



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

BIOCONVERSÃO DO PERMEADO DE SORO EM ÁCIDO LÁTICO E
EXOPOLISSACARÍDEOS POR BACTÉRIAS

RENATA AGUIRRE TRINDADE

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT

Orientador

PROF^a. DR^a. FERNANDA GERMANO ALVES GAUTÉRIO

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2018

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

BIOCONVERSÃO DO PERMEADO DE SORO EM ÁCIDO LÁTICO E
EXOPOLISSACARÍDEOS POR BACTÉRIAS

RENATA AGUIRRE TRINDADE

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT

Orientador

PROF^a. DR^a. FERNANDA GERMANO ALVES GAUTÉRIO

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2018

Ficha catalográfica

T833b Trindade, Renata Aguirre.
Bioconversão de permeado de soro em ácido láctico e exopolissacarídeos
por bactéria / Renata Aguirre Trindade. – 2018.
203 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG,
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio
Grande/RS, 2018.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

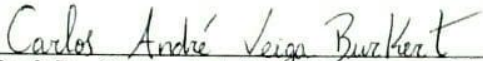
Coorientadora: Dr^a. Fernanda Germano Alves Gautério.

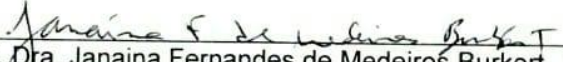
1. Bactérias ácido lácticas 2. Bactérias diazotróficas 3. Glicerol residual
4. Água de maceração de milho 5. Permeado de soro 6. Comportamento
reológico I. Burkert, Carlos André Veiga II. Gautério, Fernanda Germano
Alves III. Título.

CDU 664

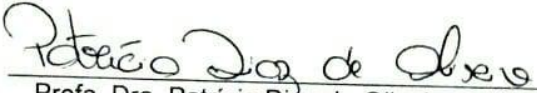
APROVAÇÃO

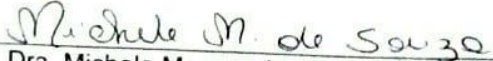
Tese defendida por Renata Aguirre Trindade aprovada em 18 de maio de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:


Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG


Profa. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert - FURG


Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto - FURG


Profa. Dra. Patrícia Díaz de Oliveira - UFPEL


Dra. Michele Moraes de Souza - FURG

Dedico este trabalho a minha mãe, Ilza Maria Aguirre Trindade,
muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meu caminho;

Aos meus pais, primeiramente por me darem a vida, minha mãe, Ilza Maria Aguirre Trindade, meu porto seguro, obrigada pelo apoio incondicional, pela confiança sempre em mim depositada, a meu pai Sergio Renato Vargas Trindade (*in memoriam*), a quem não tive a honra de conhecer mas certamente foi de quem herdei essa vontade de aprender, de caminhar novos caminhos, sei que onde estiver está orgulhoso de mim;

Ao meu namorado, Marcelo Pereira Batista, como relata Carpinejar:
"você pode conhecer alguém por acaso, mas ficar junto sempre será uma escolha",
obrigada por me escolher, obrigada por fazer parte da minha vida e assim tornar ela mais alegre, obrigada por acreditar em mim e sempre me incentivar e muito obrigada pelo carinho e dedicação principalmente nessa etapa,
ao nosso filho de quatro patas, Duque, pela alegria com que ele me recebe todos os dias ao chegar em casa;

Ao restante da minha família, não é fácil a saudade que sentimos, os obstáculos que temos que transpor e as abdições que fazemos, mas a vida é feita de escolhas, eu escolhi e só tenho a agradecer pelo apoio da família maravilhosa que tenho, obrigada pela confiança, por acreditarem em mim;

Ao meu orientador, Carlos André Veiga Burkert, pela confiança, sempre com muita paciência, muito obrigada por todos os ensinamentos e orientação desde meus primeiros passos na Universidade;

À minha coorientadora, Fernanda Germano Alves Gautério, obrigada pela amizade e por toda contribuição ao longo do trabalho;

A Janaína Fernandes de Medeiros Burkert, Luiz Antônio de Almeida Pinto, Michele Moraes de Souza e Patrícia Diaz, pelas valiosas contribuições;

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (Engebio) e do Laboratório de Análise Sensorial e Controle de Qualidade (LASCQ), como relata Carl W. Buehner: "as pessoas esquecerão o que você disse, as pessoas esquecerão o que você fez, mas elas nunca esquecerão como você as fez sentir", o meu sentimento é o melhor por cada um de vocês, me orgulho muito em fazer parte dessa grande família, obrigada a Carina Borba, Belkis Roesler, Joice Oliveira, Tábita Veiga, Daniela Nogueira, Renata Nunes, Carolina Herrera, Guilherme Menegazzi, Keslei Rosendo, Sabrina Adamoli, Juliane Silveira, Iasmim Souza, Joana Ores, Bruno Ladeira e Elisane Santos (vai ser sempre uma de nós), cada qual com seu jeitinho, poderia ficar horas escrevendo sobre as qualidades de cada um, mas por hora gostaria de agradecer a todos pela amizade, pelos momentos de aprendizado, de ajuda, de cumplicidade, de ótima companhia e também pelos momentos de descontração, o meu muito obrigada! Moram no meu coração!

Ao aluno de iniciação científica, Adriel Penha Munhoz, que me acompanhou em toda essa caminhada e foi parte essencial deste quebra cabeça, sempre com muita boa vontade, alegria, disposição e acima de tudo amizade, amizade essa que quero levar para vida toda, e a aluna de iniciação científica, Mariana Mattos, que tive a honra de conviver na última etapa dessa tese, sempre muito responsável, dedicada e com muita boa vontade, só tenho a agradecer aos dois, espero sinceramente ter contribuído de alguma forma ou de outra com o crescimento de vocês;

Aos amigos do CTG Farroupilha - FURG, pessoas inigualáveis, obrigada pelos momentos de descontração;

Ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), pelo auxílio nas análises de ácido láctico;

Ao Laboratório de Controle Ambiental, pelo auxílio nas análises reológicas;

Ao Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) e Laboratório de Eletro-espectro Analítica (LEEA), pelas análises de minerais;

Ao Laboratório de Hidroquímica, pelas análises de C,H,N;

Ao CNPq, FAPERGS e CAPES, pelo apoio financeiro;

Enfim, agradecer a todos que de uma forma ou outra contribuíram para realização deste trabalho.

Deixe algum sinal de alegria por onde passe

Chico Xavier

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 - Condições de cultivo utilizadas no crescimento de diferentes <i>Lactobacillus</i>	41
Tabela 2 - Condições de cultivo para produção de AL por diferentes <i>Lactobacillus</i>	45
Tabela 3 - Condições de cultivo utilizadas no crescimento de diferentes Rizóbios	48
Tabela 4 - Condições de cultivo utilizadas para produção de EPS por diferentes Rizóbios ...	52

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - SCREENING DE *Lactobacillus* POTENCIAIS PRODUTORES DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Tabela 1 - Biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$) velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e produtividade em biomassa* para diferentes <i>Lactobacillus</i> , utilizando PS, glicose e GR como fonte de carbono	87
--	----

ARTIGO II - EFEITOS DA CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE PERMEADO DE SORO EM ÁCIDO LÁCTICO POR *L. plantarum* INCQS 00007

Tabela 1 - Matriz do delineamento experimental PB com valores reais (codificados)	103
Tabela 2 - Composição proximal em base seca (%) e de minerais (mg kg^{-1}) do PS.*	107
Tabela 3 - Análise elementar do PS, EL, EC e peptona	108
Tabela 4 - Matriz do delineamento experimental PB com valores codificados e suas respectivas respostas.....	112
Tabela 5 - Efeitos das variáveis sobre biomassa e AL em 96 h de cultivo	113
Tabela 6 - Biomassa máxima, AL, AR residual, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ e produtividade em AL para diferentes concentrações iniciais de PS em 144 h de cultivo*	119
Tabela 7 - Biomassa, AL, AR residual, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ e produtividade em AL para os cultivos em batelada simples e batelada alimentada*	122

ARTIGO III - EPS DE *Mesorhizobium loti* SEMIA 816 A PARTIR DE PERMEADO DE SORO: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo em termos de concentração de EL para as diferentes razões C/N, mantendo 10 g L^{-1} de PS	135
---	-----

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo em termos da fonte de nitrogênio para as diferentes razões C/N, mantendo 10 g L ⁻¹ de PS.....	136
Tabela 3 - Composição do meio de cultivo em termos da fonte de nitrogênio utilizando 20 e 30 g L ⁻¹ de PS, mantendo a razão C/N de 20	136
Tabela 4 - Análise elementar do PS, EL e AMM	140
Tabela 5 - Biomassa máxima, velocidade específica máxima de crescimento, EPS e produtividade em EPS em 96 h de cultivo para <i>M. loti</i> Semia 816 nas diferentes condições de cultivo*.....	144
Tabela 6 - Biomassa máxima, EPS, produtividade em EPS e Y _{P/S} , Y _{X/S} , e Y _{P/X} determinados em 96 h de cultivo nas diferentes razões C/N*	146
Tabela 7 - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções de EPS (1 % m v ⁻¹) produzidos pela bactéria <i>M. loti</i> Semia 816, nas diferentes razões C/N.....	149
Tabela 8 - Biomassa máxima, EPS, produtividade em EPS, Y _{P/S} Y _{X/S} Y _{P/X} determinados em 96 h de cultivo nas diferentes razões C/N*	152
Tabela 9 - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções de EPS (1 % m v ⁻¹) produzidos pela bactéria <i>M. loti</i> Semia 816, com as diferentes fontes de nitrogênio	154
Tabela 10 - Biomassa máxima, EPS, produtividade em EPS , Y _{P/S} Y _{X/S} Y _{P/X} determinados em 96 h de cultivo nas diferentes razões C/N*	157
Tabela 11 - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções de EPS (1 % m v ⁻¹) produzidos pela bactéria <i>M. loti</i> Semia 816, nas diferentes condições de cultivo.....	160

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Representação simplificada das vias do metabolismo (a) homofermentativo e (b) heterofermentativo de bactérias do gênero <i>Lactobacillus</i>	40
Figura 2 - Fórmula molecular dos isômeros D(-) e L(+) ácido lático	43
Figura 3 - Produção do AL por (a) síntese química e (b) fermentação microbiana	44
Figura 4 - Estrutura química do heteropolissacarídeo succinoglicana	55

