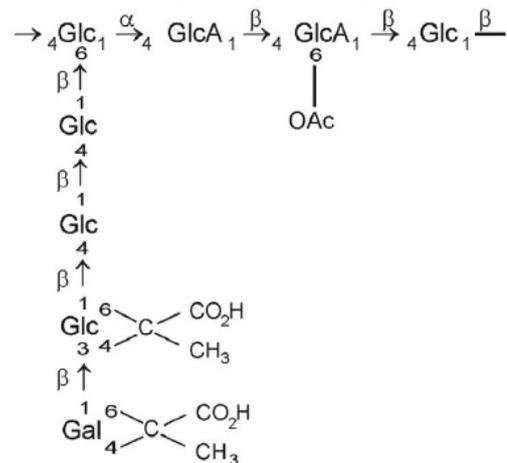
A partir desta simbiose, entre os rizóbios e leguminosas, é produzida uma variedade de polissacarídeos que têm sido estudados a nível laboratorial visando aplicações industriais, pelas características particulares que apresentam, respaldando assim o potencial de estudo dessas bactérias, porém ainda não são produzidos comercialmente (CASTELLANE et al., 2015).

Os rizóbios são capazes de produzir expressivas quantidades de EPS com alta viscosidade (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014) e seu uso não reporta nenhuma condição de insegurança sobre a saúde humana (GARCÍA et al., 2012). Estes biopolímeros são formados pela condensação de monossacarídeos e unidos através de ligações glicosídicas, resultando em polímeros de alta massa molar (DUTA et al., 2004), sendo os monossacarídeos comumente constituintes descritos como D-glicose, D-manose, D-galactose, L-ramnose, ácido D-glicurônico e ácido D-galacturônico (GHOSH; MAITI, 2016).

Nas Figuras 1, 2 e 3 se observam as diferenças estruturais em EPS provenientes de rizóbios. As Figuras 1 e 2 mostram a estrutura proveniente da mesma estirpe, mas de diferentes

biovares, apresentando diferenças no conteúdo de açúcar e no comprimento da cadeia lateral (SKORUPSKA et al., 2006). De acordo com Schmid, Sieber e Rehm (2015), essas diferenças estruturais podem ser influenciadas pelos genes dos micro-organismos envolvidos, assim como os complexos enzimáticos, sendo assim geradas diferenças no metabolismo e provavelmente na forma de interagir com os meios e os substratos presentes.

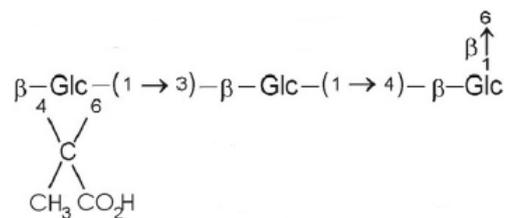
**Figura 1** – Estrutura química do EPS produzido por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.



Glc: glicose; GlcA: ácido glicurônico; Gal: galactose

Fonte: SKORUPSKA et al. (2006).

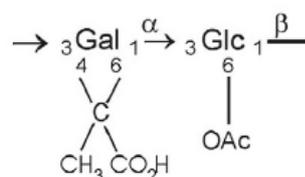
**Figura 2** - Estrutura química do EPS produzido por *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 4S.



Glc: glicose

Fonte: SKORUPSKA et al. (2006).

**Figura 3** - Estrutura química do EPS produzido por *Sinorhizobium meliloti*.



Gal: galactose; Glc: glicose

Fonte: SKORUPSKA et al. (2006).

Diferentes estudos com rizóbios foram desenvolvidos nos últimos anos gerando relevantes informações visando escalonamento industrial. O foco tem sido no estudo de diferentes cepas produtoras, crescimento celular, rendimento, fontes de carbono e nitrogênio, otimização de meios de cultivo, assim como avaliação das características dos EPS produzidos.

Andhare et al. (2017) obtiveram cinco cepas produtoras de EPS de *Rhizobium radiobacter* a partir de uma amostra de colhada, selecionando a mais promissora, que denominaram *R. radiobacter* CAS, e caracterizaram o EPS quanto à composição de monossacarídeos, grupos estruturais, comportamento da viscosidade em diferentes concentrações de EPS, sais e em diferentes pH e também avaliaram a termorresistência do biopolímero. A produção máxima de EPS foi de 2302 mg L<sup>-1</sup>, sendo composto por galactose (12,2% mol) e glicose (85,3% mol), pelo que os autores denominam como um heteropolissacarídeo de tipo galactoglicana com uma razão Glc/Gal de 6,99 confirmando a semelhança com uma succinoglicana padrão. Alguns dos grupos estruturais caracterizados foram hidroxila (O-H), metila (CH<sub>3</sub>), carbonila (C=O) e carboxilato (-COO<sup>-</sup>).

Seguindo com este estudo, a viscosidade aparente teve uma tendência de aumentar conforme a concentração do EPS (1,0-5,0%) e as soluções aquosas deste biopolímero mostraram um comportamento pseudoplástico. Apresentou uma viscosidade aparente de 158 mPa s a uma taxa de cisalhamento de 70 s<sup>-1</sup>, resultando em um potente biopolímero para uso industrial por sua alta viscosidade (em comparação com a goma xantana) e boa estabilidade. O comportamento da viscosidade se mostrou quase invariável na faixa de pH de 3,0 até 11,0. No estudo da viscosidade em presença de sais, foram preparadas soluções do EPS 10% (m v<sup>-1</sup>) com sais de cálcio, magnésio, potássio e sódio, apresentando muita estabilidade e pouca alteração. Na avaliação do efeito da temperatura sobre a viscosidade, não houve efeito significativo sobre a viscosidade aparente na faixa de 10-60 °C.

Em outro estudo, realizado por Zhou et al. (2014), *R. radiobacter* S10, produziu 2834,2 mg L<sup>-1</sup> usando soro de leite em pó reconstituído no meio de cultivo, sendo o EPS composto por galactose e glicose com quantidades traço de glicosamina e manose, apresentando um comportamento pseudoplástico (viscosidade diminui conforme aumenta a taxa de cisalhamento), concluindo-se que apresenta um ótimo potencial como espessante e estabilizante.

O EPS produzido por *Mesorhizobium loti* Semia 816 quando cultivado em meio com glicerol foi caracterizado por Oliveira, Amaral e Burkert (2018). A produção obtida foi de 4,91 g L<sup>-1</sup> com um conteúdo de 82,54% de açúcares e 11,31% de proteína em base seca. Além disso, um alto teor de ácido urônico de 3,90% foi constatado, mostrando sua natureza aniônica

e aumentando assim sua solubilidade. Este EPS teve uma massa molar média de  $1,646 \times 10^6$  Da e a dispersão da massa molar de 4,582. A viscosidade aparente foi de 570 mPa s a uma taxa de cisalhamento de  $38 \text{ s}^{-1}$  e depois de aplicado o modelo Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) se confirmou um comportamento pseudoplástico.

Cepas mutantes e isolados de *R. tropici* Semia 480 foram estudadas, sendo que os maiores valores de produção de EPS foram de  $5,06 \text{ g L}^{-1}$  (isolado JAB6) e de  $5,52 \text{ g L}^{-1}$  (mutante MUTZC3) e a produção de biomassa celular foi de  $0,78 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,75 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. A caracterização quanto à composição de açúcares indicou que continham majoritariamente glicose e galactose com pequenas quantidades de manose, ramnose, ácidos glicurônico e galacturônico. Os biopolímeros deste estudo também apresentaram comportamento não newtoniano em taxas de cisalhamento de 0,1 a  $100 \text{ s}^{-1}$  e considerados também como pseudoplásticos, levando aos autores concluir que ambos têm potenciais aplicações industriais (CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014).

Com esta base de estudos fica demonstrado o interesse por descobrir rizóbios com potencialidades de produção de EPS que possam ser cultivados e produzidos a níveis além do laboratorial e assim entrar no mercado dos biopolímeros como outra opção que garanta não somente produções estáveis como também características de alta qualidade.

### 3.3 FATORES ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO DE EPS

#### 3.3.1 Composição do meio de cultivo

Parte dos esforços para avaliar a produção e possível uso industrial dos EPS rizobianos foca na composição dos meios e nas condições desses cultivos bacterianos em concordância com as possibilidades genéticas da bactéria utilizada, tentando obter maiores quantidades e as melhores características funcionais possíveis.

A fonte de carbono é determinante nestes cultivos. Por exemplo, Kumar, Mody e Jha (2007) indicam que o tamanho, o rendimento de produção e a composição de açúcares do EPS poderiam variar com respeito à fonte de carbono, porém dependendo também do tipo de micro-organismo cultivado. De acordo com estes mesmos autores, alguns dos açúcares utilizados como fonte de carbono são sacarose, glicose, lactose, maltose e sorbitol, sendo a glicose e a sacarose as fontes mais utilizadas para produção de EPS microbianos (FREITAS; TORRES; REIS, 2017).

Além desses açúcares, podem ser usados como alternativas de menor custo subprodutos industriais, tendo sido desenvolvidos alguns estudos, como produção de EPS por *R. tropici* Semia 4080 e MUTZC3 usando substrato com hidrocarbonetos (óleo diesel) (CASTELLANE et al., 2017), produção e caracterização do EPS produzido por *M. loti* Semia 816 em meio com glicerol residual no meio de cultivo (OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018) e estudo das propriedades reológicas do EPS obtido de *R. radiobacter* S10 cultivado em soro de leite reconstituído (ZHOU et al., 2014).

Com respeito à disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo, Vargas et al. (2001) indicam que geralmente concentrações mais altas favorecem o crescimento celular, enquanto que para maior produção de EPS menores concentrações tendem a ser mais favoráveis, concordando também com Freitas, Torres e Reis (2017), que indicam que a presença de nitrogênio extra favorece o crescimento celular e ao mesmo tempo, em muitos casos, resulta em baixa produção de EPS. Algumas das fontes de nitrogênio mais utilizadas segundo Kumar, Mody e Jha (2007) são sulfato de amônio, peptona, nitrato de sódio, ureia e extrato de levedura.

Um aspecto de indispensável conhecimento é a razão C/N do meio a ser utilizado, já que é relatado que a disponibilidade de carbono acompanhada de limitação de nitrogênio é favorável para a produção de EPS por micro-organismos (FREITAS; ALVES; REIS, 2011), isso porque provavelmente ao apresentar essa limitação, a quantidade extra de carbono será destinada à produção do biopolímero (FREITAS; TORRES; REIS, 2017).

Além do carbono e do nitrogênio, outros elementos como fósforo, potássio e cátions metálicos também são necessários, tanto para o crescimento microbiano, quanto para a síntese de EPS (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Sendo assim, o fósforo tem participação relevante no metabolismo secundário, regula a absorção de lipídeos e carboidratos pelas células; sais de potássio ou magnésio atuam como cofatores enzimáticos, requeridos no metabolismo de carboidratos e em processos de transporte (SURVASE; SAUDAGAR; SINGHAL, 2007).

### **3.3.2 Fatores ambientais na produção de EPS**

As condições nutricionais e ambientais têm um impacto direto sobre o rendimento e as características (massa molar, grupamentos associados, grau de ramificação, entre outros) do EPS a ser sintetizado. Sendo assim, ao manipular estas condições se poderia obter aumentos na produção destes biopolímeros (KUMAR; MODY; JHA, 2007).

As mudanças ambientais são capazes de afetar a atividade enzimática, síntese proteica, morfologia celular, entre outros aspectos dos micro-organismos; pelo que, para

processos de síntese de EPS, deve-se assegurar padronização e monitoramento dos parâmetros de cultivo, tais como pH, temperatura, tempo, concentração de oxigênio dissolvido e velocidade de agitação (FREITAS; TORRES; REIS, 2017).

A taxa de agitação, e conseqüente aeração, tendo como resultado a mistura constante dos componentes do meio, constituem parâmetros fundamentais na produção de EPS, sendo relatado que as condições aeróbicas propiciam essa produção e se faz necessário levar em conta as dimensões do equipamento ou frasco versus o volume de meio de cultivo a ser contido, assim como a velocidade de agitação (LIU et al., 2017).

Relacionado a esses parâmetros de mistura e aeração do meio, Freitas, Torres e Reis (2017) explicam que estas podem determinar a disponibilidade de nutrientes e oxigênio e, conseqüentemente, a síntese e características do produto final. Além disso, é fundamental alcançar um equilíbrio nas taxas porque, segundo os mesmos autores, se as taxas de agitação forem muito altas, podem causar danos às células ou alterar as propriedades físico-químicas dos polímeros sintetizados, enquanto que pouca agitação pode não proporcionar uma mistura adequada e, assim, comprometer a transferência de massa, nutrientes e oxigênio.

O pH dos meios de cultivo é um parâmetro que pode garantir sucesso no processo de síntese de EPS porque pode afetar a membrana celular, a morfologia e a estrutura das células, a absorção de nutrientes e assim a biossíntese de EPS (KIM et al., 2005). Liu et al. (2017) afirmam que um pH inicial neutro ou ligeiramente ácido favorece a produção de EPS.

Outro dos fatores fundamentais tanto para o crescimento celular quanto para a produção de EPS é a temperatura de incubação e o tempo de cultivo. Liu et al. (2017) explicam que a temperatura interfere na atividade dos complexos enzimáticos presentes, gerando indução ou inibição da biossíntese do biopolímero. Segundo os mesmos autores a temperatura ideal de incubação pode variar de 24 a 30 °C, dependendo da bactéria em estudo, sendo que normalmente os rizóbios são cultivados em temperaturas de  $30 \pm 1$  °C (Tabela 2).

Relacionado ao tempo de cultivo, este pode variar conforme o tipo de micro-organismo, mas o tempo normal para bactérias é de 60 a 72 h, porém existem estudos que variam este tempo, chegando até 96 h e 144 h, por exemplo (Tabela 2). Alguns dados relevantes dos cultivos de rizóbios para produção de EPS são apresentados na Tabela 2, sendo destacável que nos estudos desenvolvidos foram experimentados açúcares assim como coprodutos industriais com fontes de carbono alternativas, gerando alguns dados promissores de produção de EPS quando foram cultivados nestas fontes. No caso da fonte de nitrogênio, pode ser constatado que a mais utilizada é o extrato de levedura.

**Tabela 2-** Condições de cultivo na produção de EPS por rizóbios

Micro-organismo	Fonte carbono	Fonte nitrogênio	pH	T (°C)	Agitação (rpm)	Tempo de cultivo (h)	EPS (g L <sup>-1</sup> )	Referência
<i>Rhizobium</i> sp.	Manitol	Extrato de levedura	7,0	32	100	72	2,1	PRIYANKA et al. (2015)
<i>Mesorhizobium loti</i> Semia 816	Glicerol residual	Extrato de levedura	7,0	30	200	96	4,91	OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT (2018)
<i>Rhizobium tropici</i> Semia 480 <i>Rhizobium tropici</i> MUTZC3	Sacarose	Extrato de levedura	6,9	30	150	96	4,51	CASTELLANE et al. (2017)
<i>Rhizobium radiobacter</i> CAS	Glicose	Nitrato de amônio	NA	30	NA	96	4,39 2,3	ANDHARE et al. (2017)
<i>Mesorhizobium loti</i> Semia 816	Permeado de soro	Extrato de levedura AMM	7,0	30	200	96	8,21 0,91	TRINDADE (2018)
<i>Rhizobium tropici</i> LBMP-C01 <i>Rhizobium</i> sp. LBMP-C04 <i>Ensifer</i> sp. LBMP-C03 <i>Ensifer meliloti</i> LBMP-C02	Sacarose	NA	6,8	28	150	144	3,48 6,63 2,86	MORETTO et al. (2015)
<i>Rhizobium radiobacter</i> S10	SQ (10%)	NA	NA	30	200	96	2,75 2,83	ZHOU et al. (2014)
<i>Mesorhizobium huakuii</i> Semia 4779	Glicerol residual	Extrato de levedura	7,0	30	200	96	1,75	RIBEIRO (2015)

NA: não apresentado; AMM: Água de maceração de milho; SQ: soro de queijo

### 3.4 FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO ALTERNATIVAS

Na produção de EPS bacterianos, as fontes de carbono mais utilizadas são glicose e sacarose (FREITAS; TORRES; REIS, 2017), mas também têm sido utilizadas como fontes de carbono amido, frutose, galactose, lactose e maltose (LIU et al., 2017), porém existe interesse em fontes de carbono alternativas para redução de custos (FREITAS; TORRES; REIS, 2017) devido a que aproximadamente 30% destes estarem relacionados ao meio de cultivo (FREITAS; ALVES; REIS, 2011). Nesse contexto, existem pesquisas feitas com o objetivo de aproveitar subprodutos industriais como substrato para a síntese de produtos biotecnológicos, ricos em carboidratos ou proteínas, que descartados no ambiente representariam um grave problema ambiental (JIN et al., 2003) e a utilização destes poderia diminuir custos de tratamentos de resíduos.

