

## PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR *Mesorhizobium loti* Semia 816 A PARTIR DO PERMEADO DE SORO EM DIFERENTES RAZÕES C/N

ADRIEL PENHA MUNHOZ<sup>1</sup>; RENATA AGUIRRE TRINDADE<sup>2</sup>; MARIANA VILAR CASTRO DA VEIGA DE MATTOS<sup>3</sup>; FERNANDA GERMANO ALVES GAUTÉRIO<sup>4</sup>; CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande – adrielmunhoz@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal do Rio Grande – rtrindade@furg.br

<sup>3</sup> Universidade Federal do Rio Grande – marianavcvmattos@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal do Pampa / Campus Bagé – fernandagauterio@unipampa.edu.br

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio Grande – burkert@vetorial.net

### 1. INTRODUÇÃO

Exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares, produzidos por fungos e bactérias, sendo encontrados ligados à superfície das células ou excretados na forma de limo para o meio extracelular (BARBOSA et al., 2004).

Esses biopolímeros são aplicados nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, pois alteram as propriedades físicas do meio onde se encontram, seja por conferirem alta viscosidade às soluções ou por criarem redes intermoleculares coesivas. São utilizados na indústria de alimentos como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, gelificantes, entre outras aplicações (ARANDA-SELVERIO et al., 2010).

A fonte de carbono é um dos fatores que influencia a produção de EPS, bem como o teor de nitrogênio e fósforo disponível, aeração, temperatura e pH da cultura (SERRATO, 2008). A viscosidade das soluções de EPS varia de acordo com pH, temperatura, concentração do EPS, massa molar e solubilidade (BARBOSA et al., 2004).

Dentre as bactérias potencialmente produtoras de EPS destacam-se as diazotróficas (RIBEIRO; BURKERT, 2016), sendo mencionado na literatura o uso de soro de queijo (ZHOU et al., 2014), água residual da indústria de pescados (SELLAMI et al., 2015) e glicerol residual (RIBEIRO, 2015) como fontes de carbono para o cultivo.

Neste trabalho, teve-se como objetivo avaliar diferentes razões C/N, utilizando permeado de soro no cultivo de *Mesorhizobium loti* Semia 816 visando à produção de EPS, bem como a determinação da viscosidade.

### 2. METODOLOGIA

O permeado de soro em pó foi gentilmente cedido pelo Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - CETEC - UNIVATES, localizada em Lajeado-RS, produzido pela empresa *Arla Food Ingredients*, localizada na Dinamarca, contendo aproximadamente 85 % (m m<sup>-1</sup>) de lactose. A bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816 foi obtida do Banco de Culturas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, sendo reativada a 30°C em meio YMA (*Yeast Manitol*).

Para o preparo do inóculo, a cultura microbiana foi raspada com 10 mL de água peptonada 0,1%, transferida para *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de caldo YMA. A suspensão foi incubada a 30°C até atingir a DO 0,8 de acordo com STAUDT et al., (2012), sendo então transferidos 10 mL para o cultivo.

Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de meio, inoculados com suspensão da bactéria a 30°C e 200 rpm. Foi utilizado o caldo YMA com modificações, pH 7,0, substituindo o manitol pelo

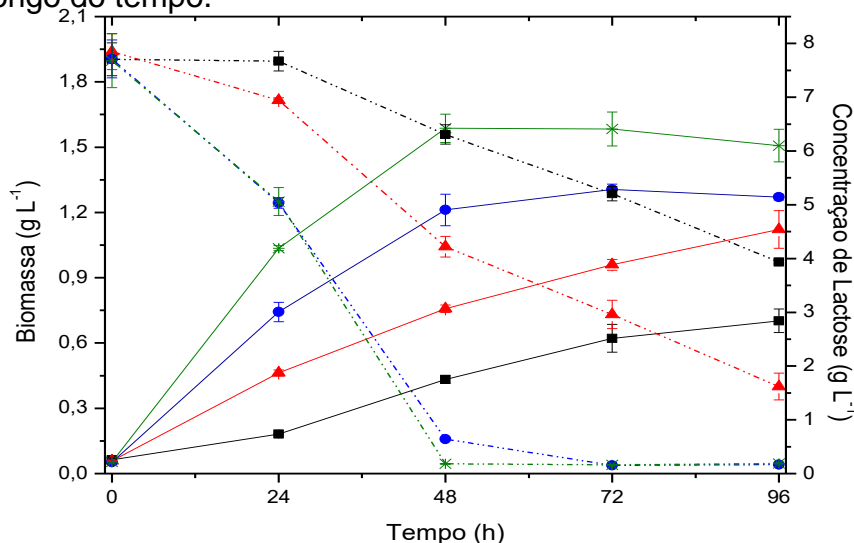
permeado do soro na razão C/N 60, 40, 20 e 10, através do ajuste da concentração do extrato de levedura, mantendo a concentração do permeado em  $10 \text{ g L}^{-1}$ . A biomassa foi monitorada por medida da absorbância a 600 nm no sedimento ressuspensionado em água, sendo centrifugada por 15 min a  $10.000 \times g$  (PRIETO et al., 2008). O pH do sobrenadante foi medido em medidor de pH (AOAC, 2000). A concentração de açúcar redutor foi determinada pelo método do ácido 3,5 ácido dinitrossalicílico (MILLER, 1959), com medida de absorbância a 540 nm e conversão para  $\text{g L}^{-1}$  a partir de uma curva padrão de lactose.