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I - SCREENING DE *Lactobacillus* POTENCIAIS PRODUTORES DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Figura 1 - Acompanhamento do ln (DO) (■) com e (□) sem agitação ao longo do tempo para (a) <i>L. rhamnosus</i> INCQS 00223, (b) <i>L. fermentum</i> INCQS 00224 e (c) <i>L. helveticus</i> INCQS 00227	77
Figura 2 - Acompanhamento do ln (DO) (■) com e (□) sem agitação ao longo do tempo para (a) <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> INCQS 00222, (b) <i>L. acidophilus</i> INCQS 00076 e (c) <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> INCQS 00035	78
Figura 3 - Acompanhamento do ln (DO) (■) com e (□) sem agitação ao longo do tempo para (a) <i>L. leichmannii</i> INCQS 00008 e (b) <i>L. plantarum</i> INCQS 00007.	79
Figura 4 - Acompanhamento da biomassa () e pH (--), utilizando (▲) glicose, (■) PS e (◆) GR como fonte de carbono para (a) <i>L. rhamnosus</i> INCQS 00223 e (b) <i>L. fermentum</i> INCQS 00224	81
Figura 5 - Acompanhamento da biomassa () e pH (--), utilizando (▲) glicose, (■) PS e (◆) GR como fonte de carbono para (a) <i>L. helveticus</i> INCQS 00227 e (b) <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> INCQS 00222	82
Figura 6 - Acompanhamento da biomassa () e pH (--), utilizando (▲) glicose, (■) PS e (◆) GR como fonte de carbono para (a) <i>L. acidophilus</i> INCQS 00076 e (b) <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> INCQS 00035	83
Figura 7 - Acompanhamento da biomassa () e pH (--), utilizando (▲) glicose, (■) PS e (◆) GR como fonte de carbono para (a) <i>L. leichmannii</i> INCQS 00008 e (b) <i>L. plantarum</i> INCQS 00007	84
Figura 8 - Concentração de AL* em 96 h de cultivo, utilizando □ glicose e ■ PS como fonte de carbono.....	89

ARTIGO II - EFEITOS DA CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE PERMEADO DE SORO EM ÁCIDO LÁTICO POR *L. plantarum* INCQS 00007

Figura 1 - Acompanhamento da biomassa (a,b,c) e pH (d,e,f) ao longo do tempo nos ensaios do PB.....	109
Figura 2 - Acompanhamento dos AR (a,b,c) e AL (d,e,f) ao longo do tempo nos ensaios do PB.....	110
Figura 3 - Acompanhamento da (a) biomassa e pH, (b) AR e AL da melhor condição do P ao longo do tempo (■) sem a uste do p, (◇) com a uste do p, sendo () biomassa e AR e (--) pH e AL	116
Figura 4 - Acompanhamento da (a) biomassa e pH, (b) AR e AL ao longo do tempo, utilizando (■) 60, (□) 80, (■) 120 e (◇) 160 g L ⁻¹ de PS, sendo a () biomassa e AL e (--) pH e AR	118
Figura 5 - Acompanhamento da (□) biomassa, (►) p; (◆) concentração de AR e (■) concentração de AL ao longo do tempo, sendo () biomassa e AL e (--) pH e AR.....	121

ARTIGO III - EPS DE *Mesorhizobium loti* SEMIA 816 A PARTIR DE PERMEADO DE SORO: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

Figura 1 - Acompanhamento da ln (DO) para bactéria <i>M. loti</i> Semia 816.....	141
Figura 2 - Acompanhamento da (a) biomassa, () p e (c) AR utilizando (■) manitol com razão de 6, () PS com razão de 6, e (◇)PS com razão de 60, onde () cultivo com ajuste de pH e (--) sem ajuste de pH inicial (7,0)**	143
Figura 3 - Acompanhamento da (a) biomassa (), pH (--) e (b) AR utilizando PS na razão de (□) 6, () 60, (◇) 40, (▲) 20 e (■)10.....	145
Figura 4 - Viscosidade para EPS (1 % m v ⁻¹) para as diferentes razões C/N	148
Figura 5 - Acompanhamento da (a) biomassa (), pH (--) e () AR, utilizando (■) AMM 20; () AMM 6, ; (◆) nitrato 20 e (▲) nitrato 6, ; (◇) EL 20 e (▼) EL C/N 96,5	151
Figura 6 - Viscosidade para EPS (1 % m v ⁻¹) utilizando AMM, nitrato ou EL para as diferentes razões C/N	154
Figura 7 - Acompanhamento da (a) biomassa (), pH (--) e () AR, utilizando () 10 g L ⁻¹ de PS com AMM; (■) 20 g L ⁻¹ de PS com AMM; (○) 30 g L ⁻¹ de PS com AMM; (◄)10 g L ⁻¹ de PS com EL; (◆) 20 g L ⁻¹ de PS com EL; e (▲) 30 g L ⁻¹ de PS com EL.....	156
Figura 8 - Viscosidade para EPS (1 % m v ⁻¹), utilizando AMM ou EL para as diferentes concentrações de PS, na razão C/N 20.....	159

LISTA DE ABREVIATURAS

AL - Ácido Lático

AMM - Água de Maceração de Milho

AR - Açúcares Redutores

BAL - Bactérias Ácido Láticas

DO - Densidade Ótica

EC - Extrato de Carne

EL - Extrato de Levedura

EPS - Exopolissacarídeos

GR - Glicerol Residual

GRAS - Geralmente Reconhecido como Seguro

MRS- *Man, Rogosa e Sharp*

PB - *Plackett Burman*

PS - Permeado de Soro

YMA - Yeast Manitol

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	25
RESUMO	27
ABSTRACT	29
1 INTRODUÇÃO	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 OBJETIVO GERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
 CAPÍTULO II	35
3 REVISÃO DA LITERATURA	37
3.1 COPRODUTOS INDUSTRIAIS NO CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS	37
3.1.1 Permeado de soro	37
3.1.2 Glicerol residual	38
3.1.3 Água de maceração de milho	38
3.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	39
3.2.1 Gênero <i>Lactobacillus</i>	39
3.2.2 Bactérias homofermentativas e heterofermentativas	40
3.3 ÁCIDO LÁTICO	42
3.3.1 Ácido láctico: síntese química e fermentativa	43
3.4 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	47
3.5 EXOPOLISSACARÍDEOS	50
3.5.1 Exopolissacarídeos por rizóbios	51
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
 CAPÍTULO III	65
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	65
 ARTIGO I	67
SCREENING DE <i>Lactobacillus</i> POTENCIAIS PRODUTORES DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS	67
RESUMO	69

1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODOS	72
2.1 MATERIAL	72
2.1.1 Micro-organismos	72
2.1.2 Glicerol residual	73
2.1.3 Permeado de soro	73
2.2 MÉTODOS	73
2.2.1 Reidratação das culturas liofilizadas	73
2.2.2 Manutenção e reativação das culturas	74
2.2.3 Estudo da padronização do inóculo	74
2.2.4 <i>Screening</i> das BAL	74
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS	75
2.3.1 Determinação do pH	75
2.3.2 Determinação da biomassa	75
2.3.3 Determinação de AL	75
2.4 PARÂMETROS CINÉTICOS	76
2.4.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular e produtividade	76
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	76
3.2 <i>SCREENING</i> DAS BAL: CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE AL	80
4 CONCLUSÕES	90
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
 ARTIGO II	 95
EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE PERMEADO DE SORO EM ÁCIDO LÁTICO POR <i>Lactobacillus plantarum</i>	95
RESUMO	97
1 INTRODUÇÃO	99
2 MATERIAL E MÉTODOS	100
2.1 MATERIAL	100
2.1.1 Micro-organismo	100
2.1.2 Permeado de soro	100
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO	101

2.2.1 Caracterização do PS	101
2.2.2 Determinação de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N)	101
2.3 CULTIVOS COM <i>L. plantarum</i>	102
2.3.1 Preparo do inóculo	102
2.3.2 Delineamento experimental <i>Plackett Burman</i>	102
2.3.3 Ajuste do pH do meio ao longo do cultivo	104
2.3.4 Efeito da concentração do PS na produção de AL	104
2.3.5 Cultivos em batelada alimentada	104
2.4 PARÂMETROS DETERMINADOS AO LONGO DO CULTIVO	104
2.4.1 Determinação do pH	104
2.4.2 Determinação da biomassa	104
2.4.3 Determinação de açúcares redutores (AR)	105
2.4.4 Determinação do AL	105
2.4.5 Fatores de conversão	105
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	106
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	106
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PS	106
3.2 DETERMINAÇÃO DE C, H E N	107
3.3 ACOMPANHAMENTO DOS CULTIVOS DO PB	108
3.4 AJUSTE DO pH AO LONGO DO CULTIVO	115
3.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO PS	117
3.6 BATELADA ALIMENTADA	121
4 CONCLUSÕES	123
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	124
 ARTIGO III	 127
EXOPOLISSACARÍDEO DE <i>Mesorhizobium loti</i> SEMIA 816 A PARTIR DE PERMEADO DE SORO: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA	127
RESUMO	129
1 INTRODUÇÃO	131
2 MATERIAL E MÉTODOS	132
2.1 MATERIAL	132
2.1.1 Micro-organismos	132

2.1.2 Permeado de soro	133
2.1.3 Água de maceração de milho e nitrato	133
2.2 DETERMINAÇÃO DO CARBONO, HIDROGÊNIO E NITROGÊNIO	133
2.3 CULTIVOS COM <i>M. loti</i> Semia 816	133
2.3.1 Manutenção e reativação da cultura	133
2.3.2 Padronização do inóculo	134
2.3.3 Cultivo de <i>M. loti</i> Semia 816	134
2.4 PARÂMETROS CINÉTICOS	136
2.4.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular	136
2.4.2 Produtividade	137
2.4.3 Fator de conversão de substrato em produto	137
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS	138
2.5.1 Determinação do pH	138
2.5.2 Determinação da biomassa	138
2.5.3 Determinação de açúcares redutores	138
2.5.4 Determinação do EPS	138
2.5.5 Determinação da viscosidade	139
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	139
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	140
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO	140
3.2 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	141
3.3 ENSAIOS PRELIMINARES	141
3.4 EFEITOS DA RAZÃO C/N	144
3.5 VISCOSIDADE PARA DIFERENTES RAZÕES C/N	148
3.6 VISCOSIDADE PARA DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO	153
3.7 AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO PS UTILIZANDO AMM OU EL (C/N 20)	155
4 CONCLUSÕES	160
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161
CAPÍTULO IV	167
CONCLUSÃO GERAL	169
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	171

CAPÍTULO V	173
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	175
APÊNDICE	187
ANEXO	199