#### 3.4.1 Permeado de soro

O soro de queijo é o líquido produzido durante a fabricação do queijo ou processo de coagulação da caseína do leite (YADAV et al., 2015), representa 80-90% do volume de leite transformado e é composto principalmente de água (94%), lactose (5%), proteínas e sais (RAPIN et al., 1994), considerando-se essas proteínas de alta qualidade (NORTON; LACROIX; VUILLEMARD, 1994). Devido ao fato de que é produzido em grande quantidade - segundo MilkPoint (2016) no Brasil são produzidos 9 bilhões de litros anuais com 6% de sólidos - ser altamente poluente e com um importante valor nutricional, têm sido desenvolvidos processos para o aproveitamento industrial, como por exemplo obtenção de isolados proteicos de soro.

O permeado de soro é o resultado da remoção das proteínas e outros sólidos lácteos do soro mediante técnicas físicas de separação como filtração e diafiltração, constituindo um coproduto com alta concentração de lactose (AMERICAN DAIRY PRODUCTS INSTITUTE, 2014), cinzas e nitrogênio solúvel (FITZPATRICK; AHRENS; SMITH, 2001). O American Dairy Products Institute (ADPI) (2014) detalha a composição do permeado de soro: proteína 2-7% (máximo 7%), lactose 76-85% (mínimo de 76%), gordura 0-1,0% (máximo 1,5%), cinzas 8-11% (máximo 14%) e umidade 3-4,5% (máximo 5%). Além disso, MilkPoint (2016) indica que contém outros nutrientes como sódio, fósforo e potássio.

O permeado de soro tem um custo no mercado aproximado de R\$ 2,2/kg (MILKPOINT, 2016) e é utilizado na indústria como substituto de outros sólidos lácteos em

alimentos e como fonte de lactose e minerais no desenvolvimento de produtos nutricionais (AMERICAN DAIRY PRODUCTS INSTITUTE, 2014).

Este coproduto industrial, ao apresentar nutrientes para micro-organismos como lactose (como fonte de carbono) e proteínas, assim como baixo custo, pode representar uma alternativa de uso em processos biotecnológicos, aportando valor nutricional aos meios e potencializando o uso. Existem estudos que utilizaram o permeado de soro em meios de cultivo para produzir diferentes produtos de interesse como ácido lático (WILLEM; THIBAUT; LACROIX, 2006), também na maximização do crescimento de biomassa celular de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulevardii* (TRIGUEROS et al., 2016), crescimento de *Lactobacillus rhamnosus* 64 (LAVARI et al., 2015), produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* (GABARDO et al., 2014), produção de diacetil por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (GUTIERREZ; DEBARR; MADDOX, 1996) e produção de EPS por *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M (MACEDO et al., 2002).

### 3.4.2 Colostro

O colostro bovino é o primeiro alimento que o bezerro recebe, secretado durante os primeiros dias após o parto, contendo proteínas, carboidratos (lactose), gorduras, vitaminas e minerais, moléculas biologicamente ativas, como fatores de crescimento e antimicrobianos, que são de grande importância durante essa primeira fase de vida (PAKKANEN; AALTO, 1997).

Atualmente o colostro pode ser processado a colostro em pó para diferentes usos, desde alimentação animal até humana. De acordo com o American Dairy Products Institute (2014), o pó de colostro é obtido da secagem de colostro que vem de vacas nas primeiras 48 h após o parto, apresentando em média a seguinte composição: 50,5% proteína, 17,5% carboidratos, 22,0% gordura, 6,0% cinzas e 4,5% de umidade. Além disso, segundo o mesmo instituto, apresenta um pH em solução 10% a 20 °C de 6,0-7,0 e um conteúdo de imunoglobulinas entre 12,5%-25%.

Atualmente o colostro nos Estados Unidos é processado para obter pó, sendo possível achar oferta tanto para a alimentação de bezerros quanto para usá-lo como ingrediente em suplementos dietéticos, nutrição esportiva, cápsulas, comprimidos e outros produtos relacionados com consumo humano e animal. Este tipo de processamento e aproveitamento é interessante devido ao colostro não ser consumido por completo pelo bezerro, gerando excedentes. Segundo Saalfeld (2017), durante os cinco primeiros dias de produção da vaca, em promédio, é gerado um excedente de 50 L, sendo estimado que anualmente no Brasil são

descartados aproximadamente dois bilhões de litros de colostro, gerando assim o risco de impacto negativo ao meio ambiente e aos produtores.

Nesse contexto nascem iniciativas de ser aproveitado na dieta humana (SAALFELD, 2017) e, conhecendo seu valor nutricional, surge a hipótese de que seja um componente efetivo ao ser utilizado em meios de cultivo para estudos biotecnológicos, aproveitando-o e agregando valor. Atualmente não é encontrado na literatura estudos do colostros em aplicações biotecnológicas, especificamente o uso em cultivos microbianos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades experimentais foram realizadas principalmente no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química de Alimentos (EQA) da Universidade Federal do Rio Grande, assim como em outras unidades da Universidade.

### 4.1 MICRO-ORGANISMOS

Os rizóbios utilizados para o estudo foram *Mesorhizobium* sp. Semia 816, *Rhizobium galegae* Semia 6448 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454. Estas bactérias foram disponibilizadas pela Coleção Semia de Rizóbios do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAP) do Governo do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

### 4.2 COPRODUTOS LÁCTEOS

O permeado de soro de origem bovina, em pó, foi cedido por Arla Foods - Ingredients (Viby, Dinamarca), com uma quantidade mínima de lactose mono-hidratada de 85% (Anexo A).

O colostro utilizado de origem bovina, em pó, foi obtido da empresa Alta Genetics do Brasil LTA (Minas Gerais, Brasil), com um conteúdo mínimo de lactose de 23,5 g (5%) reportada pela empresa (Anexo B).

#### 4.2.1 Análise elementar dos coprodutos lácteos e extrato de levedura

Os teores de C e N do permeado de soro, do colostro e do extrato de levedura foram obtidos por um Espectrômetro de Massa de Razões Isotópicas (Delta V Advantage) acoplado a um analisador elementar para IRMS (Flash EA 2000), ambos da Thermo Fisher Scientific (Bremen, Alemanha), sendo determinados no Laboratório de Pesquisa em Biotransformações de C e N (LABCEN) da Universidade Federal de Santa Maria.

#### 4.2.2 Proteína total

O conteúdo de proteína total dos coprodutos lácteos foi determinado através do método de Kjeldahl, segundo AOAC (2000). O conteúdo de proteínas foi calculado multiplicando pelo fator 6,25.

#### 4.2.3 Lipídeos

A determinação do conteúdo de lipídeos dos coprodutos lácteos foi realizada através do método Soxhlet da AOAC (1995).

#### 4.2.4 Cinzas

O teor de cinzas dos coprodutos lácteos foi determinado por incineração em mufla de acordo com AOAC (2000).

#### 4.2.5 Umidade

A umidade dos coprodutos lácteos foi obtida por gravimetria de acordo com AOAC (2000).

### 4.3 CULTIVOS PARA PRODUÇÃO DE EPS

#### 4.3.1 Ativação das bactérias

As bactérias foram reativadas utilizando tubos inclinados com meio *Yeast Manitol Agar* (YMA), mantidas a uma temperatura controlada de 30 °C durante 48 h. O meio apresentou a seguinte composição (g L<sup>-1</sup>): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1), NaCl (0,1), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4), extrato de levedura (0,4) manitol (10) e ágar (15) (DUTA et al., 2004).

#### 4.3.2 Preparo do inóculo

Depois da reativação, a massa microbiana contida no tubo com ágar inclinado foi raspada com 10 mL de água peptonada estéril 0,1% (m v<sup>-1</sup>) e transferida para um frasco

Erlenmeyer de 500 mL com 90 mL de meio YMA sem adição de ágar com pH de  $7,0 \pm 0,2$ . O inóculo foi mantido em uma incubadora rotatória (Tecnal TE - 420, Brasil) a uma temperatura controlada de 30 °C e 200 rpm. Para a determinação da densidade ótica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro (*Bioespectro* SP-220, China), foram tomadas amostras do inóculo a cada 2 h nas primeiras 8 h, depois as 24, 30 e 48 h de cultivo.

Para garantir uma padronização do inóculo com células na fase exponencial do crescimento, foi definido um valor de DO de 0,8, sendo que a mesma foi atingida em um determinado tempo para cada bactéria (Apêndice A).

### 4.3.3 Meios de cultivo

Os cultivos das bactérias foram realizados em três diferentes meios de cultivo. O meio YMA, considerado como o meio padrão, com razão C/N de 96,5 com a seguinte composição ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,1), NaCl (0,1),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,12),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,15),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,4), extrato de levedura (0,4) e manitol (10). A composição desse meio é descrita por Duta et al. (2006), com adição de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em substituição ao carbonato de cálcio, conforme sugerido por Staudt, Wolfe e ShROUT (2012).

O segundo meio de cultivo (P) teve como fonte de carbono o permeado de soro e a sua composição foi baseada no meio YMA, porém com razão C/N de 20 conforme estudo de Trindade (2018) com a bactéria *M. loti* Semia 816 cultivada em meio à base de permeado de soro. A composição do meio foi a seguinte ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,1), NaCl (0,1),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,12),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,15),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,4), extrato de levedura (1,74) e permeado de soro (10).

No caso do meio com colostro (PC) na formulação, este coproduto foi utilizado substituindo o extrato de levedura em um meio também com razão C/N de 20 e com permeado de soro como principal fonte de carbono. A composição do meio foi a seguinte ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,1), NaCl (0,1),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,12),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,15),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,4), colostro (2,28) e permeado de soro (10).

### 4.3.4 Cultivos em frascos agitados

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio. Primeiramente, foram inoculados com 10 mL ( $10\% \text{ v v}^{-1}$ ) de suspensão da bactéria

em estudo, depois os frascos foram incubados à temperatura controlada de 30 °C e 200 rpm de agitação em incubadora rotatória (Tecnal TE-420, Brasil) durante 96 h (DUTA et al., 2004).

Durante o tempo de cultivo foram retiradas amostras a cada 2 h durante as primeiras 8 h, depois as 24, 48, 72 e 96 h de cultivo, com a finalidade de realizar determinações analíticas. As amostras retiradas foram centrifugadas (centrífuga *Eppendorf* 5804-R, Alemanha) a 13.000  $\times$  g por 15 min para separar o sedimento do sobrenadante. O sobrenadante foi utilizado para determinar o pH (item 4.4.2). O sedimento foi lavado com água destilada e centrifugado novamente a 13.000  $\times$  g por 15 min para determinar a biomassa (item 4.4.1). A recuperação do EPS foi realizada ao final das 96 h de cultivo (item 4.4.3).

#### 4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS NOS CULTIVOS

##### 4.4.1 Biomassa

A biomassa foi determinada em espectrofotômetro visível (*Bioespectro* SP-22, China) a 600 nm. A leitura de absorbância foi convertida em massa seca ( $\text{g L}^{-1}$ ) a partir de uma curva de calibração previamente feita para cada micro-organismo (Apêndice B) (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012).

##### 4.4.2 pH

O pH do sobrenadante foi medido de acordo com AOAC (2000) em um medidor de pH (Marte MB-10, Brasil).

##### 4.4.3 Quantificação e recuperação dos EPS

A recuperação do EPS obtido no final do cultivo foi realizada por centrifugação (*Eppendorf* 5804-R, Alemanha) a 13.000  $\times$  g por 30 min a 4°C para separação da biomassa microbiana do sobrenadante. Posteriormente, foi feita uma precipitação do EPS pela adição de álcool etílico 96% (1:3  $\text{v v}^{-1}$ ) no sobrenadante, ficando em repouso por 24 h a 5 °C, sendo novamente centrifugada a 13.000  $\times$  g a 4 °C por 15 min.

A concentração de EPS foi determinada por gravimetria, sendo que depois da última centrifugação foi recuperado e seco em estufa a 50 °C até massa constante. Nos casos de caracterização do EPS, depois da última centrifugação, foi recuperado e solubilizado em água

Milli-Q e dialisado em sacos de diálise com limite de exclusão molecular de 12.000 Da por 72 h a 5 °C, sendo a água trocada duas vezes a cada 24 h, para eliminação de moléculas de menor massa molar. Após a diálise, o EPS foi congelado em *ultrafreezer* (Indrel, IULT 90-D, Brasil) a -80 °C e liofilizado (Liotop L108, Brasil) a -80 °C durante 48 h, para posteriormente ser conservado congelado.

## 4.5 PARÂMETROS CINÉTICOS

### 4.5.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular

A partir das curvas de crescimento celular foi obtida a velocidade específica máxima de crescimento celular (HISS, 2001). A velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), em  $h^{-1}$ , foi definida pela Equação 1, calculada através do *software* Excel (*Microsoft Inc*, EUA).

$$\mu_{m\acute{a}x} = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

### 4.5.2 Produtividade

A produtividade em EPS,  $g L^{-1} h^{-1}$  foi definida pela Equação 2.

$$\text{Produtividade} = \frac{EPS_{m\acute{a}x} - EPS_0}{t_f} \quad (2)$$

Onde:

$EPS_{m\acute{a}x}$  = Concentração de EPS ( $g L^{-1}$ ) atingida no  $t_f$

$EPS_0$  = Concentração de EPS inicial ( $g L^{-1}$ )

$t_f$  = tempo (h) de cultivo

### 4.5.3 Fator de conversão biomassa em produto

O fator de conversão de biomassa em produto ( $Y_{P/X}$ ) foi calculado de acordo com a Equação 3 (HISS, 2001):

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (3)$$

Onde:

X: Concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao final do cultivo;

$X_0$ : Concentração de biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) inicial;

P: Concentração de EPS ( $\text{g L}^{-1}$ ) ao final do cultivo;

$P_0$ : Concentração de EPS ( $\text{g L}^{-1}$ ) inicial;

## 4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS EPS

Primeiramente todos os EPS provenientes das bactérias estudadas foram caracterizados em termos do comportamento reológico e viscosidade (item 4.6.1) como um dos critérios de seleção para realizar os outros estudos de caracterização: comportamento da viscosidade em presença de sais (item 4.6.2), massa molar (item 4.6.3), análises térmicas TGA e DSC (item 4.6.4), FT-IR (item 4.6.5) e potencial zeta (item 4.6.6).

### 4.6.1 Propriedades reológicas de soluções de EPS

Para solubilizar as amostras na determinação da viscosidade, foi adotado o procedimento descrito por Xuewu et al. (1996) com adaptações feitas por Oliveira (2017). Os EPS foram diluídos na concentração de 1%  $\text{m v}^{-1}$ , em água destilada, agitando em vórtex por 5 min e posteriormente as amostras foram mantidas a uma temperatura constante de 60° C por 40 min. Depois foram mantidas à temperatura de 25 °C por 24 h.

As amostras solubilizadas de EPS foram analisadas em reômetro digital rotacional *cone/Plate* DV- III Ultra (*Brookfield cone / plate version*, EUA), acoplado a um banho-maria a 25 °C, com *spindle* CP51. A viscosidade aparente (mPa s) foi determinada a cada 15 s em uma taxa de cisalhamento de 1 a 104  $\text{s}^{-1}$  e a análise foi realizada em triplicata.

Para determinar o comportamento reológico das amostras, foi aplicado o modelo matemático de Ostwald-de-Waele (Lei da Potência) (ARANDA-SELVERIO et al., 2009; HAMINIUK et al., 2006), o qual relaciona a taxa de deformação e a tensão de cisalhamento. Para a determinação do comportamento pseudoplástico das soluções, foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald-de-Waele (Equação 4) aos dados experimentais, a partir de uma regressão linear. Foram determinados os valores de K (índice de consistência) e n (índice do comportamento do fluxo), para confirmar o ajuste dos dados experimentais ao modelo.

$$\tau = K\gamma^n \quad (4)$$

Onde:

$\tau$  = tensão de cisalhamento (mPa)

$\gamma$  = taxa de deformação ( $s^{-1}$ )

$K$  = índice de consistência (mPa  $s^n$ )

$n$  = índice do comportamento do fluxo (adimensional)

#### 4.6.2 Viscosidade de soluções de EPS em presença de sais

As amostras de EPS foram solubilizadas em (1%  $m v^{-1}$ ) em soluções salinas de NaCl e KCl em concentrações de 0,1 mol  $L^{-1}$  e 1 mol  $L^{-1}$  e foi aplicado o mesmo procedimento descrito no item 4.6.1 para a determinação da viscosidade. As determinações foram realizadas em triplicata.