O EPS foi recuperado ao final do cultivo (96 h), centrifugando-se 10 mL do caldo por 20 min a  $13.000 \times g$ , seguido de precipitação do sobrenadante por adição de etanol ( $1:3 \text{ v v}^{-1}$ ), centrifugação e quantificação por gravimetria. Para a determinação da viscosidade, após precipitação o EPS foi dissolvido, dialisado, liofilizado e solubilizado ( $1\% \text{ m v}^{-1}$ ) em água Milli-Q, sendo determinada a viscosidade aparente (cP) em função da taxa de cisalhamento ( $\text{s}^{-1}$ ) utilizando reômetro digital Brookfield (EUA).

Os valores médios e desvios padrão foram calculados através do *software Statistica 5.0* (StatSoft Inc., EUA) (MONTGOMERY, 2004), sendo que para a construção dos gráficos utilizou-se o *software OriginPro 8* (OriginLab, EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o acompanhamento da biomassa e concentração de lactose ao longo do tempo.

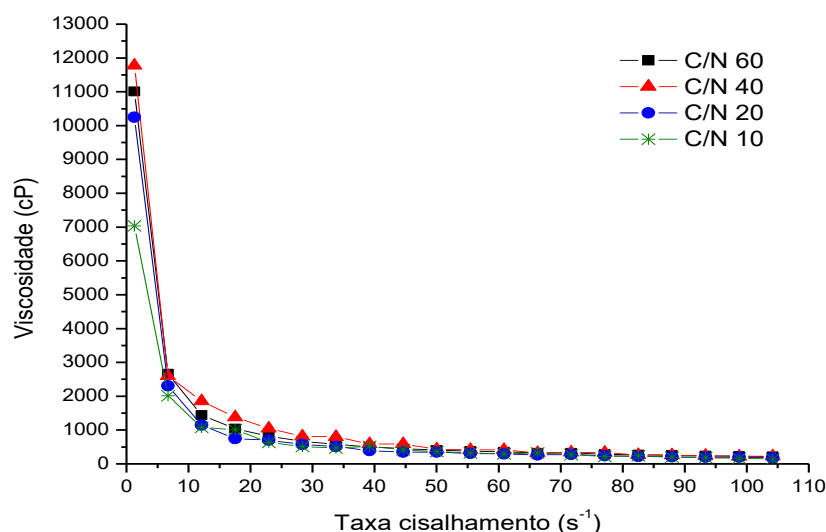


**Figura 1.** Acompanhamento da biomassa e concentração de lactose ao longo do tempo nas razões C/N (■) 60, (▲) 40, (●) 20 e (✱) 10, sendo a linha contínua biomassa e a linha pontilhada concentração de lactose

Pode observar que a maior concentração celular foi encontrada na menor razão C/N (10), sendo esta de  $1,59 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ , seguida pela razão C/N de 20, 40 e 60, sendo estas de  $1,31 \pm 0,02$ ;  $1,12 \pm 0,09$  e  $0,70 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente. Pode-se ainda perceber que nas razões C/N de 10 e 20 a lactose presente no meio foi praticamente toda consumida em 48 h de cultivo. Já na razão C/N de 40 a concentração de lactose ficou em torno de  $1,62 \pm 0,24 \text{ g L}^{-1}$ , e na razão de 60 esta foi de  $3,94 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ , não sendo totalmente consumida. Portanto, verifica-se uma relação entre as menores concentrações de biomassa obtidas nestas razões C/N (40 e 60) e o menor consumo de substrato, o que pode estar associado à limitação de nitrogênio.