CAPÍTULO I

RESUMO

O presente trabalho propõe a utilização de coprodutos agroindustriais visando produzir ácido láctico (AL) e exopolissacarídeos (EPS), a partir do cultivo de bactérias ácido lácticas (BAL) e diazotróficas, respectivamente. Na produção de AL foram utilizadas oito cepas de *Lactobacillus*, sendo: *L. rhamnosus* INCQS 00223, *L. fermentum* INCQS 00224, *L. helveticus* INCQS 00227, *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, *L. acidophilus* INCQS 00076, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035, *L. leichmanii* INCQS 00008 e *L. plantarum* INCQS 00007. Estas foram cultivadas utilizando glicose (padrão), glicerol residual (GR) e permeado de soro (PS) como fonte de carbono, a fim de escolher a bactéria e a fonte de carbono mais promissoras quanto à produção de AL. As oito cepas cresceram em meio com PS tanto quanto cresceram em meio com glicose, sendo que o crescimento em meio com GR foi reduzido. *L. plantarum* INCQS 00007 e PS foram a bactéria e a fonte de carbono escolhidas, respectivamente, para serem utilizadas em um delineamento *Plackett Burman* (PB) para determinar os efeitos dos componentes do meio, temperatura e agitação na produção do AL. O PS, o extrato de carne (EC) e a temperatura foram os parâmetros que apresentaram efeito significativo ($p < 0,10$), sendo observado um aumento na concentração do AL de $16,7 \pm 0,4$ para $29,04 \pm 1,44$ g L⁻¹ na melhor condição do PB (40 g L⁻¹ PS, 20 g L⁻¹ EC, 20 g L⁻¹ peptona, 5 g L⁻¹ acetato de sódio, 1,5 g L⁻¹ Tween 80, 0,05 g L⁻¹ sulfato de manganês, sem agitação, na temperatura de 32 °C) quando comparado com o meio inicial utilizado na seleção. Pôde-se ainda observar que quantidades expressivas de lactose não foram consumidas em muitos ensaios, fato possivelmente associado à inibição do crescimento microbiano pela acidificação do meio. Em razão disto, avaliou-se o ajuste do pH do meio ao longo do cultivo, resultando no consumo total do substrato pela bactéria, alcançando $39,35 \pm 1,40$ g L⁻¹ de AL mantendo as mesmas condições de cultivo. O aumento da concentração do PS foi avaliado (60, 80, 120 e 160 g L⁻¹), bem como a batelada alimentada, totalizando 120 g L⁻¹ com as alimentações. O maior fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi de $0,95 \pm 0,03$ g g⁻¹ ao utilizar 60 g L⁻¹ de PS na batelada simples, correspondendo a $50,30 \pm 0,89$ g L⁻¹ de AL. Para produção do EPS por *Mesorhizobium loti* Semia 816, PS foi utilizado como fonte de carbono. Ensaios preliminares indicaram o ajuste do pH inicial e a razão C/N como fatores importantes na produção e viscosidade. Em cultivos com ajuste do pH inicial em 7,0 a influência da razão C/N foi avaliada (96,5, 60, 40, 20 e 10), sendo encontrada uma maior concentração de EPS ($4,03 \pm 0,04$ g L⁻¹) com C/N 20 e viscosidade até mesmo superior à fonte de carbono padrão na razão C/N 96,5. Nestas duas razões C/N, avaliou-se a substituição do extrato de levedura (EL) por água de maceração de milho (AMM) ou nitrato, entretanto os valores de EPS obtidos foram inferiores àquele obtido com EL. O incremento da concentração de PS de 10 g L⁻¹ para 20 g L⁻¹ com EL como fonte de nitrogênio e C/N 20 incrementou a produção de EPS para $8,21 \pm 0,29$ g L⁻¹, correspondendo a um $Y_{P/S}$ de $0,50 \pm 0,02$ g g⁻¹, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) da concentração de 30 g L⁻¹ ($9,46 \pm 0,80$ g L⁻¹), observando-se um comportamento pseudoplástico para ambas as soluções de EPS (1 % m v⁻¹).

Palavras chave: Bactérias Ácido Lácticas. Bactérias Diazotróficas. Glicerol Residual. Água de Maceração de Milho. Permeado de Soro. Comportamento reológico.

BIOCONVERSION OF WHEY PERMEATE IN LACTIC ACID AND EXOPOLYSACCHARIDES BY BACTERIA

ABSTRACT

The present work proposes the use of agroindustrial coproducts to produce lactic acid (LA) and exopolysaccharides (EPS), from the cultivation of lactic acid bacteria (LAB) and diazotrophic bacteria, respectively. In the production of LA, eight strains of *Lactobacillus* were used: *L. rhamnosus* INCQS 00223, *L. fermentum* INCQS 00224, *L. helveticus* INCQS 00227, *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, *L. acidophilus* INCQS 00076, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035, *L. leichmanii* INCQS 00008 and *L. plantarum* INCQS 00007. These were cultivated using glucose (standard), residual glycerol (RG) and whey permeate (WP) as the carbon source, in order to select the most promising microorganism and carbon source for LA production. The eight strains grew in medium with WP as much as they grew in medium with glucose, and growth in RG medium was reduced. *L. plantarum* INCQS 00007 and WP were the bacteria and carbon source chosen, respectively, to be used in a Plackett Burman (PB) design to determine the effects of medium components, temperature and agitation on LA production. WP, meat extract (ME) and temperature were the parameters that showed a significant effect at a 90% confidence level, with an increase in LA concentration from 16.7 ± 0.4 to 29.04 ± 1.44 g L⁻¹ in the best condition of PB (40 g L⁻¹ WP, 20 g L⁻¹ ME, 20 g L⁻¹ peptone, 5 g L⁻¹ sodium acetate, 1.5 g L⁻¹ Tween 80, 0.05 g L⁻¹ manganese sulfate, without stirring, at 32 °C) when compared to the initial medium used in the selection. It was also possible to observe that significant amounts of lactose were not consumed in many trials, possibly associated to the inhibition of microbial growth by acidification of the medium. As a result, the pH adjustment of the medium throughout the cultivation was evaluated, resulting in the total consumption of the substrate by the microorganism, reaching 39.35 ± 1.40 g L⁻¹ of LA maintaining the same cultivation conditions. The increase of WP concentration was evaluated (60, 80, 120 and 160 g L⁻¹), as well as the fed batch, totaling 120 g L⁻¹ with the feeding. The highest substrate to product conversion factor ($Y_{P/S}$) was 0.95 ± 0.03 g g⁻¹ when using 60 g L⁻¹ of WP in the batch cultivation, corresponding to 50.30 ± 0.89 g L⁻¹ of LA. For EPS production by *Mesorhizobium loti* Semia 816, WP was used as carbon source. Preliminary tests indicated the initial pH adjustment and the C/N ratio as important factors in the production and viscosity. In cultures with initial pH adjustment at 7.0 the influence of C/N ratio was evaluated (96.5, 60, 40, 20 and 10), with a higher concentration of EPS (4.03 ± 0.04 g L⁻¹) with C/N 20 and viscosity even higher than the standard carbon source with C/N ratio of 96.5. In these two C/N ratios, the substitution of yeast extract (YE) by corn steep liquor (CSL) or nitrate was evaluated, however the EPS values obtained were lower than that obtained with YE. The increase in WP concentration from 10 g L⁻¹ to 20 g L⁻¹ with YE as a source of nitrogen and C/N 20 increased EPS production to 8.21 ± 0.29 g L⁻¹, corresponding to a $Y_{P/S}$ of 0.50 ± 0.02 g g⁻¹, not differing significantly ($p > 0.05$) from the concentration of 30 g L⁻¹ (9.46 ± 0.80 g L⁻¹), observing a pseudoplastic behavior for both EPS solutions (1 % m v⁻¹).

Keywords: Lactic Acid Bacteria. Diazotrophic Bacteria. Crude Glycerol. Corn Steep Liquor. Whey Permeate. Rheological behavior.

1 INTRODUÇÃO

Dentre as medidas estratégicas que vêm sendo adotadas pelas empresas do setor agroindustrial destaca-se a pesquisa e o desenvolvimento de processos alternativos para a obtenção de produtos de interesse comercial, que possam aumentar a competitividade das mesmas, garantindo a estabilidade socioeconômica. Insere-se neste cenário, o aproveitamento de coprodutos como matérias-primas de processos de base tecnológica com geração de novos produtos de elevado valor de mercado.

Neste contexto, o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, tem se dedicado ao uso do glicerol residual (GR) oriundo da produção do biodiesel como fonte de carbono no cultivo de micro-organismos. Machado Jr. et al. (2015) utilizaram o GR no cultivo de *Yarrowia lipolytica* avaliando a aeração, agitação, parâmetros de crescimento e conteúdo lipídico. Spier, Buffon e Burkert (2015) avaliaram a capacidade de acúmulo de lipídios de 12 diferentes leveduras. Trindade, Munhoz e Burkert (2015) utilizaram GR no cultivo de diferentes bactérias com o objetivo de produzir polissacarídeos extracelulares. Ribeiro (2015) estudou a produção e caracterização de exopolissacarídeos (EPS) a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meio à base de GR, e Oliveira (2017) estudou a caracterização do EPS produzido pela bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816 utilizando GR como fonte de carbono.

Por outro lado, o permeado de soro (PS) emerge como coproduto do setor lácteo. De acordo com Zoccal (2016), 11 bilhões de litros de leite por ano são transformados em queijo no país, o que corresponde a 46% da produção do leite, sem considerar a produção informal. O PS é obtido quando o soro de queijo é submetido à ultrafiltração para concentrar as proteínas, onde as proteínas remanescentes, juntamente com a lactose, sais minerais e vitaminas, ultrapassam a membrana para o permeado (ZACARCHENCO et al., 2012), podendo constituir uma fonte de carbono promissora para cultivos microbianos.

O ácido láctico (AL) é um composto bastante versátil, amplamente empregado na indústria química, farmacêutica, têxtil e de alimentos (COELHO et al., 2011; DATTA et al., 1995; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010; YU et al., 2008); sendo nesta última usado como acidulante e conservante de bebidas e alimentos (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010). Na literatura, as bactérias ácido lácticas (BAL) são mencionadas como produtoras de AL (KWAN; HU; LIN, 2016), e a sua capacidade de produção por *Lactobacillus* a partir de coprodutos agroindustriais tem sido avaliada com o uso do melaço (COELHO et al. 2011; OLIVEIRA et al., 2009), soro de leite (BERNARDO et

al., 2016; PANESAR et al., 2010), GR (PRADO-PALOMO et al., 2012, RIVADI et al., 2013) e PS (FITZPATRICK; AHRENS; SMITH, 2001; PAULI; FITZPATRICK, 2002).

De acordo com Ribeiro e Burkert (2016), EPS produzidos a partir de bactérias diazotróficas possuem grande possibilidade de serem utilizados em aplicações industriais, o que tem levado a intensivos estudos dos parâmetros do processo relacionados à sua obtenção e caracterização. Na literatura, o uso de coprodutos é mencionado, tais como farelo de arroz (DEVI; VIJAYENDRA; SHAMALA, 2012), soro do leite (ZHOU et al., 2014), água residuária de indústria de pescados (SELLAMI et al., 2015) e GR (RIBEIRO, 2015; OLIVEIRA, 2017). Ressalta-se, ainda, que não há na literatura trabalhos que utilizem o PS como fonte de carbono na produção de EPS por bactérias diazotróficas.