#### 4.6.3 Massa molar

A massa molar foi obtida por cromatografia de permeação em gel (*Viscotek GPCmaxTM*, modelo VE2001, EUA) acoplada a um detector triplo TDA 3580 e equipada com duas colunas 2SB-807 HQ e duas colunas 2SB-806M HQ. As amostras de EPS foram solubilizadas em  $NaNO_3$  0,1 mol  $L^{-1}$  na concentração de 5 mg  $mL^{-1}$ , filtradas em filtro Whatman® (tamanho de poro 0,45  $\mu m$ ) e injetadas (100  $\mu L$ ). A coluna foi eluída com solução de  $NaNO_3$  0,1 mol  $L^{-1}$  com fluxo de 0,5  $mL min^{-1}$  a 35 °C. Uma curva padrão foi preparada para determinar a massa molar média ponderal ( $M_w$ ), massa molar média aritmética ( $M_n$ ), massa molar média em tamanho ( $M_z$ ), massa molar máxima ( $M_p$ ) e a dispersão da massa molar ( $M_w / M_n$ ). As análises de dados foram realizadas utilizando o *software* OmniSEC 4.6.0.

#### 4.6.4 Análises térmicas

A análise de termogravimetria (TGA) foi realizada por um analisador termogravimétrico (TGA-60, Shimadzu, Japão) em atmosfera de nitrogênio e vazão de 30  $mL min^{-1}$ , aumentando a temperatura até 500 °C a 10 °C  $min^{-1}$  com amostras de 2-6 mg. Na análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), o comportamento das curvas dos EPS foi obtido em um calorímetro diferencial de varredura (DSC-60, Shimadzu, Japão), sob atmosfera

dinâmica de nitrogênio e vazão de 50 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura inicial foi de 50 °C, subindo para 250 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>, sendo que a quantidade de amostra utilizada foi de 3-5 mg.

#### 4.6.5 Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)

A identificação dos grupos funcionais apresentados pelos EPS em estudo foi realizada utilizando um espectrômetro de infravermelho (*Shimadzu IR Prestige-21*, Japão). As amostras de EPS foram analisadas sob a forma de pastilhas de KBr (200 mg de KBr e 2 mg de EPS). O espectro foi feito em temperatura ambiente, com 70 *scans* e resolução de 2,0 cm<sup>-1</sup> na faixa de 145-4000 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.6.6 Potencial Zeta

Para o estudo do potencial zeta, foi preparada uma solução de 2 g L<sup>-1</sup> de EPS em água Milli-Q (NIKNEZHAD et al., 2018) e foi utilizado um *Zetasizer S90* (*Malvern Instruments*, Reino Unido) a 25 °C, sendo calculado a partir de mobilidade eletroforética por meio da equação de Helmholtz-Smoluchowski (DESHIIKAN; PAPADOPOULOS, 1998). As determinações foram feitas em triplicata e foi utilizado o *software Zetasizer 7.03* incluído no sistema.

### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cultivos foram realizados em triplicata e os dados obtidos tratados por análise de variância considerando 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) e por *teste T Student* a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ). Foram verificados os pressupostos de normalidade dos resíduos, homogeneidade das variâncias e a independência dos resíduos dos dados.

Como prova *post-hoc* foi usado o teste de *Tukey* a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ) a fim de verificar a existência de diferenças significativas nos dados analisados. O programa utilizado para as análises estatísticas e construção de gráficos foi R 3.4.4. (R *Foundation for Statistical Computing*, Austria).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS COPRODUTOS LÁCTEOS E EXTRATO DE LEVEDURA

O permeado de soro, o colostro e o extrato de levedura foram analisados quanto à sua composição de carbono e nitrogênio a fim de formular os meios de cultivo com a razão C/N proposta (20), levando em conta o aporte destes elementos que são indispensáveis no crescimento dos rizóbios e na consequente produção de EPS, podendo variar de um lote para outro.

Na Tabela 3 são apresentados os valores percentuais para cada elemento, sendo importante ressaltar que o colostro e o extrato de levedura aportam importantes e similares quantidades de nitrogênio, porém o colostro contém aproximadamente 6% a mais de carbono. O permeado de soro contribui majoritariamente como fonte de carbono.

**Tabela 3** - Análise elementar dos coprodutos lácteos e extrato de levedura

<b>Amostra</b>	<b>Nitrogênio (%)</b>	<b>Carbono (%)</b>
Colostro	9,00	46,74
Extrato de levedura	10,66	39,12
Permeado de soro	0,34	37,13

Trindade (2018) avaliou o conteúdo percentual destes elementos em amostras de permeado de soro, encontrando valores similares de carbono (37,76%) e nitrogênio (0,23%). Para o extrato de levedura, Ribeiro (2015) reportou 39,66% de carbono e 12,06% de nitrogênio, enquanto Macedo et al. (2002) empregaram com um extrato de levedura com 10,9% de nitrogênio. Para o colostro em pó não é apresentado na literatura valores percentuais destes elementos em estudo.

A composição dos macronutrientes dos coprodutos foi analisada a fim de caracterizar estes materiais, como mostra a Tabela 4, apresentando algumas similaridades com os teores relatados pelo American Dairy Products Institute (2014). Porém, são apresentadas algumas diferenças: no caso do colostro apresentou maiores valores de umidade e lipídeos e menores teores de carboidratos, quando comparado aos valores de referência dados pelo ADPI, mas os valores de lipídeos e carboidratos concordam com o reportado pelo fabricante (Anexo B); no caso do permeado de soro, este apresentou menor valor de cinzas que os de referência.

**Tabela 4** – Composição centesimal dos coprodutos lácteos (média  $\pm$  desvio padrão) e valores de referência

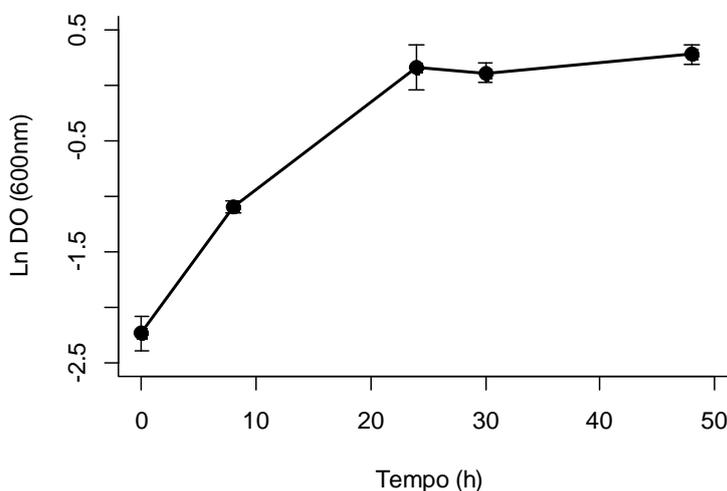
Amostra	Proteína (%)	Umidade (%)	Carboidratos* (%)	Lipídeos (%)	Cinzas (%)
Colostro	50,70 $\pm$ 2,52	6,14 $\pm$ 0,05	25,01 $\pm$ 1,42	12,24 $\pm$ 1,11	6,29 $\pm$ 0,03
VR ADPI	50,5	4,5-5	17,5	22,0	6,0
Permeado de soro	2,58 $\pm$ 0,56	5,22 $\pm$ 0,29	85,47 $\pm$ 0,99	0,64 $\pm$ 0,28	6,41 $<$ 0,01
VR ADPI	2,0-7,0	4,5-5	76,0-85,0	0-1,0	8,0-11,0

\*Os valores dos carboidratos foram obtidos por diferença. VR ADPI: Valor referenciado pelo ADPI.

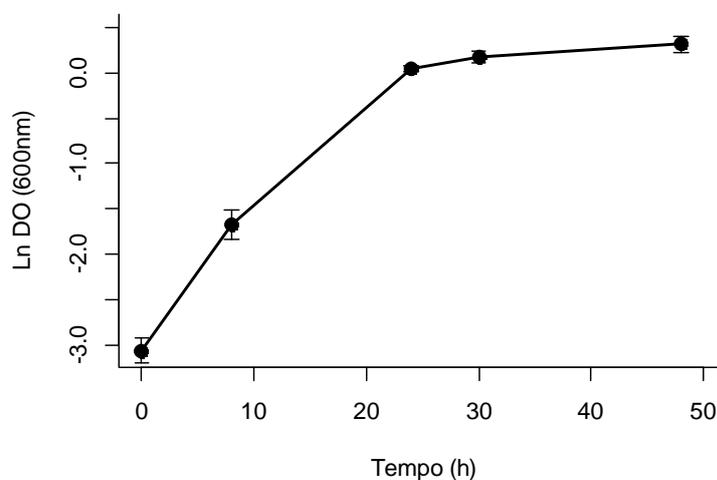
## 5.2 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Para o realizar o inóculo para cada bactéria, foi feito um acompanhamento deste crescimento, expressado em densidade óptica (DO) a 600 nm, sendo escolhido para inoculação o valor de 0,8 (correspondendo a Ln DO de aproximadamente -0,21) conforme utilizado por Trindade (2018), Ribeiro (2015) e Staudt, Wolfe e ShROUT (2012). Para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *Rhizobium galegae* Semia 6448 foi determinado que em aproximadamente 18 h este valor era atingido como mostram as Figura 4 e Figura 5, sendo um resultado similar ao obtido por Trindade (2018) para a bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816. Para a bactéria *M. huakuii* Semia 6454 foi identificado o valor de DO no tempo de aproximadamente 30 h (Figura 6).

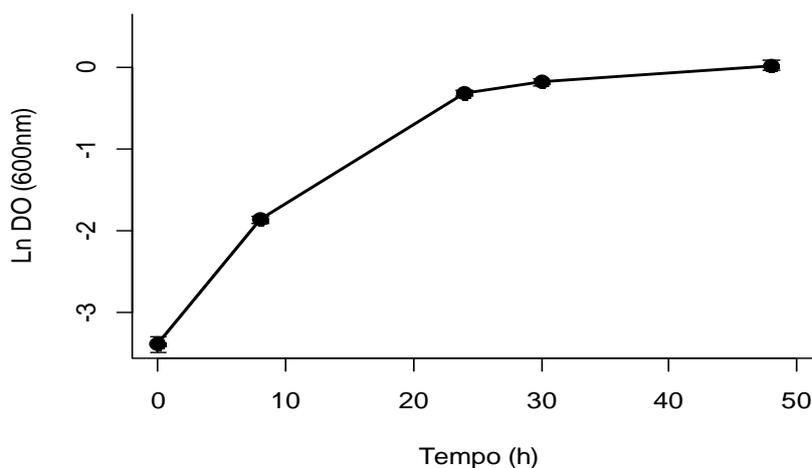
**Figura 4** – Acompanhamento da Ln (DO) para a bactéria *Mesorhizobium* sp. Semia 816



**Figura 5** - Acompanhamento da Ln (DO) para a bactéria *R. galegae* Semia 6448



**Figura 6** - Acompanhamento da Ln (DO) para a bactéria *M. huakuii* Semia 6454

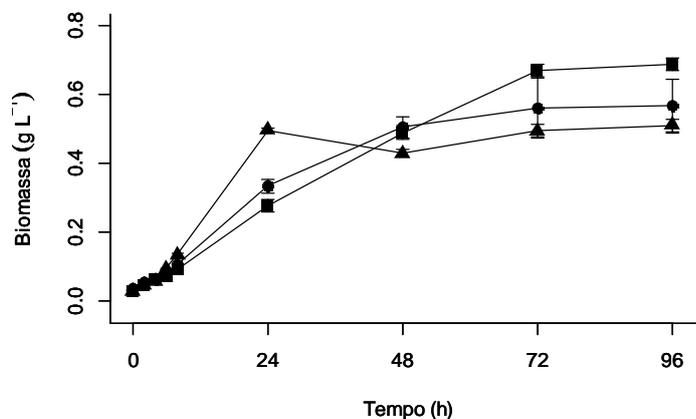


### 5.3 CULTIVOS RIZOBIANOS

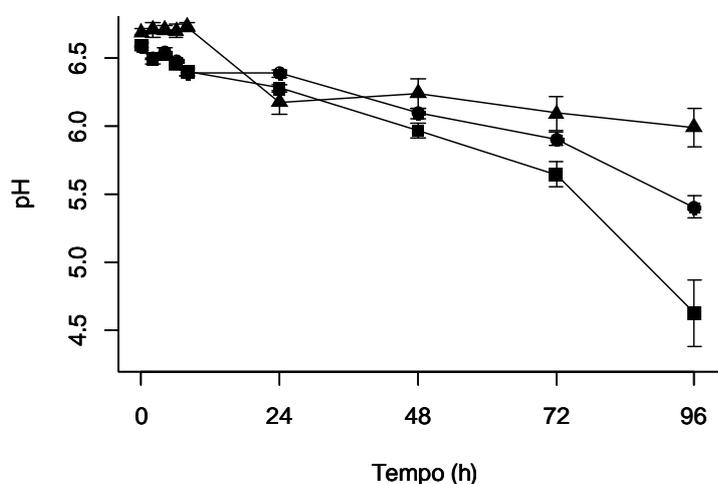
Primeiramente as bactérias em estudo foram cultivadas em meio YMA, que é considerado como um meio padrão à base de manitol para o crescimento e produção de EPS pelos rizóbios, apresentando uma razão C/N de 96,5. Desta forma, buscava-se obter uma referência do comportamento das bactérias em estudo quanto à biomassa, pH e produção de EPS.

Nas Figuras 7 e 8 são apresentados os comportamentos da biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) e do pH ao longo do tempo de cultivo para cada uma das bactérias estudadas.

**Figura 7** – Acompanhamento da biomassa no meio YMA para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (■), *R. galegae* Semia 6448 (▲) e *M. huakuii* Semia 6454 (●)



**Figura 8** – Acompanhamento do pH no meio YMA para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (■), *R. galegae* Semia 6448 (▲) e *M. huakuii* Semia 6454 (●)

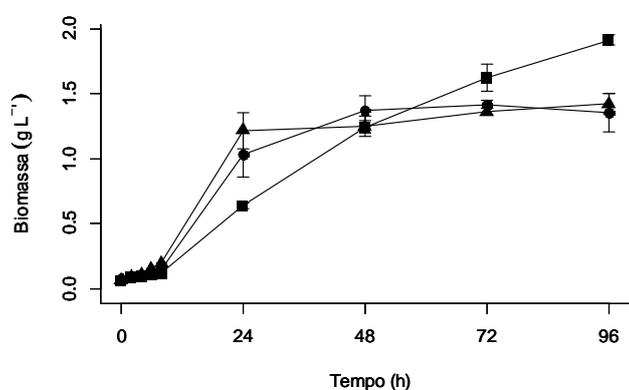


Como apresentado na Figura 7, as três bactérias começaram com comportamentos similares de crescimento, porém depois de aproximadamente 8 h de cultivo os comportamentos se diferenciaram notavelmente. *R. galegae* Semia 6448 apresentou estabilidade no crescimento aproximadamente depois das 24 h, para *Mesorhizobium* sp. Semia 816 essa estabilidade começou em aproximadamente 72 h e para *M. huakuii* Semia 6454 foi a partir de aproximadamente 48 h. Nos cultivos rizobianos realizados com o objetivo de produzir EPS, a duração das fases exponencial e estacionária é de elevada relevância devido a sua relação com o crescimento microbiano, podendo alcançar níveis máximos quando atingir a fase estacionária (LIU et al., 2017).