Ao analisar a concentração de EPS, o mesmo comportamento foi observado, ou seja, maiores concentrações de EPS em menores razões C/N, sendo de  $4,09 \pm 0,11$ ;  $4,03 \pm 0,04$ ;  $3,61 \pm 0,20$  e  $1,58 \pm 0,12$  g L<sup>-1</sup>, nas razões C/N de 10, 20, 40 e 60, respectivamente, não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as razões C/N de 10 e 20.

A Figura 2 apresenta os resultados de viscosidade do EPS produzido com permeado de soro, nas diferentes razões C/N, onde se pode observar um mesmo comportamento pseudoplástico, porém com diferentes valores de viscosidade. Maiores valores de viscosidade foram encontrados nas maiores razões C/N, sendo a maior viscosidade encontrada de 11.777 cP, ao utilizar a razão C/N de 40, seguido de 11.012 cP na razão de 60 e 10.248 cP na razão de 20, sendo o menor valor encontrado de 7.036 cP na razão de 10. Pode-se observar que nas razões C/N de 20, 40 e 60 as viscosidades foram bastante próximas, havendo uma queda mais acentuada no valor da viscosidade na razão de 10.



**Figura 2.** Viscosidade do EPS (1 % m v<sup>-1</sup>) produzido com permeado de soro nas diferentes razões C/N.

CASTELLANE et al., (2014) encontraram 1,14 g L<sup>-1</sup> de biomassa e 2,52 g L<sup>-1</sup> de EPS para *Rhizobium tropici* SEMIA 4080, utilizando manitol como fonte de carbono, alcançando valores de viscosidade em torno de 10.000 cP, valor similar ao encontrado no presente trabalho ao utilizar outra fonte de carbono e outro micro-organismo. RIBEIRO (2015) encontrou 6,44 g.L<sup>-1</sup> de EPS e 5.138 cP de viscosidade para esta mesma bactéria, utilizando 12,2 g.L<sup>-1</sup> de glicerol residual e uma razão C/N de 94. Em uma maior razão C/N encontraram uma maior concentração de EPS, mas uma menor viscosidade, o que indica que a razão C/N, bem como a fonte de carbono utilizada, influencia diretamente a produção do EPS, bem como na sua viscosidade.

#### 4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que o EPS produzido com permeado de soro mostrou-se bastante promissor, onde menores razões C/N, ou seja, maiores concentrações de extrato de levedura, resultaram em maior consumo de lactose, acarretando em um maior crescimento celular, consecutivamente, maior concentração de EPS, mas uma menor viscosidade. Sendo assim, a razão C/N mostrou-se como um fator importante a ser

investigado, pois afeta diretamente a concentração do EPS, bem como sua viscosidade.

Agradecimentos: FAPERGS, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A. L. B.; CAMPOS-SÁS, L. F.; JUNIOR, O. S.; VASCONCELOS, A. F. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. Química Nova, v. 33, n. 4, p. 895-899, 2010.

AOAC, Official Methods of Analysis (17<sup>th</sup>edn). Washington: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.

BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. Ciências Exatas e Tecnológicas, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. Carbohydrate Polymers, v. 111, p. 191-197, 2014.

MILLER, G.H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v.31, p. 426-428, 1959.

MONTGOMERY, D.C. Introdução ao controle estatístico de qualidade. 4ª ed. Rio de Janeiro, Editora LTC, 2004.

PRIETO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coast al zone in Brazil. Chemosphere, v. 71, p. 1781-1785, 2008.

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), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

RIBEIRO, V.A.; BURKERT, C. A. V. Exopolysaccharides produced by *Rhizobium*: Production, composition and rheological properties. Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2016.

RIBEIRO, V. A.; TEIXEIRA, M.; BURKERT, C. A. V. Cultivo de bactérias utilizando glicerina residual para obtenção de exopolissacarídeos. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, XX, 2014. Florianópolis. 7p.

SELLAMI, M.; OSZAKO, T.; MILED, N.; REBAH, F.B. Industrial wastewater as raw material for exopolysaccharide production by *Rhizobium leguminosarum*. Brazilian Journal of Microbiology, v. 46, n. 2, p. 407-413, 2015.

SERRATO, R.V. Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas. 2008. 143 f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

ZHOU, F., WU, Z.; CHEN, C.; 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.