De acordo com acima exposto, o presente trabalho visou explorar o potencial de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Mesorhizobium* em assimilar coprodutos agroindustriais, PS em particular, com a finalidade de produzir AL e EPS, respectivamente, bioprodutos de alto valor agregado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Explorar o potencial de bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Mesorhizobium* em assimilar coprodutos agroindustriais, PS em particular, com a finalidade de produzir AL e EPS, respectivamente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o inóculo das diferentes cepas de *Lactobacillus*, a fim de garantir a reprodutibilidade dos cultivos;
- Escolher a cepa de *Lactobacillus* mais promissora para produção de AL utilizando o PS ou GR como fonte de carbono em substituição à glicose;
- Verificar o efeito de diferentes variáveis na produção de AL por *L. plantarum* INCQS 00007, buscando maximizar sua produção;
- Avaliar a influência da razão C/N na produção de EPS por *M. loti* Semia 816, bem como diferentes fontes de nitrogênio e concentração de PS;
- Avaliar o comportamento reológico dos EPS produzidos em diferentes condições de cultivo.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 COPRODUTOS INDUSTRIAIS NO CULTIVO DE MICRO-ORGANISMOS

Em cultivo de micro-organismo, o sucesso do processo depende muito do meio de cultivo utilizado, sendo que as fontes de carbono geralmente utilizadas em cultivos de micro-organismos são carboidratos como a glicose (KWAN; HU; LIN, 2016; LIU et al., 2010) e a sacarose (CASTELLANE et al., 2017; MORETTO et al., 2015), e como fonte de nitrogênio utiliza-se geralmente o extrato de levedura (CASTELLANE et al., 2017; TRINDADE; MUNHOZ; BURKERT, 2015). Levando em consideração o aspecto econômico, a maior preocupação é com a fonte de carbono, pois sua concentração é sempre superior à fonte de nitrogênio nos meios de cultivo. Neste contexto, as matérias primas utilizadas incidem diretamente nos custos do processo, sendo que uma possível estratégia para redução destes custos seria o uso de substratos alternativos, como coprodutos e resíduos agroindustriais de indústrias alimentícias, contribuindo também para a redução da poluição ambiental e para a valorização econômica destes materiais (COSTA; NITSCHKE; CONTIERO, 2008).

3.1.1 Permeado de soro

O permeado de soro (PS) é um coproduto da indústria de laticínios, resultante da ultrafiltração do soro no processo para concentrar as proteínas, visando à obtenção de concentrado proteico (ZACARCHENCO et al., 2012; RUSSO, 2016). Seu teor em sais minerais é em torno de 8 %, sendo rico em nutrientes como cálcio, fósforo, potássio e sódio, contém de 3-8 % de proteínas, não contém gordura pois fica retida na membrana, e destaca-se pela alta concentração de lactose, sendo esta de no mínimo 85 % (SOORO, 2018).

Pode ser utilizado em diversos produtos tanto para alimentação humana quanto para alimentação animal, podendo ser aplicado em produtos cárneos, lácteos, panificação, sorvetes, ração animal, entre outros (SOORO, 2018). Sua aplicação está começando a crescer, pois além de ser rico em nutrientes apresenta um custo bastante acessível (R\$ 2,2 por kg) (RUSSO, 2016), mas se por um lado possui grande quantidade de nutrientes por outro lado possui elevada taxa de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica de oxigênio (DBO). No caso de seu aproveitamento, permite agregar valor a um material que

possivelmente geraria custos com tratamento de efluentes (RUSSO, 2016), além de agregar valor à cadeia produtiva do leite.

3.1.2 Glicerol residual

O glicerol puro é amplamente utilizado na indústria de cosméticos, alimentos, farmacêutica, têxtil e como matéria-prima de produtos químicos (SILVA, MACK; CONTIERO, 2009).

Já o glicerol residual (GR) possui baixo valor agregado. Com o avanço do Programa Nacional do Biodiesel, havendo a obrigatoriedade de adição do biodiesel ao diesel, a produção do biodiesel em 2017 foi de 4,2 bilhões de litros, sendo a produção estimada para 2020 de 14,3 bilhões (PNPB, 2018), resultando assim em crescentes quantidades de GR, pois o mesmo é o principal coproduto da reação de transesterificação (cerca de 10 %) (ABAD; TURON, 2012). Como contém impurezas como triacilgliceróis, metanol ou etanol não convertidos, entre outros (AMARAL et al., 2009), para ser utilizado na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, precisa passar por um processo de purificação, o qual é um processo de alto custo, tornando-se muitas vezes inviável. Sendo assim, o destino a ser dado ao GR é um aspecto importante a ser considerado, com a finalidade de buscar alternativas para o seu aproveitamento, evitando o seu acúmulo.

3.1.3 Água de maceração de milho

De acordo com a Abmilho (2018), a produção mundial de milho no ano de 2017 foi em torno de 29 milhões de toneladas, superior a produção do ano de 2016, que foi em torno de 22 milhões de toneladas.

A água de maceração de milho (AMM) é um coproduto do processamento do milho, ou seja, é a água de lavagem e embebição dos grãos quando do fracionamento em amido e germe (óleo), contém aproximadamente 40 % de sólidos totais e constitui uma potencial fonte de nitrogênio no crescimento de micro-organismos, contribuindo também para o fornecimento de outros nutrientes importantes para o metabolismo microbiano (SOBRINHO, 2007), pois contém cálcio, magnésio e potássio, entre outros, baixa concentração de carboidratos e baixo teor de gordura (CARDINAL; HEDRICK, 1947; AKHTAR et al, 1997).

3.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) são subdivididas em 13 gêneros, incluindo: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (PATRICK, 2012). Alguns parâmetros utilizados nesta subdivisão são: a morfologia, o modo como fermentam a glicose e a temperatura de crescimento. De um modo geral, as BAL possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes, são Gram-positivas, não formadoras de esporos, possuem formato de cocos ou hastes e produzem ácido láctico (AL) através da fermentação de carboidratos (KHALID, 2011).

Diferentemente dos micro-organismos aeróbios, que toleram níveis de oxigênio até mesmo superiores aos da atmosfera, os microaerófilos, como é o caso das BAL, requerem baixas concentrações desse elemento, não tolerando o presente no ar atmosférico, sendo o crescimento mais acentuado em níveis de 1 a 15 % (PELCZAR Jr; CHAN; KRIEG, 1996). A temperatura ótima de crescimento pode variar de 20 a 45 °C (WOOD; HOLZAPFEL, 1995; PANESAR et al., 2007) e o pH de 5,5 a 6,5, sendo inibidas a valores de pH abaixo de 4,5 (PANESAR et al., 2007).

São micro-organismos fastidiosos que requerem complexos nutrientes para seu crescimento, tais como vitaminas do complexo B, minerais específicos e diversos aminoácidos (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009; STANIER, 1986). O meio de cultivo *Man, Rogosa e Sharp* (MRS) tem sido frequentemente utilizado no cultivo destas bactérias (BERNARDO et al., 2016; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010) por ser um meio bastante completo, contendo os nutrientes necessários para o seu crescimento.

3.2.1 Gênero *Lactobacillus*

Taxonomicamente, *Lactobacillus* pertencem ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae* (AUAD, 2014). Dentre os treze gêneros que compreendem as BAL, *Lactobacillus* é o maior, com mais de 125 espécies e subespécies conhecidas, sendo reconhecidas como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000; PANESAR et al., 2007). Algumas cepas possuem papel fundamental na produção e preservação de alimentos, além de possuírem propriedades probióticas (HUYS et al., 2006). Sendo assim, são largamente utilizadas na

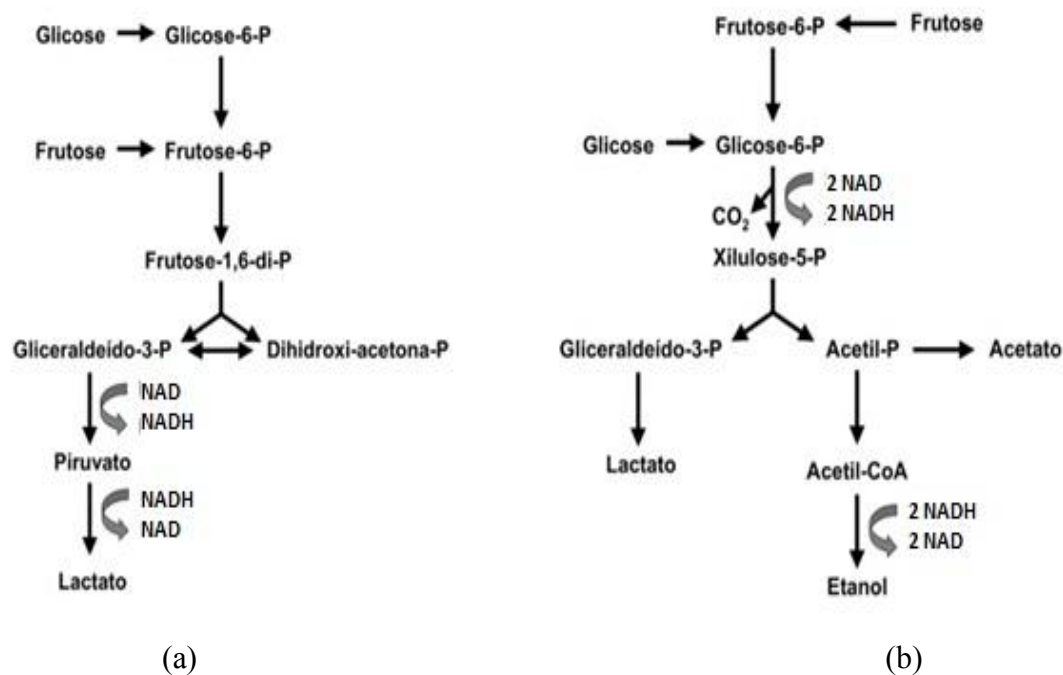
indústria de alimentos, em particular em produtos lácteos (BOGAERT, 1997; LAVARI et al., 2015).

Diversos estudos têm abordado a substituição da glicose, presente no meio MRS (LIU et al., 2010; MUSSATO et al., 2008), por coprodutos agroindustriais, como o glicerol oriundo do biodiesel (RIVALDI et al., 2013), PS (FITZPATRICK; AHRENS; SMITH, 2001; FITZPATRICK; O'KEEFFE, 2001; LAVARI et al., 2015) e soro de leite (BERNARDO et al., 2016), com a finalidade de avaliar a capacidade destas bactérias em assimilar estes coprodutos. A Tabela 1 apresenta informações a respeito das condições utilizadas no crescimento celular de diferentes *Lactobacillus*.

3.2.2 Bactérias homofermentativas e heterofermentativas

As BAL são conhecidas como produtoras de AL e agrupadas em homofermentativas e heterofermentativas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002), sendo as respectivas vias metabólicas mostradas na Figura 1.