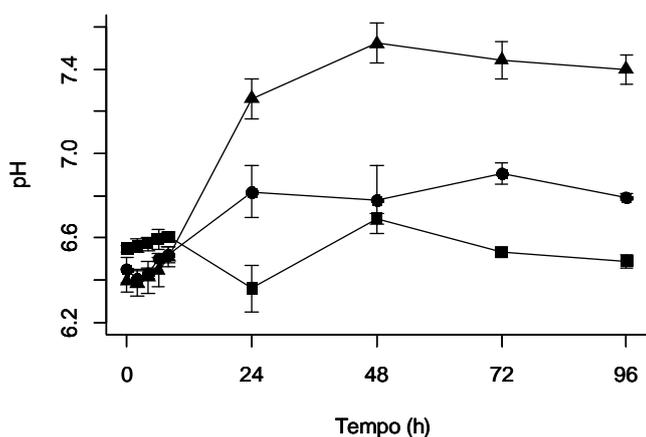
O acompanhamento do pH através do tempo demonstrou quedas para os cultivos das bactérias, começando em pH próxima da neutralidade e reduzindo para  $4,87 \pm 0,22$  no caso de *Mesorhizobium* sp. Semia 816,  $5,40 \pm 0,08$  para *M. huakuii* Semia 6454 e  $5,99 \pm 0,14$  para *R. galegae* Semia 6448. Este comportamento de queda de pH pode estar relacionado com a capacidade metabólica do micro-organismo no meio e condições de cultivo, devido ao fato de que *Mesorhizobium* sp. Semia 816 apresentou a maior quantidade de biomassa e maior queda comparado com *R. galegae* Semia 6448, que apresentou menor biomassa e menor variação do pH. Além disso, poderia existir relação entre a quantidade e composição do EPS e este parâmetro, já que segundo Whitfield (1988) alguns EPS podem ter ácidos na sua estrutura como os ácidos gulurônico ou manurônico.

Continuando com o acompanhamento dos cultivos, nas Figuras 9 e 10 são apresentados os comportamentos da biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ) e do pH ao longo do tempo de cultivo para cada uma das bactérias estudadas no meio P.

**Figura 9** - Acompanhamento da biomassa no meio P para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (■), *R. galegae* Semia 6448 (▲) e *M. huakuii* Semia 6454 (●)



**Figura 10** - Acompanhamento do pH no meio P para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (■), *R. galegae* Semia 6448 (▲) e *M. huakuii* Semia 6454 (●)



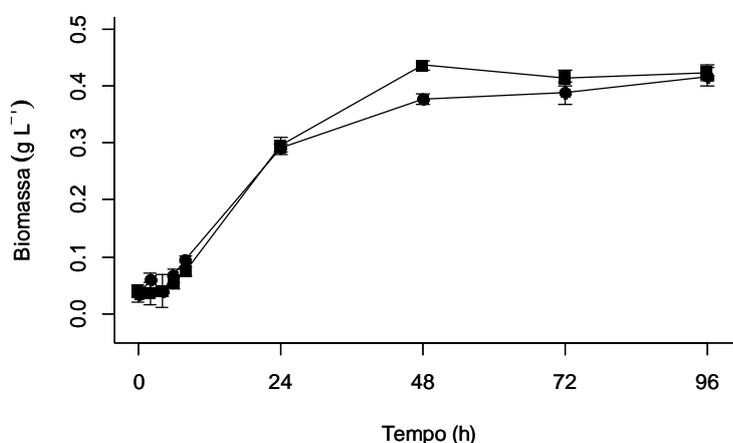
De acordo com a Figura 9, o crescimento mostrou uma estabilidade para a bactéria *R. galegae* Semia 6448 a partir das 24 h, para *M. huakuii* Semia 6454 a partir das 48 h e no caso da *Mesorhizobium* sp. Semia 816 não se observou uma marcada diminuição no crescimento ao longo do tempo de cultivo.

O pH no meio P (Figura 10) começou para as três bactérias entre 6,4 e 6,5 e teve um comportamento evidentemente diferente para *Mesorhizobium* e para *Rhizobium*. As bactérias pertencentes ao gênero *Mesorhizobium* apresentaram algumas variações ao longo do cultivo, tiveram um leve incremento, mas não superaram o valor de 6,9, ficando na faixa recomendada para a produção de EPS encontrada na literatura, tal e como é indicado por Liu et al. (2017), ao afirmar que um pH neutro ou ligeiramente ácido favorece a produção de EPS.

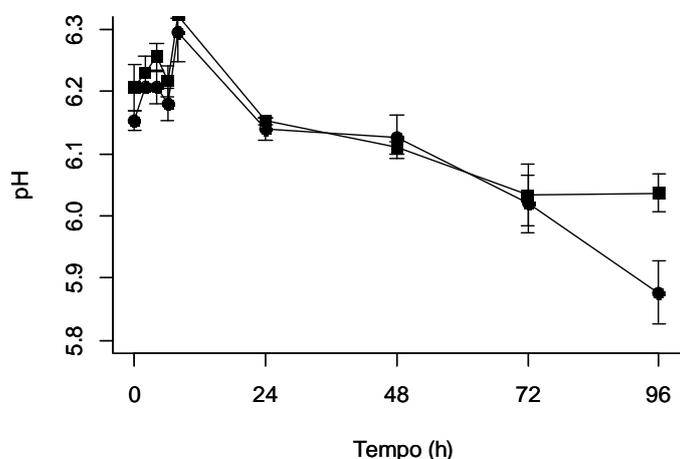
No caso do *Rhizobium*, observou-se um incremento mais notável depois das 8 h até chegar em valores entre 7,4 e 7,5, diferenciando-se assim dos outros rizóbios em estudo. Trindade (2018) obteve um comportamento similar no pH ao cultivar *M. loti* Semia 816 em meio com permeado de soro e razão C/N de 20, ao ficar na faixa de 6,5-7,0 ao longo das 96 h de estudo.

A biomassa e o pH dos cultivos em meio PC são apresentados nas Figuras 11 e 12 para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454. A bactéria *R. galegae* Semia 6448 foi descartada para o cultivo no meio PC devido aos resultados não terem sido satisfatórios quanto à produção de EPS no meio P, como será apresentado posteriormente na Tabela 5 e quanto ao comportamento reológico mostrado no item 5.4.1.

**Figura 11** - Acompanhamento da biomassa no meio PC para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (■) e *M. huakuii* Semia 6454 (●)



**Figura 12** - Acompanhamento do pH no meio PC para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (■) e *M. huakuii* Semia 6454 (●)



O comportamento da biomassa no meio PC foi similar para as duas bactérias, sendo que o crescimento aparentou estabilidade a partir das 48 h de cultivo. Relacionado ao pH, as bactérias começaram com valores perto de 6,1 e 6,2, ambas apresentaram um leve incremento para 6,3 nas 8 h de cultivo e posteriormente foram caindo até valores em torno de 6,0 para o cultivo com *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e para 5,8 com *M. huakuii* Semia 6454.

Ao comparar os comportamentos do pH nos meios P e PC, em aparência, no meio P existe uma tendência dos rizóbios a elevar o pH à neutralidade ou se estabilizar em valores ligeiramente ácidos e no meio PC existe uma tendência de diminuir a valores mais ácidos entre 5,8 e 6,0.

A Tabela 5 apresenta todos os parâmetros avaliados nos cultivos realizados para cada uma das bactérias estudadas, estabelecendo-se comparações destes parâmetros por bactéria e por tipo de meio de cultivo.

Ao realizar uma comparação da biomassa máxima alcançada no final do cultivo entre os meios YMA, P e PC para cada uma das bactérias é possível determinar que apresentaram diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ), ressaltando as maiores quantidades de biomassa para o meio P, seguido do meio YMA e com menores valores no meio PC, pelo que provavelmente o meio P proporcionou melhores condições para o metabolismo dos rizóbios estudados, permitindo maior crescimento. Além disso, a razão C/N (20) favoreceu este comportamento, como é afirmado por Trindade (2018), que estudou diferentes razões C/N e comprovou que quando esta aumenta, e conseqüentemente diminui o nitrogênio, diminui as concentrações de biomassa, sendo observado esta mesma tendência de comportamento no meio YMA.

**Tabela 5** - Parâmetros avaliados nos cultivos das bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816, *M. huakuii* Semia 6454 e *R. galegae* Semia 6448 nos meios YMA, P e PC

Micro-organismo	X <sub>f</sub> (g L <sup>-1</sup> )			μ <sub>máx</sub> (h <sup>-1</sup> )			EPS (g L <sup>-1</sup> )		
	YMA	Meio P	PC	YMA	Meio P	PC	YMA	Meio P	PC
<i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816	0,69 ± 0,02 <sup>a,B</sup>	1,91 ± 0,04 <sup>a,A</sup>	0,42 < 0,01 <sup>a,C</sup>	0,07 < 0,01 <sup>b,B</sup>	0,09 < 0,01 <sup>b,A</sup>	0,09 < 0,01 <sup>a,A</sup>	3,49 ± 0,11 <sup>a,B</sup>	4,86 ± 0,19 <sup>b,A</sup>	1,85 ± 0,08 <sup>a,C</sup>
<i>M. huakuii</i> Semia 6454	0,57 ± 0,08 <sup>a,b,B</sup>	1,35 ± 0,15 <sup>b,A</sup>	0,42 ± 0,02 <sup>a,C</sup>	0,08 < 0,01 <sup>b,B</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>a,A</sup>	0,08 < 0,01 <sup>b,B</sup>	3,69 ± 0,17 <sup>a,B</sup>	6,15 ± 0,29 <sup>a,A</sup>	1,69 ± 0,17 <sup>a,C</sup>
<i>R. galegae</i> Semia 6448	0,51 ± 0,02 <sup>b,B</sup>	1,44 ± 0,07 <sup>b,A</sup>	-	0,19 < 0,01 <sup>a,A</sup>	0,11 < 0,01 <sup>a,B</sup>	-	2,12 ± 0,11 <sup>b,A</sup>	0,79 ± 0,15 <sup>c,B</sup>	-

Micro-organismo	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )			Y <sub>P/X</sub> (g g <sup>-1</sup> )		
	YMA	Meio P	PC	YMA	Meio P	PC
<i>Mesorhizobium</i> . sp Semia 816	0,04 < 0,01 <sup>a,B</sup>	0,05 < 0,01 <sup>b,A</sup>	0,02 < 0,01 <sup>a,C</sup>	5,29 ± 0,11 <sup>a,b,A</sup>	2,63 ± 0,05 <sup>b,B</sup>	4,81 ± 0,33 <sup>a,A</sup>
<i>M. huakuii</i> Semia 6454	0,04 < 0,01 <sup>a,B</sup>	0,06 < 0,01 <sup>a,A</sup>	0,02 < 0,01 <sup>a,C</sup>	7,12 ± 1,40 <sup>a,A</sup>	4,85 ± 0,48 <sup>a,B</sup>	4,42 ± 0,51 <sup>a,B</sup>
<i>R. galegae</i> Semia 6448	0,02 < 0,01 <sup>b,A</sup>	0,01 < 0,01 <sup>c,B</sup>	-	4,40 ± 0,14 <sup>b,A</sup>	0,58 ± 0,09 <sup>c,B</sup>	-

\* Média ± desvio padrão, n = 3. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que existe diferença significativa entre os micro-organismos ( $p \leq 0,05$ ) e letras maiúsculas diferentes na mesma linha de cada parâmetro indicam que existe diferença significativa entre meios ( $p \leq 0,05$ ). X<sub>f</sub> = biomassa ao final das 96 h de cultivo, μ<sub>máx</sub> (h<sup>-1</sup>) = velocidade específica máxima de crescimento, Y<sub>P/X</sub> = fator de conversão biomassa em produto.

No meio P a bactéria que apresentou maior biomassa foi *Mesorhizobium* sp. Semia 816 ( $1,91 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ ) e não houve diferença significativa entre *M. huakuii* Semia 6454 ( $1,35 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ) e *R. galegae* Semia 6448 ( $1,44 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ ), considerando-se com igual crescimento neste mesmo meio. A biomassa no meio PC, além de ser a menor entre os meios, não apresentou diferença significativa entre as duas bactérias cultivadas neste meio, com valores de  $0,42 < 0,01 \text{ g L}^{-1}$  e  $0,42 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  para *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454, respectivamente.

Trindade (2018) cultivou *M. loti* Semia 816 em meio com permeado de soro como fonte de carbono com uma razão C/N de 20 e obteve uma biomassa final de  $1,31 \pm 0,02 \text{ g L}^{-1}$  em 96 h de cultivo, sendo este valor notavelmente menor ao encontrado neste estudo para *Mesorhizobium* sp. Semia 816, porém muito similar ao obtido para *M. huakuii* Semia 6454. Em outro estudo feito por Ribeiro (2015), *M. loti* Semia 816 e *M. huakuii* Semia 4779 foram cultivados em meio com  $12,2 \text{ g L}^{-1}$  de glicerol residual por 120 h, chegando até valores de biomassa máxima de  $2,41 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$  e  $4,94 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, apresentando maior crescimento ao serem comparados com os meios com os coprodutos lácteos em estudo.

Continuando com os parâmetros da Tabela 5, a maior velocidade específica máxima de crescimento foi apresentada no meio YMA por *R. galegae* Semia 6448 ( $0,19 < 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) e as menores velocidades para *Mesorhizobium* sp. Semia 816 no meio YMA ( $0,07 < 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) e para *M. huakuii* Semia 6454 no meio YMA e PC ( $0,08 < 0,01 \text{ h}^{-1}$  e  $0,08 < 0,01 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente). Analisando este parâmetro para cada bactéria nos diferentes meios, a maior velocidade específica máxima de crescimento para *Mesorhizobium* sp. Semia 816 foi apresentada nos meios P e PC ( $0,09 < 0,01 \text{ h}^{-1}$ ), no caso de *M. huakuii* Semia 6454 a maior velocidade foi encontrada no meio P ( $0,11 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) e para *R. galegae* Semia 6448 no meio YMA ( $0,19 < 0,01 \text{ h}^{-1}$ ).

A velocidade específica máxima de crescimento de alguns rizóbios reportados na literatura apresenta similaridades às observadas neste estudo. Trindade (2018) determinou a velocidade específica máxima de crescimento para a bactéria *M. loti* Semia 816 e obteve  $0,09$  e  $0,11 \text{ h}^{-1}$  no meio YMA com razão C/N de 96,5 e no meio com permeado de soro com razão C/N de 96,5, respectivamente, sendo esses valores iguais aos observados neste estudo por *Mesorhizobium* sp. Semia 816 nos meios P e PC, assim como por *M. huakuii* Semia 6454 e *R. galegae* Semia 6448 no meio P. Em outro estudo realizado por Ribeiro (2015), *M. loti* Semia 816 e *M. huakuii* Semia 4779 foram cultivados em meio com glicerol residual e apresentaram uma velocidade específica de  $0,06 \text{ h}^{-1}$ , similar à apresentada por *Mesorhizobium* sp. Semia 816 no meio YMA ( $0,07 < 0,01 \text{ h}^{-1}$ ).

Os resultados da produção de EPS demonstram que a maior síntese do biopolímero foi obtida no meio P e a bactéria que mais produziu foi *M. huakuii* Semia 6454, existindo diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado com os outros meios e bactérias. Para o meio P, o rizóbio que produziu maior quantidade foi *M. huakuii* Semia 6454 ( $6,15 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$ ), seguido de *Mesorhizobium* sp. Semia 816 ( $4,86 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$ ) e a menor produção deste estudo foi apresentada por *R. galegae* Semia 6448 ( $0,79 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$ ). A baixa produção de EPS por *R. galegae* Semia 6448 poderia estar relacionada com o incremento do pH ao longo do tempo de cultivo (Figura 10), ficando fora da faixa recomendada de pH recomendada por Liu et al. (2017) para estimular a síntese do biopolímero, que está entre valores neutros e ligeiramente ácidos.

Depois do meio P, as melhores produções foram apresentadas no meio YMA, não havendo diferença significativa entre *Mesorhizobium* sp. Semia 816 ( $3,49 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ ) e *M. huakuii* Semia 6454 ( $3,69 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$ ), e o menor produtor deste meio também foi *R. galegae* Semia 6448 ( $2,12 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ ), mesmo apresentando uma biomassa estatisticamente igual a *M. huakuii* Semia 6454, indicando que esta bactéria tem menor capacidade de síntese do biopolímero, quando comparada com as outras mesmo em diferentes meios e razões C/N. Finalmente, as produções mais baixas foram apresentadas no meio PC, não existindo diferença significativa entre as produções dos dois rizóbios cultivados neste meio, sendo de  $1,85 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$  para *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e de  $1,69 \pm 0,17 \text{ g L}^{-1}$  para *M. huakuii* Semia 6454. Este meio não demonstrou ser suficientemente efetivo para a síntese de EPS por partes das bactérias e condições estudadas, indicando que, provavelmente, o extrato de levedura fornece nutrientes essenciais para o crescimento microbiano e produção de EPS que não são providos pelo colostro.