Figura 1 - Representação simplificada das vias do metabolismo (a) homofermentativo e (b) heterofermentativo de bactérias do gênero *Lactobacillus*



Fonte: GOMES (2009)

Tabela 1 - Condições de cultivo utilizadas no crescimento de diferentes *Lactobacillus*

	Fonte de carbono	T (°C)	Agitação (rpm)	pH inicial	Tipo de reator	Outras informações	Biomassa (g L ⁻¹)	Referência
<i>L. acidophilus</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. delbrueckii</i>	GR (10 g L ⁻¹)	37	100	6,0	<i>Shaker</i>	-	2,11 2,06 1,36	RIVALDI et al. (2013)
<i>L. plantarum</i>	Glicose (100 g L ⁻¹)	55	95	6,8	Fermentador	Broto de malte (16 g L ⁻¹) Milhocina (12 g L ⁻¹)	14,19	LIU et al. (2010)
<i>L. rhamnosus</i>	PS (aprox. 29 g L ⁻¹)	37	250	6,8	Fermentador	Anaerobiose Aerobiose	3,05 2,82	LAVARI et al. (2015)
<i>L. rhamnosus</i>	Soro de leite (500 g L ⁻¹)	37	200	6,2	Fermentador	Milhocina (7,5%)	10,37	BERNARDO et al. (2016)
<i>L. helveticus</i>	PS (aprox. 100 g L ⁻¹)	42	NM	5,4	Fermentador	Proteína hidrolisada de soro leite (3%) Proteína hidrolisada de soro leite (4%)	Aprox. 1,8 Aprox. 3,1	FITZPATRICK; O'KEEFFE, (2001)
<i>L. delbrueckii</i>	Glicose (57,8 g L ⁻¹) e celobiose (7,5 g L ⁻¹)	37	NM	6,0	<i>Shaker</i>	-	2,15	MUSSATO et al. (2008)
<i>L. casei</i>	PS (aprox. 50 g L ⁻¹)	NM	NM	5,4	Fermentador	EL (0,3%) MnSO ₄ .H ₂ O (0,005%)	Aprox. 3,4	FITZPATRICK; AHRENS; SMITH, (2001)
<i>L. casei</i>	Glicose (20 g L ⁻¹)	37	NM	5,5 e 6,5	<i>Shaker</i>	-	2,6	KWAN; HU; LIN (2016)

GR: glicerol residual; PS: permeado de soro; EL: extrato de levedura; NM: não mencionado

As BAL homofermentativas metabolizam a glicose via frutose 6-fosfato para produzir mais de 85% de AL, já as heterofermentativas metabolizam a glicose para produzir cerca de 50% de AL e produzem outras substâncias, como dióxido de carbono, ácido acético e etanol (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; REDDY et al., 2008). Por este motivo, as BAL heterofermentativas são bastante utilizadas em alimentos pela capacidade de produzir compostos flavorizantes, mais do que sua habilidade acidificante, pois convertem hexoses e pentoses em substâncias aromáticas, como aldeídos e diacetil (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

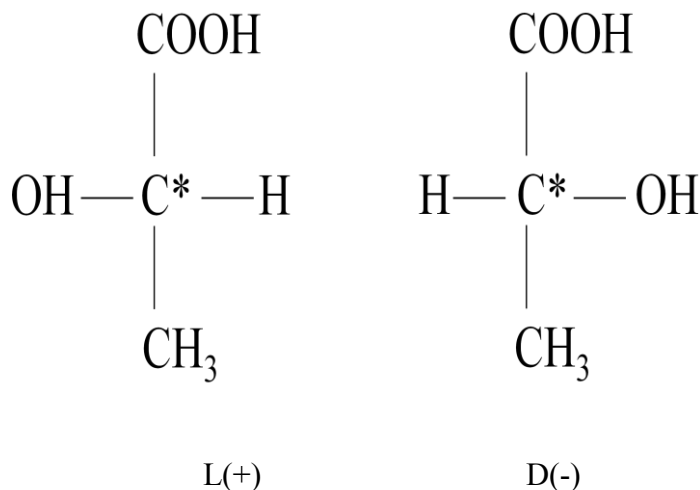
Dentre os *Lactobacillus* classificados como homofermentativos, tem-se *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus* e *L. acidophilus*. Dentre os classificados como heterofermentativos tem-se: *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. kefir* e *L. reuteri* (CURRY; CROW, 2003).

3.3 ÁCIDO LÁTICO

O AL foi descoberto e isolado do leite coalhado, em 1780, pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele (BENNINGA, 1990; LI; CUI, 2010; WEE; KIM; RYU, 2006). Lavoisier, em 1789, considerou o AL um componente do leite mas somente em 1857 Pasteur descobriu não ser um componente do leite e, sim, um metabólito da fermentação de micro-organismos (BENNINGA, 1990; WEE; KIM; RYU, 2006). O AL ocorre naturalmente na forma de dois isômeros óticos, D(-) e L(+), conforme Figura 2, sendo a forma L(+) a utilizada na alimentação, pois o corpo humano é capaz de assimilar somente este isômero (VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN, VIRUTHAGIRI, 2008).

O AL é um composto muito utilizado como acidulante e conservante de bebidas e alimentos, sendo também utilizado, além da indústria de alimentos, na indústria química, farmacêutica e têxtil (LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010). É classificado como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) como aditivo alimentar pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (DATTA et al., 1995), sendo utilizado com aromatizante, regulador do pH, em carnes processadas, indústria de aves para aumentar a vida útil, melhorar o sabor e controlar patógenos, podendo também ser utilizado como acidulante em saladas e conservante de bebidas (WEE; KIM; RYU, 2006).

Figura 2 - Fórmula molecular dos isômeros D(-) e L(+) ácido láctico (C* carbono assimétrico)



Fonte: VIJAYAKUMAR; ARAVINDAN, VIRUTHAGIRI (2008)

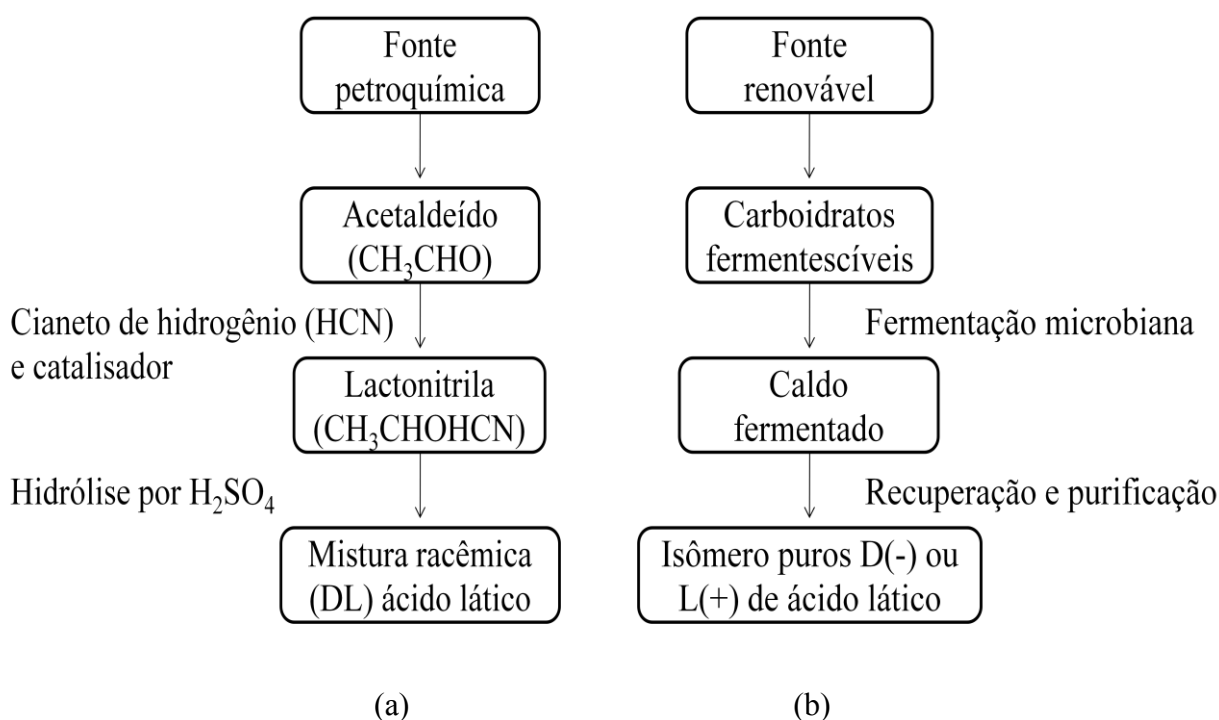
A estimativa da demanda de AL para 2020 é de 600.000 toneladas (DUSSELIÉ et al., 2013), sendo que em 2017 foi de 367.300 toneladas (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013), evidenciando assim um aumento mundial na utilização deste insumo.

3.3.1 Ácido láctico: síntese química e fermentativa

Mundialmente, 90% do AL é produzido via fermentativa e os 10% restantes por síntese química (HOFVENDAHL; HAHN-HADERDAL, 2000; ZHOU et al., 2006). Na síntese química, o AL é obtido através da reação entre acetaldeído e cianeto de hidrogênio, utilizando um catalisador à alta pressão, onde a lactonitrila é formada, purificada por destilação e hidrolisada com ácido sulfúrico, sendo produzida uma mistura racêmica de DL-ácido láctico (Figura 3a). Na síntese do AL via fermentação (Figura 3b), onde se pode utilizar fontes renováveis, os açúcares simples como glicose, lactose e sacarose são diretamente fermentados por micro-organismos. Caso contrário, é necessário uma hidrólise enzimática ou um pré-tratamento do substrato, a fim de torná-lo disponível e, então, o caldo fermentado é recuperado e purificado para obter um isômero puro, D(-)-ácido láctico ou L(+)-ácido láctico (Figura 1b) (LI; CUI, 2010; HOFVENDAHL; HAHN-HADERDAL, 2000; WEE; KIM; RYU, 2006).

Pode-se também utilizar matérias primas de baixo custo em processos biotecnológicos para obtenção de AL, com vantagens significativas em comparação à síntese química (CAPELLARI, 2010), pois tendem a diminuir custos do processo, além de agregar valor a coprodutos e evitar um possível descarte inadequado.

Figura 3 - Produção do AL por (a) síntese química e (b) fermentação microbiana



Fonte : adaptado de WEE; KIM; RYU (2006)

Diversos estudos têm abordado a produção de AL utilizando a glicose como fonte de carbono (HUJANEN; LINKO, 1996; HUJANEN et al., 2001; KWAN; HU; LIN, 2016), sendo a biotransformação de coprodutos em AL investigada utilizando melaço (COELHO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009), soro de leite (BERNARDO et al., 2016; PANESAR et al., 2010), PS (FITZPATRICK; AHRENS; SMITH, 2001; FITZPATRICK; O'KEEFFE, 2001; PAULI; FITZPATRICK, 2002) e GR (PRADO-PALOMO, 2012). Também são mencionados trabalhos utilizando uma mistura de glicose e xilose (ZHANG; VADLANI, 2015) e glicose e celobiose (MUSSATO et al., 2008). A Tabela 2 apresenta um levantamento de condições de cultivo utilizadas na produção do AL por diferentes *Lactobacillus*.

Tabela 2 - Condições de cultivo para produção de AL por diferentes *Lactobacillus*

	Fonte de carbono	T (°C)	Agitação (rpm)	pH	Tipo de reator	Outras informações	AL (g L ⁻¹)	Referência
<i>L. casei</i>	Melaço (100 g L ⁻¹)	37	100	6,2	<i>Shaker</i>	EL (20 g L ⁻¹) e peptona (20 g L ⁻¹)	58,86	OLIVEIRA et al. (2009)
<i>L. casei</i>	PS (55 g L ⁻¹)	38	NM	5,4	Fermentador	<i>Malt combing nuts</i> (50 g L ⁻¹) e EL (10 g L ⁻¹)	Aprox. 50	PAULI; FITZPATRICK (2002)
<i>L. casei</i>	Glicose (20 g L ⁻¹)	37	NM	5,5-6,5	<i>Shaker</i>	-	15,5	KWAN; HU; LIN (2016)
<i>L. casei</i>	Soro de leite (35 g L ⁻¹)	37	Sem agitação	6,5	<i>Shaker</i>	Apresentado melhor resultado no pH, temperatura e agitação	33,73	PANESAR et al. (2010)
<i>L. casei</i>	Glicose (70 g L ⁻¹)	37	150	NM	<i>Shaker</i>	Testadas as temperaturas de 30, 37, 41 e 45 °C, sendo apresentados os melhores resultados	80	HUJANEN; LINKO (1996)
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	Glicose (70 g L ⁻¹)	45	150	NM	<i>Shaker</i>		75	
<i>L. casei</i>	Glicose (100 g L ⁻¹)	37	150	NM	<i>Shaker</i>	EL (2,2 g L ⁻¹)	92	HUJANEN; LINKO (1996)
						Broto de malte (2,2 g L ⁻¹)	88	
						Peptona (2,2 g L ⁻¹)	79	
						Extrato de grama (2,2 g L ⁻¹)	74	
						Milhocina (2,2 g L ⁻¹)	59	
<i>L. casei</i>	PS (aprox. 50 g L ⁻¹)	NM	NM	5,4	Fermentador	EL (30 g L ⁻¹) MnSO ₄ .H ₂ O (0,05 g L ⁻¹)	Aprox. 42	FITZPATRICK; AHRENS; SMITH (2001)
<i>L. casei</i>	Glicose (80 g L ⁻¹)	37	200	6,3	Fermentador	Broto de malte (53,8 g L ⁻¹) suplementado com EL (4 g L ⁻¹)	68	HUJANEN et al. (2001)
	Glicose (100 g L ⁻¹)						80	
	Glicose (130 g L ⁻¹)						100	
	Glicose (160 g L ⁻¹)						118,6	

Tabela 2 - Condições de cultivo para produção de AL de diferentes *Lactobacillus*, continuação

<i>L. casei</i>	Glicose (100 g L ⁻¹)	37	200	6,3	Fermentador	EL (22 g L ⁻¹) Broto de malte (53,8 g L ⁻¹) suplementado com EL (4 g L ⁻¹)	95,3 98,8	HUJANEN et al. (2001)
<i>Lactobacillus</i> sp <i>L. rhamnosus</i>	GR (211,17 mm)	37	NM	NM	Fermentador	-	46,23 mM 27,73 mM	PRADA- PALOMO et al. (2012)
<i>L. rhamnosus</i>	Soro de leite (500 g L ⁻¹)	37	200	6,2	Fermentador	Milhocina (75 g L ⁻¹)	143,7	BERNARDO et al. (2016)
<i>L. helveticus</i>	PS (aprox. 100 g L ⁻¹)	42	NM	5,4	Fermentador	Proteína hidrolisada de soro de leite (30-40 g L ⁻¹)	Aprox. 100	FITZPATRICK; O'KEEFFE (2001)
<i>L. plantarum</i>	Glicose (100 g L ⁻¹)	55	95	6,8	Fermentador	Broto de malte (16 g L ⁻¹) Milhocina (12 g L ⁻¹)	66,9	LIU et al. (2010)
<i>L. plantarum</i>	Melaço (193,5 g L ⁻¹)	35	150	6,0	<i>Shaker</i>	Milhocina (37,5 mL L ⁻¹)	94,8	COELHO et al. (2011)
<i>L. brevis</i> <i>L. plantarum</i>	Glicose (25,5 g L ⁻¹) e xilose (8,7 g L ⁻¹)	37	100	6,5	<i>Shaker</i>	-	17,2 24,3	ZHANG; VADLANI (2015)
<i>L. delbrueckii</i>	Glicose (57,8 g L ⁻¹) e celobiose (7,5 g L ⁻¹)	37	NM	6,0	<i>Shaker</i>	-	35,54	MUSSATO et al. (2008)

PS: permeado de soro; EL: extrato de levedura; GR: glicerol residual; NM: não mencionado

3.4 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

As bactérias diazotróficas são também chamadas de bactérias fixadoras de nitrogênio, pois convertem através do processo de oxidoredução o nitrogênio atmosférico (N_2) em uma forma assimilável pela célula, amônia (NH_3), sendo este processo chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (MONTEIRO et al., 2012; RIBEIRO; BURKERT, 2016; SUTHERLAND, 1982). São também capazes de sintetizar e secretar exopolissacarídeos (EPS) durante este processo e dentre elas destacam-se as bactérias da ordem *Rhizobiales*, conhecida como Rizóbios, os quais vivem em simbiose com plantas da família das leguminosas, como feijão e soja. As bactérias vivem dentro dos nódulos formados nas raízes das plantas e, através de suas enzimas nitrogenases, transformam o nitrogênio atmosférico e fornecem para as plantas compostos nitrogenados. Em contrapartida, as bactérias utilizam os carboidratos produzidos pela fotossíntese do organismo hospedeiro, como fonte de energia (VARGAS et al., 2004; RIBEIRO, 2015; MONTEIRO, 2011).

Os Rizóbios são representados pelas bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, bactérias Gram-negativas, aeróbias, capazes de produzir desde homopolissacarídeos, como simples glicanas, até heteropolissacarídeos complexos (MONTEIRO et al., 2012; RIBEIRO, 2015; RIBEIRO; BURKERT, 2016). Dentre os biopolímeros produzidos por essas bactérias, tem-se succinoglicanas, poliglicuranas e glicanas cíclicas, sendo estes constituídos por D-glicose, D-galactose e ácido D-glicurônico, contendo ou não piruvato, sendo este último geralmente ligado às ramificações e grupos O-acetil (MONTEIRO et al., 2012).

A fonte de carbono mais comumente utilizada no cultivo destas bactérias é o manitol (FERNANDES Jr. et al., 2010; PRIYANKA et al., 2015; RAZIKA et al., 2012), mas diversos estudos têm abordado a substituição do manitol por outras fontes de carbono, como sacarose (CASTELLANE; LEMOS, 2007; CASTELLANE; LEMOS; LEMOS, 2014; CASTELLANE et al., 2015; CASTELLANE et al., 2017; MORETTO et al., 2015, RAZIKA et al., 2012), glicerol (CASTELLANE; LEMOS, 2007), glicose e galactose (CASTELLANE; LEMOS, 2007; RAZIKA et al., 2012) coprodutos agroindustriais como glicerol oriundo do biodiesel (RIBEIRO, 2015; OLIVEIRA, 2017), soro de leite (ZHOU et al., 2014) e farelo de arroz (DEVI; VIJAYENDRA; SHAMALA, 2012) bem como resíduos industriais, por exemplo água residuária de indústria de pescados (SELLAMI et al., 2015).

A Tabela 3 apresenta as condições utilizadas no crescimento celular de diferentes Rizóbios.

Tabela 3 - Condições de cultivo utilizadas no crescimento de diferentes Rizóbios

Bactéria	Fonte carbono	T (°C)	Agitação (rpm)	pH	Tipo de reator	Outras informações	Biomassa (g L ⁻¹)	Referência
<i>Rhizobium tropici</i> Semia 4080	Sacarose (30 g L ⁻¹)	29	140	NM	<i>Shaker</i>	Utilizou-se glicerol no pré-inóculo	1,14	CASTELLANE; LEMOS; LEMOS (2014)
<i>R. tropici</i> MUTZC3							0,75	
<i>R. tropici</i> MUTPA7							0,71	
<i>R. tropici</i> JAB1							0,95	
<i>R. sp.</i> JAB6							0,78	
<i>R. tropici</i> Semia 4077	Sacarose (30 g L ⁻¹)	29	140	NM	<i>Shaker</i>	Utilizou-se glicerol no pré-inóculo	0,92	CASTELLANE et al. (2015)
<i>R. tropici</i> 4077::Z04							0,10	
<i>R. tropici</i> <i>R.sp.</i>	Sacarose (30 g L ⁻¹)	28	150	6,8	<i>Shaker</i>	-	2,57 0,76	MORETTO et al. (2015)
<i>R. tropici</i> Semia 4080	Sacarose (30 g L ⁻¹)	29	140	NM	<i>Shaker</i>	-	1,44	CASTELLANE et al. (2017)
<i>R. tropici</i> MUTZC3	Sacarose (30 g L ⁻¹) e diesel (10 g L ⁻¹)						0,77	
	Sacarose (30 g L ⁻¹)						1,19	
	Sacarose (30 g L ⁻¹) e diesel (10 g L ⁻¹)						0,87	

Tabela 3 - Condições de cultivo utilizadas no crescimento de diferentes Rizóbios, continuação

<i>R. tropici</i> Semia 4077							5,70	
<i>R. leguminosarum</i> Semia 2050							3,60	
<i>Mesorhizobium loti</i> Semia 816	GR (10 g L ⁻¹)	30	200	7,0	Shaker	-	2,41	RIBEIRO (2015)
<i>M. huakuii</i> Semia 4779							4,94	
<i>Bradyrhizobium</i> sp. Semia 929							0,60	
Rizóbio 8.1c	Manitol (10 g L ⁻¹)	28	150	NM*	Shaker	Rizóbios isolados	0,046 0,136 0,203	FERNANDES Jr. (2010)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> MTCC 100	Farelo de arroz (200 g L ⁻¹) Farelo de arroz (400 g L ⁻¹)	30	200	7,0	Shaker	Sacarose no meio (50 g L ⁻¹)	5,92 5,40	DEVI; VIJAYENDRA; SHAMALA (2012)
<i>R. leguminosarium</i> ATCC 10004	Manitol (10 g L ⁻¹) Água residuária da indústria de pescado	30	200	7,0	Shaker	-	2,27 2,80	SELLAMI et al. (2015)

GR: glicerol residual; NM: não mencionado

3.5 EXOPOLISSACARÍDEOS

As primeiras observações sobre a polimerização com formação de polissacarídeos foram descritas por Vauquelin em 1822, em caldo de cana, e somente no ano de 1862 Pasteur relatou que essa polimerização era provocada por micro-organismos (BARBOSA et al., 2004). Na natureza existem plantas e micro-organismos capazes de secretarem estes biopolímeros que podem ser produzidos tanto por fungos, microalgas ou por bactérias, (ARANDA-SELVÉRIO et al., 2010; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008; SUTHERLAND, 1998). Os polissacarídeos produzidos por micro-organismos podem ser classificados de acordo com sua localização na célula: os polissacarídeos citosólicos, que são aqueles que fornecem energia para a célula; os polissacarídeos que compõem a parede celular, incluindo peptideoglicanos e lipopolissacarídeos; e os polissacarídeos que são excretados pela célula para o ambiente extracelular durante ou após o crescimento do micro-organismo, conhecidos como EPS (DONOT et al., 2012; LAHAYE, 2006).