Relacionando à produção de EPS e a biomassa final apresentada no cultivo, no meio P é importante destacar que *Mesorhizobium* sp. Semia 816 apresentou maior biomassa final ( $p < 0,05$ ) que *M. huakuii* Semia 6454, mas a produção de EPS foi significativamente menor quando comparados. Neste caso, o comportamento sugere que a produção de EPS não está associada diretamente à biomassa. Castellane et al. (2015) explicam que na produção de biopolímeros microbianos, em certo ponto da curva de crescimento, as células não investem mais em carbono para o crescimento, favorecendo a produção de EPS. Além disso, este comportamento poderia estar relacionado com características e condições do meio e a influência destes sobre o metabolismo deste rizóbio, ou com uma melhor aptidão genética para produção de EPS por *M. huakuii* Semia 6454.

Trindade (2018), em seu estudo com *M. loti* Semia 816 em meio com permeado de soro e razão C/N de 20, obteve  $4,03 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ , sendo mais promissor o encontrado neste estudo com *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454. Porém conseguiu dobrar a produção mantendo a mesma razão, mas adicionando 20 e  $30 \text{ g L}^{-1}$  de permeado de soro, obtendo  $8,21 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$  e  $9,46 \pm 0,80 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Ribeiro (2015) avaliou a produção de EPS por *M. loti* Semia 816 e com *M. huakuii* Semia 4779 em meio com glicerol residual durante 120 h de cultivo e produziu  $4,90 \pm 0,21 \text{ g L}^{-1}$  e  $1,75 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, existindo diferença significativa entre as bactérias.

Outros estudos demonstram a produção de EPS por rizóbios em meios com outros coprodutos industriais. Zhou et al. (2014) determinaram que *R. radiobacter* S10 em meio com soro de queijo reconstituído a 10% e cultivado em fermentador a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm por 96 h produziu  $2,834 \pm 0,226 \text{ g L}^{-1}$ . Castellane et al. (2017) usaram sacarose (3%) e óleo diesel (0,1%) em um meio de cultivo para diferentes cepas de *R. tropici* durante 96 h, 140 rpm a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e obtiveram para a cepa Semia 4080 uma produção de  $5,26 \text{ g L}^{-1}$  e para a cepa mutante MUTZC3  $5,52 \text{ g L}^{-1}$ .

A produtividade apresentou o mesmo comportamento que a produção de EPS, confirmando que a maior produtividade foi apresentada no meio P, o melhor produtor foi *M. huakuii* Semia 6454, a menor produtividade dos estudos foi para *R. galegae* Semia 6448 e o meio com menores valores de produtividade foi o PC.

Finalmente, relacionado com o fator de conversão de biomassa em produto, os maiores valores foram encontrados, em termos gerais, no meio YMA, seguidos pelos do meio PC, enquanto que os menores valores foram obtidos no meio P para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *R. galegae* Semia 6448.

No caso dos melhores produtores de EPS (*Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454), quando cultivados nos meios YMA e P, *M. huakuii* Semia 6454 foi o rizóbio com maior capacidade de síntese de biopolímero, independentemente do meio, destacando-se que no meio P apresentou maior biomassa ( $1,35 \pm 0,15 \text{ g L}^{-1}$ ) que no meio YMA ( $0,57 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$ ) mas as células no meio YMA apresentaram melhor capacidade de síntese de EPS ( $7,12 \pm 1,40 \text{ g g}^{-1}$ ) que no meio P ( $4,85 \pm 0,48 \text{ g g}^{-1}$ ). Este comportamento pode ser explicado pela presença de algum constituinte do meio YMA que deixa as células com melhor capacidade de síntese ou pelo fato de que este meio apresenta maior razão C/N, disponibilizando mais carbono para a produção destas macromoléculas.

No caso de *Mesorhizobium* sp. Semia 816, este mesmo comportamento foi também evidenciado, sendo o maior produtor de biomassa no meio P ( $1,91 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ ), mas

apresentando menor fator de conversão de biomassa em produto ( $2,63 \pm 0,05 \text{ g g}^{-1}$ ) quando comparado com o meio YMA ( $5,29 \pm 0,11 \text{ g g}^{-1}$ ), porém no meio P apresentou maior produção de EPS ( $4,86 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$ ) que no meio YMA ( $3,49 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$ ).

De acordo com estes resultados, o meio que favoreceu a maior biomassa (meio P) favoreceu ao mesmo tempo a produção de EPS, mas onde houve menor crescimento (meio YMA) se observou maiores fatores de conversão de biomassa em produto. Este comportamento pode indicar que provavelmente o excesso de carbono do meio com maior razão C/N (meio YMA) favoreceu a capacidade de síntese do EPS pelas células mas afetando também o crescimento negativamente e fazendo com que a produção de EPS diminuísse em relação ao meio que providenciou menor razão C/N (meio P), esta por sua vez mais favorável ao crescimento microbiano.

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EPS

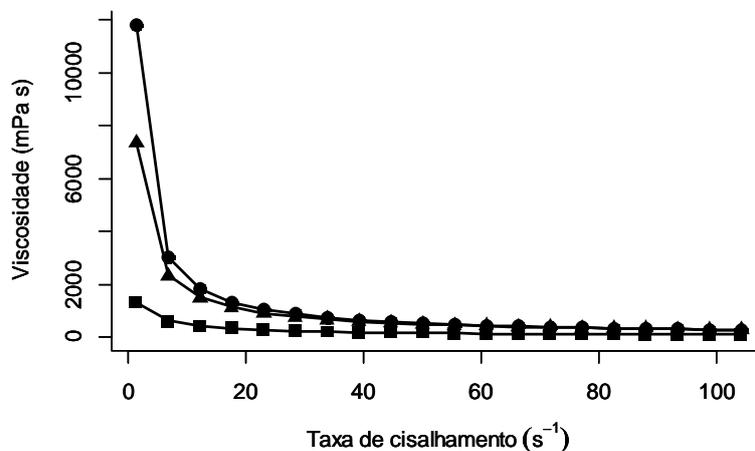
### 5.4.1 Propriedades reológicas dos EPS

O estudo das propriedades reológicas dos EPS proporciona valiosa informação sobre o comportamento destes biopolímeros frente a possíveis processos industriais, por exemplo em operações como bombeamento, *spray-dryer*, agitação, ou em relação à sensação de consistência do produto na boca (BAKHITIYARI; ASKARI; MOOSAVI, 2014).

O comportamento da viscosidade versus taxa de cisalhamento para soluções  $1\% \text{ m v}^{-1}$  sintetizados pelas bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816, *R. galegae* Semia 6448 e *M. huakuii* Semia 6454 no meio YMA pode ser observado na Figura 13, apresentando o valor médio de triplicata das medições com taxa de cisalhamento na faixa de  $1-104 \text{ s}^{-1}$ .

Ao analisar a viscosidade das soluções dos EPS sintetizados no meio YMA pode-se confirmar que apresentam o comportamento característico deste tipo de biopolímero, como fluido não newtoniano e de comportamento pseudoplástico, com a diminuição da viscosidade conforme a taxa de cisalhamento aumenta. Segundo o explicado por Xu et al. (2015), estas macromoléculas se entrelaçam e formam agregados em baixas taxas de cisalhamento, provocando resistência a fluir e assim apresentando uma alta viscosidade inicial, porém estes agregados vão se destruindo ao aumentar a taxa de cisalhamento e fazendo com que estas macromoléculas se dispersem ao longo da direção do fluxo, gerando a queda da viscosidade aparente.

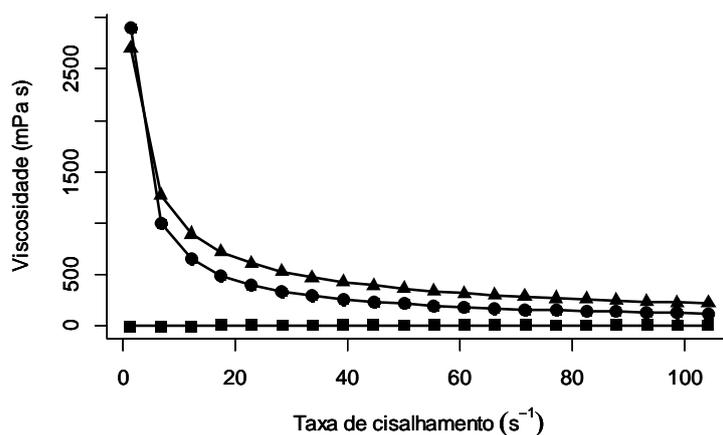
**Figura 13** – Comportamento da viscosidade para EPS ( $1\% \text{ m v}^{-1}$ ) produzido em meio YMA para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (●), *R. galegae* Semia 6448 (■) e *M. huakuii* Semia 6454 (▲)



De acordo com a Figura 13, a maior viscosidade aparente foi observada para a solução de EPS da bactéria *Mesorhizobium* sp. Semia 816, com 11828,1 mPa s e caindo para 3057,5 mPa s na taxa de  $6,7 \text{ s}^{-1}$ . A segunda maior viscosidade foi observada com a solução de EPS de *M. huakuii* Semia 6454, com 7341 mPa s e na taxa de  $6,7 \text{ s}^{-1}$  caindo para 2347 mPa s, e a menor viscosidade foi observada para a solução do EPS de *R. galegae* Semia 6448, começando com 1325,6 mPa s e caindo para 621,4 mPa s na taxa de  $6,7 \text{ s}^{-1}$ .

Continuando com o comportamento da viscosidade das soluções de EPS, na Figura 14 são apresentados os comportamentos das soluções de  $1\% \text{ m v}^{-1}$  de EPS sintetizados em meio P pelas bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816, *R. galegae* Semia 6448 e *M. huakuii* Semia 6454, apresentando o valor médio das medições.

**Figura 14** - Comportamento da viscosidade para EPS ( $1\% \text{ m v}^{-1}$ ) produzido em meio P para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (●), *R. galegae* Semia 6448 (■) e *M. huakuii* Semia 6454 (▲)

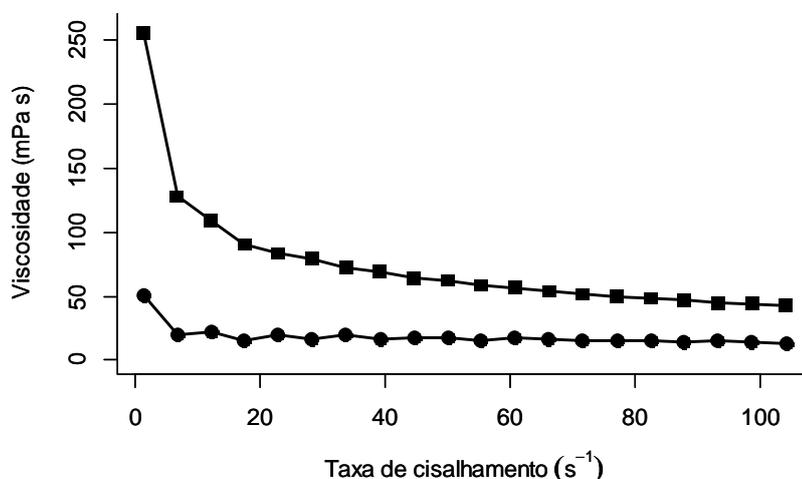


De acordo com o comportamento da viscosidade das soluções de EPS sintetizados no meio P, se confirma que os provenientes de *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454 são fluidos não newtonianos com comportamento pseudoplástico, porém apresentaram menor viscosidade ao serem comparados com os EPS sintetizados em meio YMA.

Na mais baixa taxa de cisalhamento, a solução de EPS de *Mesorhizobium* sp. Semia 816 foi levemente superior em viscosidade (2906,0 mPa s) comparada com a de *M. huakuii* Semia 6454 (2702,1 mPa s), porém a partir da taxa de cisalhamento de  $6,7 \text{ s}^{-1}$ , a viscosidade foi ligeiramente maior para a solução proveniente de *M. huakuii* Semia 6454, finalizando na maior taxa de cisalhamento ( $104 \text{ s}^{-1}$ ) em 221 mPa s e 122 mPa s para as soluções de EPS sintetizado por *M. huakuii* Semia 6454 e *Mesorhizobium* sp. Semia 816, respectivamente. A solução do EPS sintetizado por *R. galegae* Semia 6448 apresentou valores baixos de viscosidade aparente, registrando valores perto de zero, não confirmando o comportamento pseudoplástico, característico destas soluções de EPS.

Para as soluções  $1\% \text{ m v}^{-1}$  dos EPS sintetizados no meio PC, o comportamento da viscosidade é apresentado na Figura 15, apresentando o valor médio de triplicata das medições. Devido ao comportamento da viscosidade do EPS proveniente de *R. galegae* Semia 6448 no meio P, assim como a baixa produção de EPS, foi decidido não cultivar este rizóbio no meio PC.

**Figura 15** - Comportamento da viscosidade para EPS ( $1\% \text{ m v}^{-1}$ ) produzido em meio PC para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (●) e *M. huakuii* Semia 6454 (■)



A viscosidade apresentada nas soluções dos EPS provenientes dos rizóbios *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454 no meio PC é menor quando comparada

com o comportamento apresentado pelos outros EPS em estudo dos meios YMA e P. Para a solução do EPS de *M. huakuii* Semia 6454 foi possível confirmar o comportamento pseudoplástico, mas a solução do EPS de *Mesorhizobium* sp. Semia 816 não apresentou este comportamento esperado e a viscosidade se apresentou reduzida quando comparada com os outros EPS.

Outros pesquisadores estudaram o comportamento da viscosidade deste tipo de biopolímero. Castellane et al. (2015) determinaram em uma taxa de cisalhamento de  $5,01 \text{ s}^{-1}$  de uma solução aquosa de  $5 \text{ g L}^{-1}$  ( $0,5\% \text{ m v}^{-1}$ ) de EPS produzido pela bactéria *R. tropici* Semia 4077 uma viscosidade aparente de  $957,69 \text{ mPa s}$  e um comportamento pseudoplástico, sendo este valor de viscosidade ligeiramente inferior aos determinados neste estudo nos meios YMA e P, porém em menor concentração estudada.

Zhou et al. (2014) avaliaram a viscosidade em diferentes concentrações de um EPS sintetizado por *R. radiobacter* S10 cultivado em meio com soro de queijo, apresentando comportamento pseudoplástico em todas as concentrações estudadas. Com a solução de  $1\% \text{ (m v}^{-1}\text{)}$ , na taxa de cisalhamento de zero, determinaram uma alta viscosidade, de  $5557,84 \text{ Pa s}$ . Trindade (2018) estudou o comportamento da viscosidade de uma solução  $1\% \text{ (m v}^{-1}\text{)}$  de um EPS sintetizado por *M. loti* Semia 816 em meio com permeado de soro e razão C/N de 20 e obteve valores iniciais aproximadamente de  $10000 \text{ mPa s}$ , sendo maiores que os encontrados neste estudo.

Continuando com o estudo dos parâmetros reológicos, o índice K e n são apresentados na Tabela 6. Para a bactéria *R. galegae* Semia 6448 somente foi possível estabelecer estes parâmetros no meio YMA, devido à baixa viscosidade apresentada no meio P. Quanto maior o índice K, maior a resistência ao cisalhamento do material e o índice n confirma o quanto o material em estudo difere de um comportamento newtoniano, de forma que um valor menor que 1 confirma o comportamento pseudoplástico (CASTELLANE et al., 2015).

Os maiores índices K foram encontrados para as soluções de EPS provenientes do meio YMA, sendo notavelmente maior para *Mesorhizobium* sp. Semia 816 neste meio, assim como também no meio P. Todas as soluções dos EPS em estudo apresentaram  $n < 1$ , confirmando o comportamento pseudoplástico e concordando com uma maior viscosidade aparente e menor índice n, sendo que as que apresentaram o menor índice são provenientes do meio YMA, seguido das soluções do EPS sintetizados no meio P e com maiores índices os provenientes do meio PC.

De acordo com estes resultados, é possível afirmar que a viscosidade aparente assim como o índice K apresentaram uma diminuição que provavelmente está associada ao tipo de meio utilizado na síntese de EPS, sendo menores nos meios P e PC, respectivamente, quando comparados com o meio YMA. Porém, o comportamento pseudoplástico segundo o índice de comportamento de fluxo  $n$ , manteve-se.