Os EPS secretados por micro-organismos são considerados substitutos ideais aos EPS secretados por plantas, pois estabelecidas as condições de cultivo, apresentam características químicas e físicas constantes, e muitas vezes superiores às gomas naturais (ARANDA-SELVÉRIO et al., 2010; SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008), já que não se encontram expostas a alterações climáticas ou a problemas de colheita (BARRETO et al., 2011).

Há uma alta demanda de EPS de diferentes espécies de bactérias como biopolímeros industriais. Sendo assim, a produção de EPS por micro-organismos tem sido objeto de intensa pesquisa, pelo seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores, devido à grande diversidade de suas propriedades reológicas e estruturais e pelo fato de serem solúveis em água, podendo ser usados como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes, texturizantes e gelificantes (BAJAJ et al., 2006; CANUTO, 2006, BARRETO et al., 2011; MORETTO et al., 2015, HAN et al., 2015). Desta forma, é cada vez mais importante a investigação dos parâmetros envolvidos na produção destes biopolímeros, bem como maneiras de diminuir custos do processo.

Um dos fatores importantes que deve ser investigado no cultivo destes micro-organismos é a razão carbono/nitrogênio (razão C/N), pois a síntese de EPS é muitas vezes favorecida pelo excesso da fonte de carbono e limitação de outro nutriente, que pode ser o nitrogênio (DONOT et al., 2012). Nitschke, Rodrigues e Schinatto (2001) verificaram que, na

produção da goma xantana, meios contendo elevada razão C/N favoreceram o acúmulo do biopolímero, pois a goma é produzida como metabólito secundário, sendo assim a maior concentração de nitrogênio é requerida na fase de crescimento da bactéria. Já na fase de produção do biopolímero, a maior concentração de carbono é necessária, ocorrendo assim acúmulo do produto.

Sutherland (2001) cita que a bactéria *Xanthomonas campestris* produz goma xantana, *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* produzem a goma gelana, *Acetobacter xylinum* produz celulose e *Rhizobium* sp. produz succinoglicana, sendo estas já comercializadas.

3.5.1 Exopolissacarídeos por rizóbios

Dentre os micro-organismos produtores destes biopolímeros há os Rizóbios, que produzem tanto polímeros constituintes da parede celular, os quais ficam aderidos à célula, ou que são excretados para o meio extracelular (LAUS; VAN BRUSSEL; KIJNE, 2005).

Uma grande diversidade na estrutura química de EPS produzidos por Rizóbios pode ser encontrada, sendo que a maioria são heteropolissacarídeos (LAUS, VAN BRUSSEL; KIJNE, 2005). Dentre os Rizóbios produtores de EPS destacam-se as bactérias Gram-negativas dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Brazyrhizobium* (TORTORA, FUNKE; CASE, 2005). Na produção de EPS por bactérias diazotróficas, o custo elevado da fonte de carbono nos meios de cultivo tem impacto direto nos custos de produção, limitando o potencial de mercado do biopolímero. Desta forma, a utilização de coprodutos agroindustriais mostra-se como uma alternativa para minimizar estes custos, como soro de leite (ZHOU et al., 2014), água residual da indústria de pescado (SELLAMI et al., 2015), GR (OLIVEIRA, 2017; RIBEIRO, 2015) e farelo de arroz (DEVI; VIJAYENDRA; SHAMALA, 2012).

O processo de produção do biopolímero pode ser influenciado desde a escolha do micro-organismo até a determinação dos parâmetros do cultivo, como a agitação, temperatura de incubação, tempo de incubação, volume do meio, volume do inóculo, aeração, fonte de carbono e pH, parâmetros que influenciam diretamente a síntese, rendimento e composição do EPS (BARRETO et al., 2011, RIBEIRO, 2015). A Tabela 4 apresenta as condições utilizadas no cultivo destes micro-organismos.

Tabela 4 - Condições de cultivo utilizadas para produção de EPS por diferentes Rizóbios

Bactéria	Fonte carbono	T (°C)	Agitação	pH	Tipo de reator	EPS (g L ⁻¹)	Referência
<i>Rhizobium</i> sp. PRIMM-18	Manitol (10 g L ⁻¹)	32	100	NM	<i>Shaker</i>	2,10	PRIYANKA et al. (2015)
<i>R. radiobacter</i> S10	Soro de leite (100 g L ⁻¹)	30	200	NM	Fermentador	2,83	ZHOU et al. (2014)
<i>R. tropici</i> <i>R. sp.</i>	Sacarose (30 g L ⁻¹)	28	150	6,8	<i>Shaker</i>	3,48 6,63	MORETTO et al. (2015)
<i>R. tropici</i> Semia 4080 <i>R. tropici</i> MUTZC3 <i>R. tropici</i> MUTPA7 <i>R. tropici</i> JAB1 <i>R. sp.</i> JAB6	Sacarose (30 g L ⁻¹)	29	140	NM	<i>Shaker</i>	1,14 0,75 0,71 0,95 0,78	CASTELLANE; LEMO; LEMO (2014)
<i>R. tropici</i> Semia 4080	Sacarose (30 g L ⁻¹)					4,51	
<i>R. tropici</i> MUTZC3	Sacarose (30 g L ⁻¹) + diesel (10 g L ⁻¹)	29	140	NM	<i>Shaker</i>	5,26 4,39 5,52	CASTELLANE et al. (2017)

Tabela 4 - Condições de cultivo utilizadas para produção de EPS por diferentes Rizóbios, continuação

<i>R. tropici</i> Semia 4077						7,45	CASTELLANE et al. (2015)
<i>R. tropici</i> 4077::Z04	Sacarose (30 g L ⁻¹)	29	140	NM*	<i>Shaker</i>	7,67	
<i>R. leguminosarum</i> Semia 344						2,32	RIBEIRO (2015)
<i>Mesorhizobium loti</i> Semia 816	GR (10 g L ⁻¹)	30	200	7,0	<i>Shaker</i>	4,90	
<i>M. huakuii</i> Semia 4779						1,75	
						9,70	
<i>R. leguminosarium</i> ATCC 10004	Manitol (10 g L ⁻¹) Água res. ind. de pescado (50,77 g L ⁻¹ sólidos)	30	200	7,0	<i>Shaker</i>	11,10	SELLAMI et al. (2015)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> MTCC 100	Farelo de arroz (200 g L ⁻¹) Farelo de arroz (400 g L ⁻¹)	30	200	7,0	<i>Shaker</i>	2,01 2,67	
Rizóbio 8.1c	Manitol (10 g L ⁻¹)	28	150	NM	<i>Shaker</i>	0,145	FERNANDES Jr. et al. (2010)
Rizóbio 53.5						0,132	
Rizóbio 30.6a2						0,098	

GR: glicerol residual; NM: não mencionado

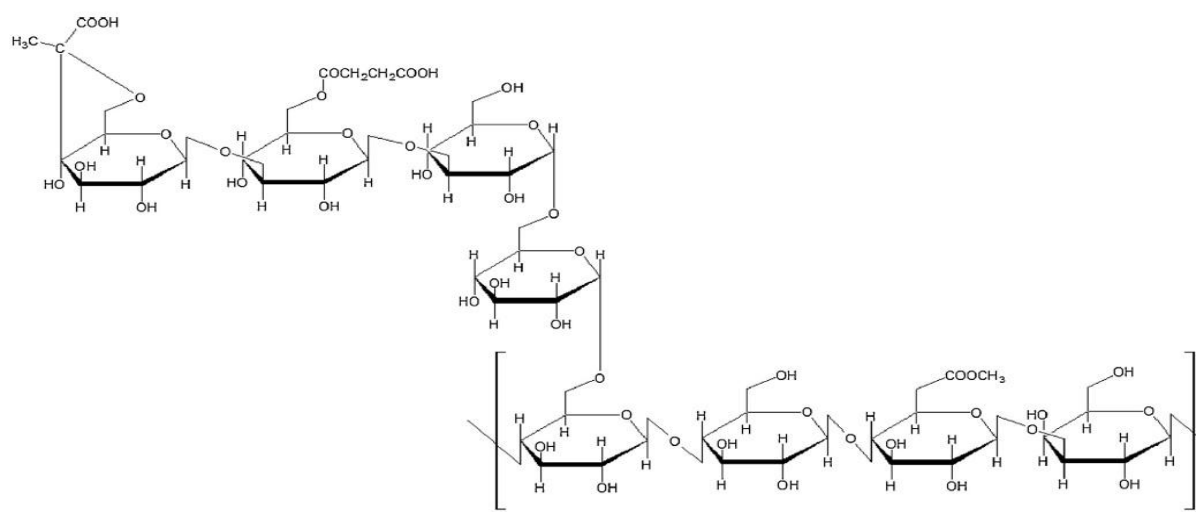
Os EPS são secretados por plantas ou micro-organismos, podendo ser classificados como homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos são constituídos por um único tipo de monossacarídeo, geralmente glicanas neutras, como dextrana ou levana, enquanto os heteropolissacarídeos são constituídos por vários tipos de monossacarídeos, como xantana, gelana ou succinoglicana. Na grande maioria são polianiónicos, devido à presença de ácidos urônicos (ARANDA-SELVÉRIO, 2010; DONOT et al., 2012, LAHAYE, 2006).

O heteropolissacarídeo succinoglicana, apresentado na Figura 4, pode ser produzido pelas bactérias *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, entre outras, apresentando-se como um octassacarídeo, sendo composto por unidades de glicose ligadas à galactose na razão 7:1, podendo conter acetato, piruvato e succinato, possuindo alta ou baixa massa molar, dependendo da bactéria utilizada (RUIZ et al., 2015).

Castellane et al. (2015), ao estudar o EPS produzido por *R. tropici* Semia 4080, utilizando sacarose como fonte de carbono, encontraram 59,59 % de glicose, 31,29 % de galactose, 4,58 % de ácido glicurônico, 3,72 % de ramnose, 0,74 % de manose e 0,08 % de ácido galacturônico. Já Ribeiro (2015), utilizando *M. loti* Semia 816 e GR como fonte de carbono, identificou os componentes majoritários do EPS, encontrando 79,8 % de glicose, 14,4 % de galactose e 5,8 % de manose. Castellane, Lemos e Lemos (2014), ao estudar o EPS produzido por *R. tropici* Semia 4077, utilizando sacarose como fonte de carbono, encontraram 55,48 % de glicose, 32,47 % de galactose, sendo ainda encontrado 8,6 % ácido glicurônico, 2,58% de ramnose, 0,86 % de manose e traços de ácido galacturônico.

De acordo com Oliveira (2017), a composição de ácido urônico de um EPS produzido por *M. loti* Semi 816, utilizando GR como fonte de carbono foi de $3,90 \pm 0,19$ %. Monteiro (2011), ao analisar EPS produzidos por bactérias *Rhizobium* e *Mesorhizobium*, encontrou teores de ácido urônico entre 0,8 e 12,7%. Moretto et al. (2015), ao analisar o EPS produzido por *Rhizobium* EPSLBMP-C04, encontraram 3,57 % de ácido glicurônico, já para *Rhizobium* EPSLBMP-C02 foi encontrado 10% de ácido galacturônico e traços de ácido glicurônico. Ribeiro (2015) relata que micro-organismos de diferentes linhagens ou cultivados em diferentes condições de cultivo produzem EPS com a cadeia principal semelhante, apenas com variações nas ramificações e massa molar. De acordo com Castellane, Lemos e Lemos (2014), a presença de ácidos glicurônico e galacturônico, independente das concentrações, torna o EPS ácido, e sua acumulação torna o heteropolissacarídeo altamente aniônico.