Devido aos rendimentos de produção de EPS e à baixa viscosidade apresentada para as soluções dos EPS sintetizados por *R. galegae* Semia 6448 nos meios YMA e P, assim como dos sintetizados por *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454 no meio PC, os EPS selecionados para continuar com as caracterizações seguintes foram os sintetizados por *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (EPS-PM816) e *M. huakuii* Semia 6454 (EPS-PM6454) no meio P.

#### 5.4.2 Comportamento da viscosidade em presença de sais

O comportamento de viscosidade na presença de sais em soluções de EPS-PM816 e EPS-PM6454, assim como o comportamento da solução aquosa 1%  $m v^{-1}$  de ambos EPS, é apresentado nas Figuras 16 e 17. As quatro soluções salinas com 1%  $m v^{-1}$  dos EPS mantiveram um comportamento pseudoplástico ao diminuir a viscosidade conforme a taxa de cisalhamento aumentou. No entanto, pode ver-se como na presença de NaCl e KCl em concentrações de 0,1 mol L<sup>-1</sup> e 1 mol L<sup>-1</sup>, a viscosidade das soluções de EPS-PM816 apresentaram uma leve tendência de diminuição da viscosidade aparente (Figura 16) e para as soluções de EPS-PM6454 se observou uma marcada redução em presença das soluções salinas (Figura 17).

De acordo com este comportamento observado, na taxa de cisalhamento de 6,7 s<sup>-1</sup> a viscosidade aparente na presença de sais para o EPS-PM816 foi similar para as quatro soluções, variando de 768 mPa s (KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) a 887 mPa s (NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>), representando aproximadamente uma queda entre 12-24% quando comparado com a solução aquosa 1%  $m v^{-1}$  sem adição de sais na mesma taxa de cisalhamento (1006 mPa s), e tendendo a valores muito similares em taxas de cisalhamento crescentes. Para o EPS-PM6454 o comportamento é marcadamente diferente, já que na taxa de cisalhamento de 6,7 s<sup>-1</sup> as soluções salinas com o EPS apresentaram uma viscosidade aparente entre 512 mPa s (KCl 1 mol L<sup>-1</sup>) e 572 mPa s (NaCl 1 mol L<sup>-1</sup>), diminuindo aproximadamente entre 55-60% quando comparada com a solução aquosa 1%  $m v^{-1}$  do EPS na mesma taxa (1272 mPa s). Para taxas de cisalhamento crescentes, a viscosidade aparente foi muito similar entre as soluções salinas, mas diferindo da solução aquosa sem adição de sais.

**Tabela 6** - Parâmetros reológicos das soluções 1% m v<sup>-1</sup> dos EPS sintetizados nos meios YMA, P e PC obtidos com o modelo Ostwald-de-Waele (Lei da Potência).

Micro-organismo	K (mPa s <sup>n</sup> )			n			R <sup>2</sup>		
	YMA	P	PC	YMA	P	PC	YMA	P	PC
<i>Mesorhizobium</i> sp. Semia 816	154,24±7,80	39,00±0,27	0,64±0,21	0,14±0,01	0,26<0,01	0,66±0,09	0,99±0,01	0,98<0,01	0,90±0,09
<i>M. huakuii</i> Semia 6454	95,150±1,81	36,89±0,80	2,87±0,69	0,25<0,01	0,41<0,01	0,60±0,07	0,99<0,01	0,98<0,01	0,99<0,01
<i>R. galegae</i> Semia 6448	18,45±0,7	-	-	0,39<0,01	-	-	0,98<0,01	-	-

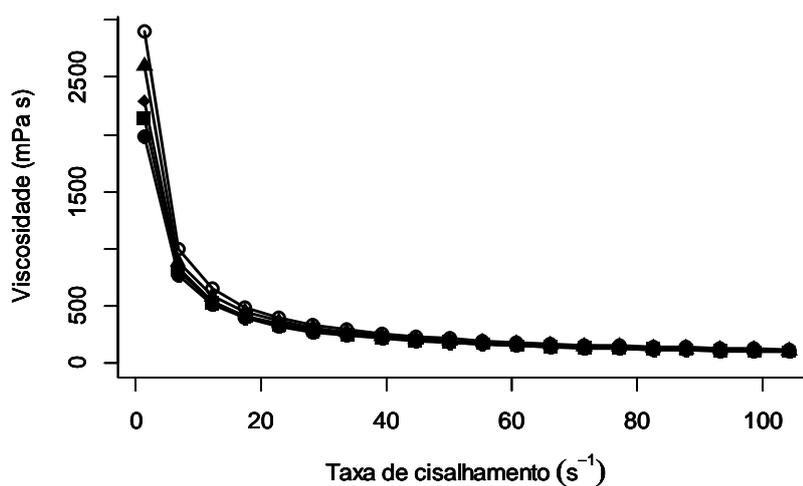
Índice de comportamento de fluxo: n; índice de consistência: K; YMA: *Yeast Manitol Agar*; P: Permeado; PC: Permeado e colostro.

De acordo com Xu et al. (2015), ao adicionar íons inorgânicos a repulsão eletrostática é protegida entre as cargas ao longo da cadeia principal do polieletrólito, mudando a conformação da macromolécula ao permitir que a cadeia se dobre e assumam uma estrutura mais compacta e pequena, pelo que o comportamento reológico poderia mudar, muitas vezes gerando uma diminuição da viscosidade.

Brunchi, Morariu e Bercea (2014) estudaram o efeito da adição de sais sobre a viscosidade da goma de xantana e descobriram que conforme aumentava o conteúdo de sais nas soluções, os valores da viscosidade intrínseca diminuíam. No entanto, existem comportamentos contrários como é o caso apresentado por Oliveira, Amaral e Burkert (2018) ao estudar a viscosidade aparente de soluções de KCl e NaCl de 1 mol L<sup>-1</sup> com 1% m v<sup>-1</sup> de EPS sintetizado por *M. loti* Semia 816 em meio com glicerol residual, onde observaram um aumento na viscosidade na presença de ambos os sais.

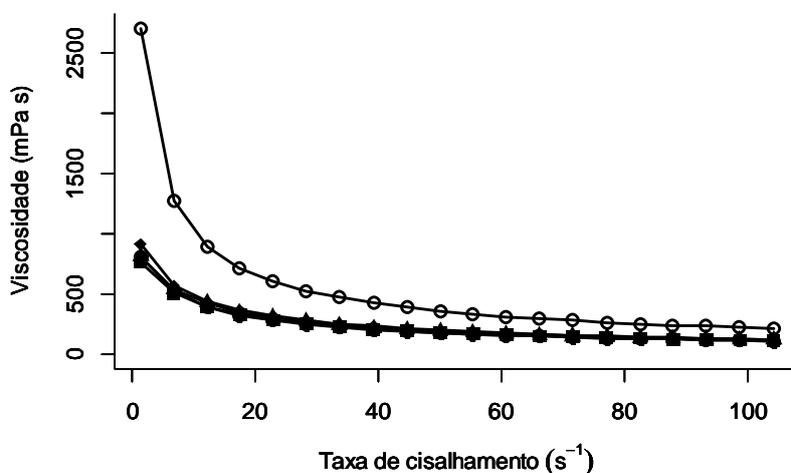
Andhare et al. (2017) analisaram o comportamento da viscosidade aparente de um EPS proveniente de *R. radiobacter* CAS em soluções de 10% de KCl, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> e NaCl e verificaram a estabilidade sem alterações ao comparar com a viscosidade de soluções aquosas em ausência de sais.

**Figura 16** - Comportamento da viscosidade de soluções aquosas salinas de NaCl e KCl do EPS-PM816



NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (▲); NaCl 1 mol L<sup>-1</sup> (◆); KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (●); KCl 1 mol L<sup>-1</sup> (■);  
Solução aquosa de EPS 1% m v<sup>-1</sup> sem adição de sais (○)

**Figura 17** - Comportamento da viscosidade de soluções aquosas salinas de NaCl e KCl do EPS-PM6454



NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (▲); NaCl 1 mol L<sup>-1</sup> (◆); KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (●); KCl 1 mol L<sup>-1</sup> (■);  
Solução aquosa de EPS 1% m v<sup>-1</sup> sem adição de sais (○)

### 5.4.3 Massa molar

O estudo da massa molar dos biopolímeros é crucial porque esta determina propriedades funcionais de um polissacarídeo, por exemplo as propriedades reológicas (SIMSEK et al., 2009), o melhoramento da textura e a prevenção da ocorrência da sinérese (WANG et al., 2016). A massa molar aproximada dos EPS é apresentada na Tabela 7, assim como alguns outros parâmetros moleculares. A maior massa molar foi de  $1,50 \times 10^6$  Da para o EPS-PM6454 e de  $6,95 \times 10^5$  Da para o EPS-PM816.

Estes resultados concordam com alguns outros reportados para EPS de origem rizobial. Oliveira, Amaral e Burkert (2018) estudaram um EPS sintetizado por *M. loti* Semia 816 em meio com glicerol residual que apresentou  $1,65 \times 10^6$  Da. Zhou et al. (2014) obtiveram um EPS a partir de *R. radiobacter* S10 cultivado em meio com soro de queijo que apresentou  $3,03 \times 10^6$  Da e, para um biopolímero produzido por *Agrobacterium* sp., Kim et al. (2003) encontraram uma massa molar de  $3,0 \times 10^5$  Da. Outras bactérias produtoras de EPS, como *Enterobacter* A47, apresentaram massa molar similar, como no caso dos EPS estudados por Antunes et al. (2015) produzidos em um meio de cultivo com lactose e outro com soro de queijo, produzindo biopolímeros com massa molar de  $4,7 \times 10^6$  Da e  $1,8 \times 10^6$  Da, respectivamente.

A dispersão da massa molar ( $M_w/M_n$ ) é usada para descrever a distribuição da massa molar, de modo que uma elevada dispersão indica menor homogeneidade da amostra,

como é o caso dos EPS em estudo, que apresentaram um alto índice de dispersão, pelo que provavelmente, mesmo que todos os EPS apresentem a mesma estrutura química, diferem no tamanho das cadeias ou no grau de polimerização.

**Tabela 7-** Parâmetros moleculares para EPS-PM816 e EPS-PM6454

EPS	Mw (Da)	Mn (Da)	Mz (Da)	Mp (Da)	Mw/Mn
EPS-PM816	$6,95 \times 10^5$	16068	$1,67 \times 10^6$	$4,01 \times 10^5$	43,280
EPS-PM6454	$1,50 \times 10^6$	52728	$2,17 \times 10^7$	$2,14 \times 10^6$	28,535

Massa molar média ponderal (Mw), massa molar média aritmética (Mn), massa molar média em tamanho (Mz), massa molar máxima (Mp) e dispersão da massa molar (Mw / Mn).

#### 5.4.4 FT-IR

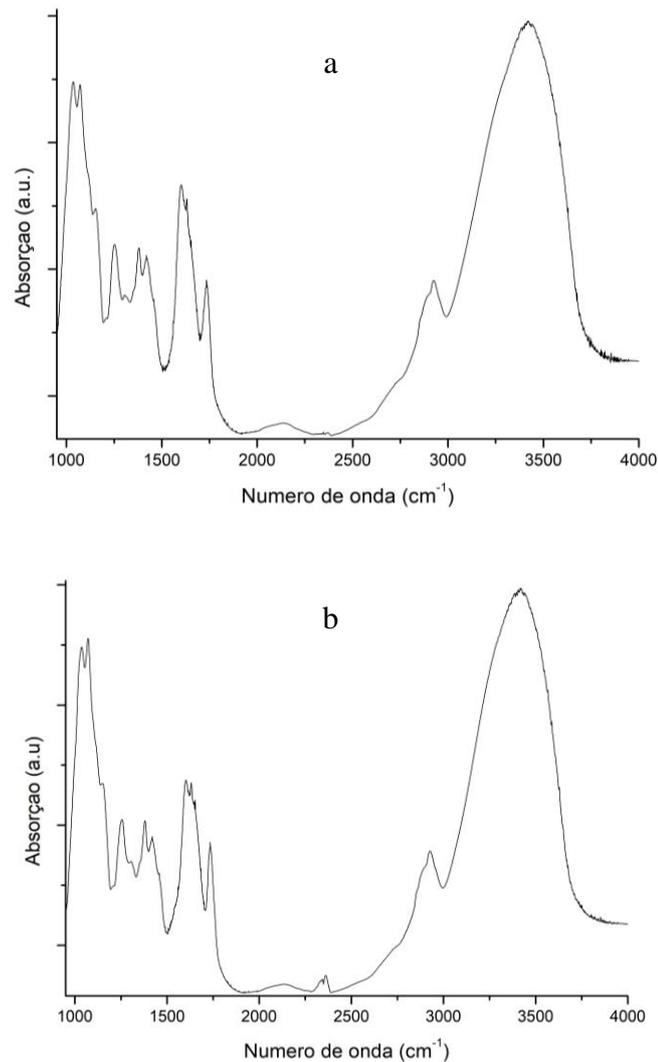
A espectroscopia de infravermelho para os biopolímeros EPS-PM6454 e EPS-PM816 são apresentados na Figura 18, onde pode ser confirmada a presença de grupos característicos de EPS rizobianos, assim como a grande similaridade entre ambos biopolímeros estudados.

Os EPS apresentaram picos entre  $897\text{-}931\text{ cm}^{-1}$  que indicam predominância de configurações  $\beta$  nas ligações glicosídicas (OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018; PRIYANKA et al., 2015). Os picos obtidos entre  $1035\text{-}1153\text{ cm}^{-1}$  estão associados com a presença de vibrações de C–O da função  $\text{CH}_3\text{-C=O}$  e de funções C–O e C–C de carboidratos (ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015), assim como demonstram a presença de ácidos urônicos (DEEPIKA et al., 2016).

Os picos detectados entre  $1251\text{-}1255\text{ cm}^{-1}$  podem corresponder a grupos acetil (PRIYANKA et al., 2015) e entre  $1420\text{-}1653\text{ cm}^{-1}$  são característicos de carboxilatos ( $\text{-COO}^-$ ) de resíduos ácidos como succinato e acetato (ANDHARE et al., 2017; CASTELLANE et al., 2017; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018). No caso da vibração reportada perto de  $1735\text{ cm}^{-1}$ , esta pode estar relacionada com C=O de ésteres carbonílicos do grupo acetil (ANDHARE et al., 2017), piruvato ou acetato (CASTELLANE et al., 2015).

Finalmente, o pico apresentado perto de  $2925\text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionado a vibrações de funções assimétricas de C–H de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  (ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015) e entre  $3417\text{-}3422\text{ cm}^{-1}$  podem ser associados a grupos hidroxila (OH), bem como absorção de água (ANDHARE et al., 2017; CARRIÓN; DELGADO; MERCADE, 2015; OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018).

**Figura 18** - Espectro de FT-IR dos principais grupos funcionais para EPS-PM816 (a) e EPS- PM6454 (b)



#### 5.4.5 Análises térmicas: TGA e DSC

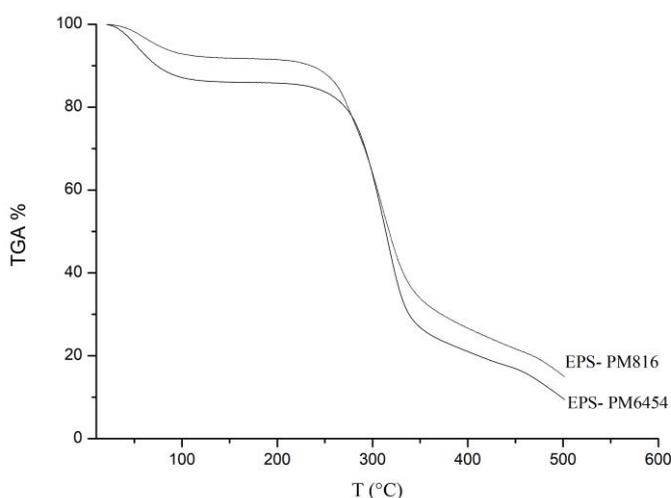
Análises termogravimétricas são frequentemente utilizadas em estudos com polímeros com o objetivo de obter informações sobre a estabilidade térmica desses materiais em possíveis condições de aplicação (GROENEWOUD, 2001), bem como a estabilidade oxidativa, vida útil, perfil de decomposição, umidade e conteúdo de compostos voláteis (POLINI; FANG, 2017).

O comportamento desta análise para os biopolímeros em estudo é apresentado na Figura 19. No caso do EPS-PM816, este começou com uma perda de massa gradual que começou aproximadamente aos 45 °C e foi até 65 °C, com diminuição de 3,75%, provavelmente devido à umidade do material e relacionada ao alto conteúdo de grupos carboxila nas moléculas

de EPS que são capazes de interagir com a água (NIKNEZHAD et al., 2018). Após esse comportamento, uma segunda diminuição foi identificada, sendo a mais importante em termos de perda de massa, com 52,29% entre aproximadamente 278 °C e 328 °C, e na última decomposição foi perdido 6,62% de massa entre 480 °C e 500 °C. O EPS-PM6454 teve um comportamento semelhante de perda em termos de faixas de temperatura, mas diferiu ligeiramente nas porcentagens ao perder mais massa, comparado com o outro EPS em estudo. A primeira perda de massa foi de 10,43% entre 42 °C e 67 °C, posteriormente perdeu 55,40% em torno de 288 °C e 330 °C e a última decomposição ocorreu entre os 465 °C e 500 °C e perdeu 7,54%.

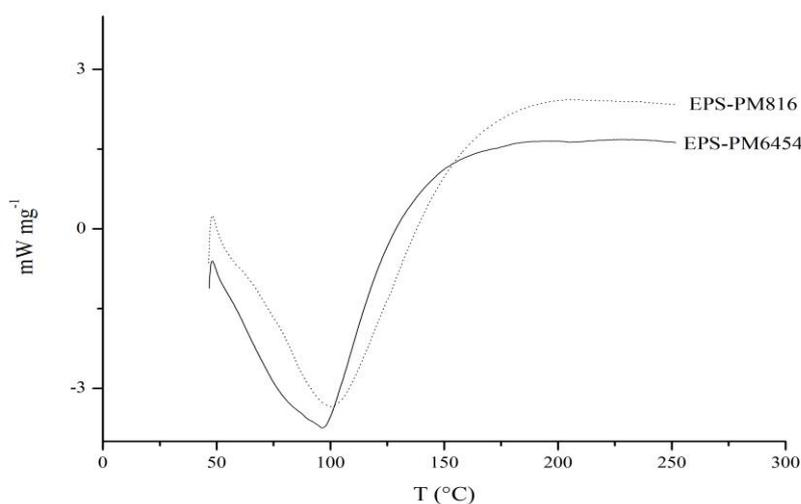
Existe uma possível associação entre o comportamento de degradação térmica e a composição de carboidratos do material (NIKNEZHAD et al., 2018), bem como com diferenças na massa molar do EPS e na presença de substituintes carregados (BAKHTIYARI; ASKARI; MOOSAVI, 2014). Baseado nos resultados apresentados, é possível estabelecer relações com possíveis processos industriais que envolvam altas temperaturas aos quais poderiam estar sujeitos estes biopolímeros, pelo que provavelmente teriam uma alta resistência térmica. Em outros estudos, um EPS obtido de um cultivo de *Pantoea* sp. O BCCS 001 GH apresentou uma perda de 69% entre 300 °C e 400 °C (NIKNEZHAD et al., 2018), a goma xantana na faixa de 251,5 °C a 330 °C diminuiu 41,6% em massa e a goma arábica 56,5% entre 223 °C e 377,5 °C (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004), sendo muito semelhante ao EPS em estudo.

**Figura 19** - Análise termogravimétrica (TGA) para os EPS-PM816 e EPS- PM6454



O estudo das transições térmicas que ocorrem com a rampa de aquecimento (DSC) é apresentado na Figura 20 para os EPS em estudo. Um único pico endotérmico foi apresentado a 96,65 °C para EPS-PM6454 e aos 100,63 °C para EPS-PM816. Essas mudanças podem estar relacionadas à quebra das ligações de hidrogênio, alterando a conformação e gerando fusão de agregados e desmembramento da rede (BAKHTIYARI; ASKARI; MOOSAVI, 2014). A goma xantana estudada por Zohuriaan e Shokrolahi (2004) apresentou três alterações na entalpia, a primeira teve um pico de temperatura a 81°C seguido por dois picos exotérmicos a 292,5 °C e 426,8 °C. Neste mesmo estudo, uma sucinoglicana produzida por *Agrobacterium radiobacter* sintetizada em meio com melaço e em meio com sacarose também apresentou picos endotérmicos únicos a 76,6 °C e 71,6 °C, respectivamente, apresentando maior resistência a essas alterações os EPS em estudo.

**Figura 20** - Termograma DSC para os EPS-PM816 e EPS-PM6454.



#### 5.4.6 Potencial Zeta

O potencial zeta representa a carga elétrica nas superfícies das partículas em emulsão, sendo considerado um parâmetro fundamental na predição da estabilidade (NIKNEZHAD et al., 2018). Isto se faz possível ao determinar o potencial eletrostático no limite que divide a camada compacta e a camada difusa quando uma partícula sólida está em contato com uma solução aquosa (SZE et al., 2003) e seu valor está relacionado com a estabilidade física das soluções. Por exemplo, um alto valor (positivo ou negativo) pode indicar estabilização elétrica e, em geral, quando as forças repulsivas excedem as forças de atração se favorece um sistema relativamente estável (LU; GAO, 2010). Segundo Bodmeier e Maincent

(1998), altos valores de potencial ( $<-30$  mV) devem ser alcançados para garantir uma alta barreira energética.

O potencial zeta das soluções de EPS em estudo foi de  $-31,7 \pm 0,40$  mV para o EPS- PM816 e  $-39,5 \pm 0,10$  mV para EPS-PM6454, o que indica que as partículas têm altos valores de potencial que poderiam promover a estabilização elétrica, além disso poderiam conter um importante conteúdo de ácidos urônicos já que, segundo Carrión, Delgado e Mercade (2015), a presença destes ácidos contribui para cargas negativas globais nos EPS bacterianos.

Niknezhad et al. (2018) determinaram em uma solução de 0,2% de um EPS sintetizado por *Pantoea* sp. BCCS 001 GH um valor de  $-65,67 \pm 0,6$  mV e consideraram que as partículas tinham uma alta carga superficial. Carrión, Delgado e Mercade (2015) estudaram uma emulsão de 2% de EPS sintetizado por *Pseudomonas* sp. ID1 proveniente da Antártica e uma mistura de água e cetiol (1:2; v v<sup>-1</sup>) e acharam um valor de  $0,11 \pm 0,4$  mV, pelo que consideraram que as partículas na emulsão tinham uma carga superficial fraca.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste estudo demonstraram que, nas condições de cultivo testadas, as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454 conseguiram metabolizar o permeado de soro ao serem capazes de crescer e sintetizar altas quantidades de EPS, apresentando as maiores produções ( $4,86 \pm 0,19 \text{ g L}^{-1}$  e  $6,15 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente) quando comparadas com os meios YMA e PC. O meio PC, em que o colostro substituiu o extrato de levedura, não demonstrou ser suficientemente efetivo para a síntese de EPS por parte das bactérias e condições ao apresentar os menores valores de produção, indicando que, provavelmente, o extrato de levedura fornece nutrientes essenciais para o crescimento microbiano e produção de EPS que não são providos pelo colostro. A bactéria *Rhizobium galegae* Semia 6448 demonstrou ser a menor produtora de EPS, tanto no meio YMA quanto no meio P.

O comportamento da viscosidade aparente foi promissor para as soluções aquosas provenientes dos EPS sintetizados pelas bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *M. huakuii* Semia 6454 no meio YMA. Apesar das melhores produções de EPS terem sido observadas com o meio P, empregando as mesmas bactérias, a viscosidade aparente foi menor quando comparadas com o meio YMA, mas o comportamento pseudoplástico característico destes biopolímeros em soluções continuou sendo observado. A viscosidade aparente apresentada pelas soluções aquosas no meio PC foi a menor, especialmente para a proveniente de *Mesorhizobium* sp. Semia 816, na qual não foi possível observar um comportamento pseudoplástico.

Os EPS dos rizóbios *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (EPS-PM816) e *M. huakuii* Semia 6454 (EPS-PM6454) sintetizados no meio P foram selecionados para uma caracterização mais detalhada devido apresentarem as maiores produções de EPS e maiores viscosidades aparente entre os EPS sintetizados nos meios com coprodutos lácteos.

Os biopolímeros EPS-PM816 e EPS-PM6454 foram caracterizados como macromoléculas de alta massa molar e que apresentam os grupamentos funcionais geralmente detectados para EPS rizobianos, alta estabilidade térmica em possíveis condições de aplicação, com altos valores de potencial eletrostático que poderiam propiciar a estabilização elétrica de soluções com estes EPS. A viscosidade aparente das soluções aquosas salinas de NaCl e KCl com 1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) de EPS demonstrou uma diminuição, sendo maior nas soluções do EPS-PM6454, porém o comportamento pseudoplástico se manteve para ambos.

Desta forma, os resultados observados neste estudo indicam o potencial de uso de um substrato de ampla produção e baixo custo, como é o permeado de soro, na área biotecnológica, para ser metabolizado por rizóbios na síntese de biopolímeros com características e propriedades de interesse industrial.

### SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Determinar o conteúdo de proteína e açúcares totais nos EPS sintetizados pelas bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454;
- Realizar um estudo da capacidade emulsificante para os EPS produzidos pelos rizóbios *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454 nos meios YMA e P;
- Explorar o comportamento reológico dos EPS produzidos pelos rizóbios *Mesorhizobium* sp. Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454 nos meios YMA e P em diferentes concentrações, assim como em diferentes valores de pH e temperatura;
- Avaliar o incremento do volume de meio de cultivos nos frascos Erlenmeyer de 500 mL, a fim de elevar os volumes de produção dos biopolímeros no laboratório.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN DAIRY PRODUCTS INSTITUTE. **Dairy Permeated Standard**, 2014. Disponível em: [https://www.adpi.org/Portals/0/Standards/DairyPermeateStandard\\_book.pdf](https://www.adpi.org/Portals/0/Standards/DairyPermeateStandard_book.pdf). Acesso em: 3 abril 2018.
- ANDHARE, P.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; MICHAUD, P.; PATHAK, H. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 1–8, 2017.
- ANTUNES, S.; FREITAS, F.; ALVES, V.D.; GRANDFILS, C.; REIS, M.A.M.; Conversion of cheese whey into a fucose- and glucuronic acid-rich extracellular polysaccharide by *Enterobacter* A47. **Journal of Biotechnology**, v. 210, p. 1–7, 2015.
- AOAC, **Official Methods of Analysis**. 16<sup>th</sup> ed. Washington, DC. Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- AOAC, **Official Methods of Analysis**. 17<sup>th</sup> ed. Washington, DC. Association of Official Analytical Chemists, 2000.
- ARANDA-SELVERIO, G. **Propriedades reológicas de exopolissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium***. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto – SP.
- BAKHTIYARI, M.; ASKARI, H.; MOOSAVI, M.N. Optimization of succinoglycan hydrocolloid production by *Agrobacterium radiobacter* grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 18–29, 2014.
- BRUNCHI, C. E.; MORARIU, S.; BERCEA, M. Intrinsic viscosity and conformational parameters of xanthan in aqueous solutions: Salt addition effect. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 122, p. 512–519, 2014.
- CARRIÓN, O.; DELGADO, L.; MERCADE, E. New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 1028–1034, 2015.
- CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. D. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191–197, 2014.
- CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, M. E. G. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, n. 1, p. 515–522, 2015.
- CASTELLANE, T.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. S.; LOPES, E. M.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Characterization of new exopolysaccharide

production by *Rhizobium tropici* during growth on hydrocarbon substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 361–369, 2017.

DEEPIKA, K.V.; RAGHURAM, M.; KARIALI, E.; BRAMHACHARI, P.V. Biological responses of symbiotic *Rhizobium radiobacter* strain VBCK1062 to the arsenic contaminated rhizosphere soils of mung bean. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 134, p. 1-10, 2016.

DESHIKAN, S. R.; PAPADOPOULOS, K. D. Modified Booth equation for the calculation of zeta potential. **Colloid and Polymer Science**, v. 276, n. 2, p. 117–124, 1998.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR, G. S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C.; LOPES, L. M. D. A.; COSTA, A. C. A.; BARROS, A. Effect of process parameters on production of a biopolymer by *Rhizobium* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113–116, p. 639–652, 2004.

DUTA, P.; PESSOA, F. F.; LOPES, L. M. A. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in *Rhizobium* sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 391–399, 2006.

FITZPATRICK, J. J.; AHRENS, M.; SMITH, S. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 671–675, 2001.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388–398, 2011.

FREITAS, F.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1674–1683, 2017.

GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C. A.; ZÁCHIA, M. A. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains of *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89–96, 2014.

GARCÍA, P.; CARRO, L.; ROBLEDO, M.; BAHENA, M. H. R.; FLORES, F. J.; FERNÁNDEZ, M. T.; MATEOS, P. F.; RIVAS, R.; IGUAL, J. M.; MARTÍNEZ, M. E.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E. *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps : Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. **Plos One**, v. 7, n. 5, p. 1–7, 2012.

GHOSH, P. K.; MAITI, T. K. Structure of extracellular polysaccharides (EPS) produced by rhizobia and their functions in legume–bacteria symbiosis: A review. **Achievements in the Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 136–143, 2016.

GROENEWOUD, W.M. Thermogravimetry. IN:\_\_\_\_\_. **Characterisation of polymers by thermal analysis**, 2001. cap. 2. p. 61-76. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444506047500030>. Acesso em: 11 jan. 2019.

GUTIERREZ, N. A.; DEBARR, D.; MADDOX, I. S. Production of diacetyl from whey permeate using *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 183–184, 1996.

HAMINIUK, C. W. I.; SIERAKOWSKI, M. R.; IZIDORO, D. R.; MASSON, M. L. Rheological characterization of blackberry pulp. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, p. 291-296, 2006.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: \_\_\_\_\_. **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher Ltda, 2001. cap. 6. p. 93-121.

IYER, A.; MODY, K.; JHA, B. Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 220–222, 2006.

JIN, H.; LEE, N. K.; SHIN, M. K.; KIM, S. K.; KAPLAN, D. L.; LEE, J. W. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 3, p. 357–360, 2003.

KIM, H. O.; LIM, J. M.; JOO, J. H.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1175–1182, 2005.

KIM, M. K.; RYU, K. E.; CHOI, W. A.; RHEE, Y. H.; LEE, I. Y. Enhanced production of (1 → 3)-β-D-glucan by a mutant strain of *Agrobacterium species*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 163–168, 2003.

KUMAR, A. S.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides - A perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 103–117, 2007.

LAVARI, L.; IANIELLO, R.; PAÉZ, R.; ZOTTA, T.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.; PARENTE, E.; VINDEROLA, G. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 322–330, 2015.

LIU, J.; WANG, X.; PU, H.; LIU, S.; KAN, J.; JIN, C. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1113–1124, 2017.

LU, G. W.; GAO, P. Emulsions and microemulsions for topical and transdermal drug delivery. IN: \_\_\_\_\_. **Personal care & cosmetic technology, Handbook of non-invasive drug delivery systems**, 2010. cap. 3. p. 59-94. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780815520252100034>. Acesso em: 11 jan. 2019.

MACEDO, M. G.; LACROIX, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-

9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 419–426, 2002.

MANN, E. E.; WOZNIAK, D. J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 893–916, 2012.

MARQUES, R.; VON STOSCH, M.; PORTELA, R. M. C.; TORRES, C. A. V.; ANTUNES, S.; FREITAS, F.; REIS, M. A. M.; OLIVEIRA, R. Hybrid modeling of microbial exopolysaccharide (EPS) production: The case of *Enterobacter* A47. **Journal of Biotechnology**, v. 246, p. 61–70, 2017.

MILKPOINT. **Permeado de soro e suas aplicações: um futuro promissor**, 2016. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/permeado-de-soro-e-suas-aplicacoes-um-futuro-promissor-98617n.aspx>. Acesso em: 17 jan. 2019.

MORETTO, C.; CASTELLANE, T. C. L.; LOPES, E. M.; OMORI, W. P.; SACCO, L. P.; LEMOS, E. G. M. Chemical and rheological properties of exopolysaccharides produced by four isolates of *Rhizobia*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291–298, 2015.

MOSCOVICI, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2015.

NIKNEZHAD, S. V.; DARZI, G. N.; MOROVVAT, H.; GHASEMI, Y. Exopolysaccharide production of *Pantoea* sp. BCCS 001 GH: Physical characterizations, emulsification, and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1103–1111, 2018.

NORTON, S.; LACROIX, C.; VUILLEMARD, J. Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 1, p. 457–466, 1994.

OLIVEIRA, J. M. **Caracterização do exopolissacarídeo produzido por *Mesorhizobium loti* Semia 816 a partir de glicerol residual**. 2017. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Campus de Rio Grande, Rio Grande – RS.

OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, S. A.; BURKERT, C. A. V. Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2180–2187, 2018.

PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 5, p. 285–297, 1997.

POLINI, A.; YANG, F. Physicochemical characterization of nanofiber composites. IN: \_\_\_\_\_. **Nanofiber composites for biomedical applications**, 2017. cap. 5. p. 97-115. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081001738000053>. Acesso em: 13 jan. 2019.

POOLE, P.; ALLAWAY, D. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. **Advances in**

**Microbial Physiology**, v. 43, p. 117–163, 2000.

PRIYANKA, P.; ARUN, A. B.; ASHWINI, P.; REKHA, P. D. Versatile properties of an exopolysaccharide R-PS18 produced by *Rhizobium* sp. PRIM-18. **Carbohydrate Polymers**, v. 126, n. 1, p. 215–221, 2015.

RADCHENKOVA, N.; VASSILEV, S.; PANCHEV, I.; ANZELMO, G.; TOMOVA, I.; NICOLAUS, B.; KUNCHEVA, M.; PETROV, K.; KAMBOUROVA, M. Production and properties of two novel exopolysaccharides synthesized by a thermophilic bacterium *Aeribacillus pallidus* 418. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 31-43, 2013.

RAPIN, J. D.; MARRISON, I. W.; STOCKAR, U.; REILLY, P.J. Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 143-150, 1994.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578–592, 2010.

REINHOLD, H. B.; HUREK, T. Life in grasses: Diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 139–144, 1998.

RIBEIRO, V. A. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meios à base de glicerol residual**. 2015. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Campus de Rio Grande, Rio Grande – RS.

ROCA, C.; ALVES, V.D.; FREITAS, F.; REIS, M.A.M. Exopolysaccharides enriched in rare sugars : Bacterial sources , production , and applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–7, 2015.

RÜHMANN, B.; SCHMID, J.; SIEBER, V. Methods to identify the unexplored diversity of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2015.

SAALFELD, M.H. Colostro bovino: a descoberta de um alimento humano funcional e nutracêutico, 2017. Disponível em: <http://tecnologiasocial.fbb.org.br/tecnologiasocial/banco-de-tecnologias-sociais/pesquisar-tecnologias/detalhar-tecnologia-623.htm>. Acesso em: 17 jan. 2019.

SCHMID, J.; SIEBER, V.; REHM, B. Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-24, 2015.

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review of Genetics**, v. 32, n. 1, p. 33–57, 1998.

SIMSEK, S.; MERT, B.; CAMPANELLA, O. H.; REUHS, B. Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 320–324, 2009.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J. *Rhizobial* exopolysaccharides: Genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 5, p. 1-19, 2006.

STAUDT, A. K.; WOLFE, L. G.; SHROUT, J. D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. **Archives of Microbiology**, v. 194, n. 3, p. 197–206, 2012.

SURVASE, S. A.; SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. Enhanced production of scleroglucan by *Sclerotium rolfsii* MTCC 2156 by use of metabolic precursors. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 410–415, 2007.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1, p. 663–674, 2001.

SZE, A.; ERICKSON, D.; REN, L.; LI, D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 261, n. 2, p. 402–410, 2003.

TOKSOY, E. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. IN:\_\_\_\_\_. **Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries**. Berlim: Ed. Fang Z., 2013. cap. 2. p. 35-56.

TRIGUEROS, D. E. G.; FIORESE, M. L.; KROUMOV, A. D.; HINTERHOLZ, C. L.; NADAI, B. L.; ASSUNÇÃO, G. M. Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 71–83, 2016.

TRINDADE, R. A. **Produção de exopolissacarídeos bacterianos a partir de glicerol residual gerado na síntese de biodiesel**. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Campus de Rio Grande, Rio Grande – RS.

VARGAS, M. C.V.; LÓPEZ, M. J.; ELORRIETA, M. J.; SUÁREZ, F.; MORENO, J. Influence of nutritional and environmental factors on polysaccharide production by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 5–10, 2001.

WANG, X. Y. Z.; DONG, J. J.; XU, G. C.; HAN, R. Z.; NI, Y. Enhanced curdlan production with nitrogen feeding during polysaccharide synthesis by *Rhizobium radiobacter*. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, n. 1, p. 385–391, 2016.

WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, . p. 415-420, 1988.

WILLEM, A.; THIBAUT, J.; LACROIX, C. Continuous lactic acid production in whey permeate / yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1, p. 324–337, 2006.

XU, L.; DONG, M.; GONG, H.; SUN, M.; LI, Y. Effects of inorganic cations on the rheology of aqueous welan, xanthan, gellan solutions and their mixtures. **Carbohydrate Polymers**, v.

121, p. 147–154, 2015.

XUEWU, Z.; XIN, L.; DEXIANG, G.; WEI, Z.; TONG, X.; YONGHONG, M. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 27, n. 2, p. 203–209, 1996.

YADAV, J. S. S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 756–774, 2015.

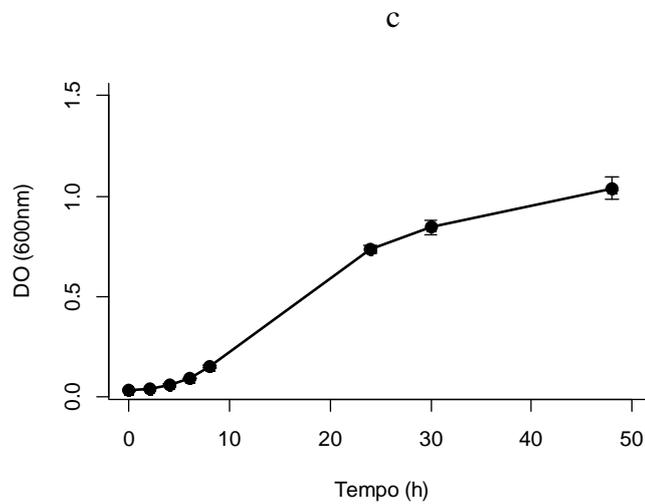
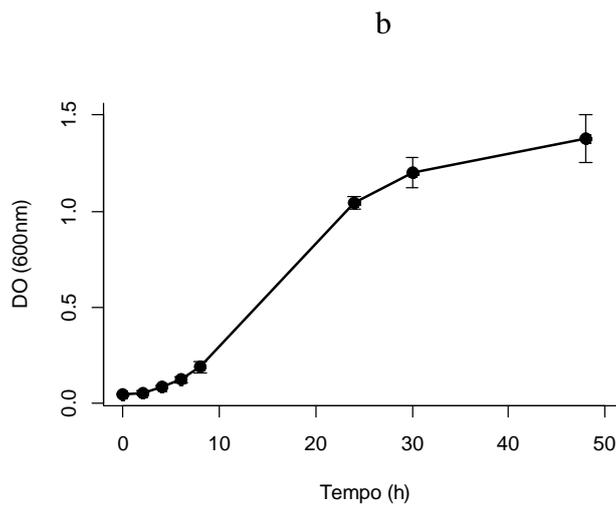
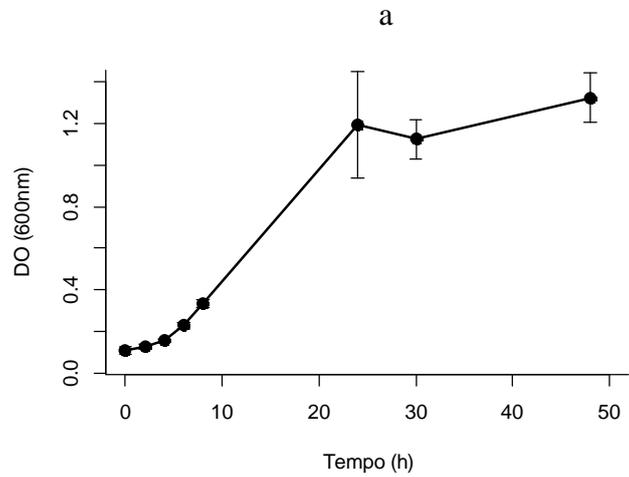
ZHOU, F.; WU, Z.; CHEN, C.; HAN, J.; AI, L.; GUO, B. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium radiobacter* S10 in whey and their rheological properties. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 362–368, 2014.

ZOHURIAAN, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**, v. 23, n. 5, p. 575–579, 2004.

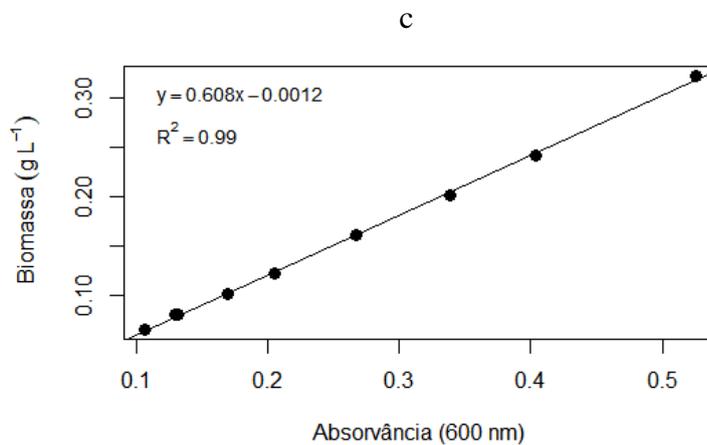
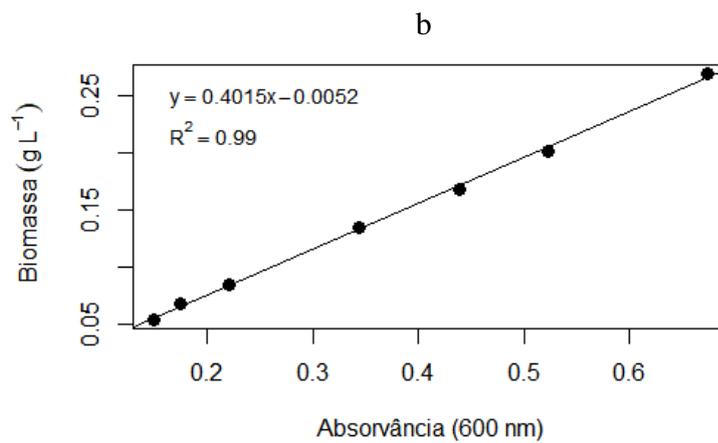
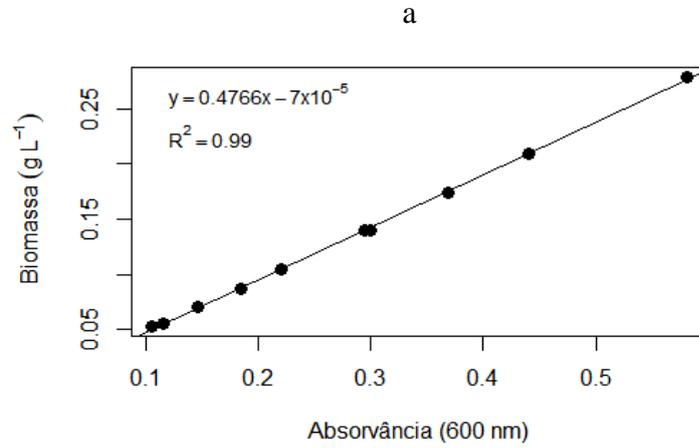


## APÊNDICES

**Apêndice A-** Acompanhamento da DO para as bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (a), *Rhizobium galegae* Semia 6448 (b) e *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454 (c)



**Apêndice B** - Curva padrão de biomassa das bactérias *Mesorhizobium* sp. Semia 816 (a), *Rhizobium galegae* Semia 6448 (b) e *Mesorhizobium huakuii* Semia 6454 (c)



## ANEXOS

## Anexo A - Laudo Permeado de Soro

Arla Foods Ingredients  
Product sheet 1314

Date 03.12.2014

Page 1/2

# Variolac® 850



### Description

Variolac® 850 is a spray-dried free flowing whey permeate powder.

### Properties

- Free flowing
- High wettability
- Sweet dairy flavour
- Flavour binding and enhancing
- Lactose and amino acids facilitate the Maillard reaction

### Chemical specifications

Protein (N <sub>x</sub> 6.38 ) as Is	Max. 3%
Lactose monohydrate	Min. 85%
Ash	Max. 7%
Moisture	Max. 3.5%

### Nutritional data

Energy	1485kJ/355kcal
--------	----------------

### Physical specifications

pH (10% solution)	5.8-6.5
Bulk density	Level 0.7 g/cm <sup>3</sup>
Colour	Pale yellow
Flavour/odour	Bland, slightly salty

### Microbiological specifications

Total plate count	Max. 10,000/g
Enterobacteriaceae	Max. 50/g
Staphylococcus aureus coagulase +	Absent in 1g
Yeast and mould	Max. 100/g
Salmonella	Absent in 125g

### Mineral profile

Sodium, Na	Level 0.6%
Magnesium, Mg	Level 0.1%
Phosphorus, P	Level 0.6%
Chloride, Cl	Level 0.8%
Potassium, K	Level 1.5%
Calcium, Ca	Level 0.6%

### Packaging

Paper bags with a polyethylene inner bag containing 25 kg net.

### Storage

Store in closed bags under cool and dry conditions (below 25°C and 65% relative humidity) to prevent deterioration due to humidity and high temperatures.

### Shelf Life

Minimum 12 months if kept under the prescribed storage conditions.

## Anexo B - Laudo Colostro Bovino

**COLOSTRO BOVINO EM PÓ**  
**Ingrediente para alimentação animal**

**COMPOSIÇÃO BÁSICA DO PRODUTO**

Colostro Bovino em Pó  
 Polietileno glicol monooleato  
 Polioxietileno monooleato sorbitano  
 Butilhidroxitolueno (B.H.T)  
 Tocoferóis  
 Silicato de cálcio

**INDICAÇÕES DE USO**

O uso oral do Colostro Bovino em Pó é indicado para bezerros recém-nascidos, podendo também ser usado após o primeiro dia de vida como um ingrediente para alimentação de bezerros recém-nascidos.

**MODO DE USAR:**

- Para alimentação através de mamadeira, utilizar 1 pacote (470g) misturado com 1,0 litro de água morna (43 a 49° C). Isso resultará em um novo volume total de 1,4 litros.
- Em caso de alimentação através de sonda esofágica, utilizar 1 1/2 pacote (705g) misturado com 1,5 litros de água morna (43 a 49° C). Isso resultará em um novo volume total de 2,1 litros. Consultar um médico veterinário para administrar por via.

**Para complementar o colostro materno**

- Fornecer ½ pacote (235g) misturado com meio litro de água morna (43 a 49° C).

O Colostro Bovino em Pó pode ser usado nas mesmas quantidades e condições para todas as raças bovinas independente de suas massas corporais, o volume a ser ministrado permanece o mesmo.

**NÍVEIS DE GARANTIA**

Proteína Bruta (Min.)	.....	211,5g
Extrato Etéreo (Min.)	.....	65,8g
Cálcio (Min./Máx.)	.....	3,75 - 5,17g
Fósforo (Min.)	.....	2,82g
Lactose (Min.)	.....	23,5g
Matéria Mineral (Máx.)	.....	37,6g
Umidade (Máx.)	.....	32,9g

**PRODUTO IMPORTADO**

Fabricado por:  
 The Saskatoon Colostrum Company Ltd.,  
 Saskatoon, SK, Canada  
 Website: www.sccl.com  
 E-mail: support@sccl.com  
 Telefone: 13062423185

Importado por:  
 Alta Genetics do Brasil LTDA  
 CNPJ: 00.771.945/0001-71  
 Rodovia BR 050- KM 164  
 Uberaba/MG  
 CEP: 38.020-970  
 Telefone: (34) 3318-7777

Registro do estabelecimento no MAPA - MG- 92210  
 Produto registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o nº MG.92210 / 25001

Data de Fabricação:  
 Número do Lote:  
 Data de Validade:

2017/02  
 17-026  
 2020/01