Figura 4 - Estrutura química do heteropolissacarídeo succinoglicana



Fonte: RUIZ et al. (2015)

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 733-740, 2012.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 877-902, 2013.

ABMILHO - **Associação brasileira das indústrias de milho**, 2018. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatisticas/producao-mundial>. Acesso em: 15 de abril de 2018.

AKHTAR, M.; LENTZ, M.J.; BLANCHETTE, R.A.; KIRK, T.K. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **TAPPI Journal**. 80, 161-164, 1997.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

ARANDA- SELVERIO, G.; PENNA, A. L. B.; CAMPOS-SÀ, 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, p. 895-899, 2010.

AUAD, L. I. **Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes***. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BAJAJ, I. B.; SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S.; PANDEY, A. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 150-156, 2006.

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

BARRETO, M. C. S.; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA FILHO, J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 2-4, p. 221-227, 2011.

BENNINGA, H. **A History of lactic acid making**, Kluwer Academic Publishers, 1990. 478 p.

BERNARDO, M. P.; COELHO, L. F.; SASS, D. C.; CONTIERO, J. L. (+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 640-646, 2016.

- BOGAERT, J. C. Production and novel applications of natural L(+) lactic acid: food, pharmaceuticals and biodegradable polymers. **Cerevisia**, n. 22, p. 46– 50, 1997.
- CANUTO, A.P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CAPELLARI, J. B. **Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville, 2010.
- CARDINAL, E.V., HEDRICK, L.R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172, p.609-612, 1947.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.; 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.
- CASTELLANE, T. C.T; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.
- 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.
- CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515–522, 2015.
- COELHO, L. F.; LIMA, C. J. B.; RODOVALHO, C. M.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. L. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n 1, p. 27-36, 2011.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 34-38, 2008.
- CURRY, B.; CROW, V. *Lactobacillus casei* group. In: _____. **Encyclopedia of dairy sciences**, London: Academic Press, 2003, cap.3, p. 1488–1493.

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S. H.; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. **Microbiology Reviews**, v. 16, p. 221-231, 1995.

DEVI, E. S.; VIJAYENDRA, S. V. N; SHAMALA, T. R. Exploration of rice bran, an agro-industry residue, for the production of intra-and extra-cellular polymers by *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 80-84, 2012.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

DUSSELIER, M.; WOUWE, P. V.; DEWAELE, A.; MAKSHINA, E.; SELS, B. F. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. **Energy and Environmental Science**, v. 6, p. 1415-1442, 2013.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS, S. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1465-1471, 2010.

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, p. 671-675, 2001.

FITZPATRICK, J. J.; O'KEEFFE, U. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 183-186, 2001.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. 2009. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 738-747, 2009.

HAN, Y.; LIU, E.; LIU, L.; ZHANG, B.; WANG, Y.; GUI, M.; WU, R.; LI, P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 230-237, 2015.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors effecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000.

HUJANEN, M.; LINKO, S.; LINKO, Y. Y.; LEISOLA, M. Optimization of media and cultivation conditions for L(+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology and Biotechnology**.v. 56, p. 126-130, 2001.

HUJANEN, M.; LINKO, Y. Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 307-313, 1996.

HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; D'HAENE, K.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; SWINGS, J. Accuracy of the species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 803-810, 2006.

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, n. 3, p. 1-13, 2011.

KWAN, T. H.; HU, Y.; LIN, C. S. K. Valorization of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 129-136, 2016.

LAHAYE, E. **Role structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien**. 2006, 182 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Université de Bretagne Sud, 2006.

LAUS, M. C.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; KIJNE, J. W. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 533-538, 2005.

LAVARI, L.; IANNIELLO, R.; PAEZ, 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. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 322-330, 2015.

LIU, B.; YANG, M.; QI, B.; CHEN, X.; SU, Z.; WAN, Y. Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As 1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 212-219, 2010.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. **Sustainable Biotechnology**, p. 211-228, 2010.

LIMA, C. J. B.; COELHO, L. F.; CONTIERO, J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperatura and pH control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 175-181, 2010.

MACHADO-JUNIOR, F. R. S.; MICHELON, M.; DALCANTON, F.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. **International Food Research Journal**, v. 22, n.3, p. 1253-1260, 2015.

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERINO, G.; EXPOSTI, D. T. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v. 35, p. 705-708, 2012.

MONTEIRO, N. K. **Caracterização química dos polissacarídeos produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp.** 2011. 98f. Dissertação

(Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

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 178 four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.81, p.291–298, 2015.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 437-444, 2008.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* C7 L1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 82-85, 2001.

OLIVEIRA, J. M. **Caracterização do exopolissacarídeo produzido por *Mesorhizobium loti* Semia 816 a partir de glicerol residual**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

OLIVEIRA, R. F.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M. V. S.; LIMA, H. O. S. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, p. 34-40, 2009.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J.; KNILL, J. F.; KOSSEVA, M. Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 219-226, 2010.

PATRICK, O. M. Lactic acid bacteria in health and disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-42, 2012.

PAULI, T.; FITZPATRICK, J. J. Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1-6, 2002.

PELCZAR Jr. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 518 p.

PNPB. Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel. **Biodiesel**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>. Acesso em 12 de janeiro de 2018.

PRADA-PALOMO, Y.; ROMERO-VANEGAS, M.; DIAZ-RUIZ, P.; MOLINA-VELASCO, D.; GUZMÁN-LUNA, C. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. from biodiesel derived raw glycerol. **Ciencia, Tecnologia y Futuro**, v. 5, n. 1, p. 57-66, 2012.

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, p. 215–221, 2015.

RAZIKA, G.; AMIRA, B.; YACINE, B.; AMMAR, B. Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sultae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 30, p. 5940-5946, 2012.

REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 22-34, 2008.

RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. B. 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. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactéria 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.

RIVALDI, J. D.; SILVA, M. L. C. S.; DUARTE, L. C.; FERREIRA, A. E. N.; CORDEIRO, C.; FELIPE, M. G. A.; FREIRE, A. P.; MANCILHA, I. M. Metabolism of biodiesel derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1735-1743, 2013.

RUIZ, S. P.; MARTINEZ, C. O.; NOCE, A. S.; SAMPAIO, A. R.; BAESSO, M. L.; MATIOLI, G. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 15-28, 2015.

RUSSO, J. F. S. **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: 15 de março de 2018.

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

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30–39, 2009.

SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 515-531, 2008.

SOBRINHO, H. B. de S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica***. 2007. 98 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

SOORO Ingredientes Confiáveis. **Permeado de soro de leite em pó**. Disponível em: <http://www.sooro.com.br/produtos/permeado-em-po/>. Acesso em: 13 de janeiro de 2018.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 415-422, 2015.

STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, J.L.; PAINTER, P.R. **General Microbiology**. 5th ed. London, England: Macmillan Education, 1986. 689 p.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, v. 23, p. 80-142, 1982.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide-production bacteria. **Journal of Applied Biotechnology**, n. 2, v. 3, p. 61-73, 2015.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; CARVALHO, A. M.; LOBO-BURLE, M.; HUNGRIA, M. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: CERRADO: CORREÇÃO DO SOLO E ADUBAÇÃO, 2 ed., 2004, Planaltina, DF. **Anais...** Planaltina: EMBRAPA, CERRADOS, 2004, p. 97-127.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and applications of lactic acid. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, p. 245-264, 2008.

WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 63-172, 2006.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The general of lactic acid bacteria**. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995. 397 p.

YU, L.; LEI, T.; REN, X.; PEI, X.; FENG, Y. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 496-502, 2008.

ZACARCHENCO, P.B; VAN DENDER, A.G.F.; SPADOTI, L.M; GALFINA, D.A.; TRENTO, F.K.H.S; ALVES, A.T.S. Permeado de soro. **Guia de Referência do Setor Lácteo 2012**, p. 48-52, 2012.

ZHANG, Y.; VADLANI, P. Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 694-699, 2015.

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.

ZHOU, S.; SHANMUGAM, K. T.; YOMANO, L. P.; GRABAR, T. B.; INGRAM, L. O. Fermentation of 12% (w/v) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 663-670, 2006.

ZOCCAL, R. **Queijos: produção e importação**, 2016. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>. Acesso em: 28 de setembro de 2017.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I

***SCREENING* DE *Lactobacillus* POTENCIAIS PRODUTORES DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS**

SCREENING DE *Lactobacillus* POTENCIAIS PRODUTORES DE ÁCIDO LÁTICO A PARTIR DE COPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

RESUMO

Neste trabalho, diferentes espécies de *Lactobacillus* e fontes de carbono foram avaliadas quanto à produção de ácido láctico (AL). A fim de padronizar o preparo do inóculo, a densidade ótica (DO) de oito diferentes micro-organismos (*L. rhamnosus* INCQS 00223, *L. fermentum* INCQS 00224, *L. helveticus* INCQS 00227, *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, *L. acidophilus* INCQS 00076, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035, *L. leichmanii* INCQS 00008 e *L. plantarum* INCQS 00007) foi acompanhada em cultivos sem e com agitação (150 rpm). A DO de 1,0 foi estabelecida (sem agitação), de forma a garantir que todos os micro-organismos encontravam-se na fase exponencial de crescimento ao serem inoculados. Após, realizou-se o cultivo dos *Lactobacillus*, utilizando glicose (padrão), glicerol residual (GR) e permeado de soro (PS) como fontes de carbono, a fim de verificar a produção de AL. O cultivo com GR resultou em menor concentração para todas as cepas estudadas. *L. plantarum* INCQS 00007 produziu a maior concentração de AL ($16,7 \pm 0,4 \text{ g L}^{-1}$) em meio com PS, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) de quando se empregou a glicose, sendo o micro-organismo e a fonte de carbono escolhidos como mais promissores quanto à produção de AL.

Palavras chaves: Bactérias Ácido Lácticas. Permeado de Soro. Glicerol Residual.

1 INTRODUÇÃO

Todos os processos biotecnológicos, que envolvem cultivos microbianos, apresentam uma etapa de preparo de inóculo, que consiste na preparação de uma suspensão de micro-organismos a partir de uma cultura estoque. Nesta cultura as células estão em estado latente, visando-se obter uma população de micro-organismos em quantidade e em atividade metabólica que garantam um desempenho adequado do processo, em termos de rendimento e produtividade do bioproduto de interesse. O preparo do inóculo geralmente é conduzido em laboratório e, posteriormente, transferido para a planta de produção industrial (PIO; FRAGA; MACEDO, 2008).

O momento exato para transferência do micro-organismo do inóculo para o cultivo deve corresponder à fase exponencial do crescimento celular, onde a velocidade específica de crescimento é máxima, pois anterior a esta fase encontra-se a fase de adaptação do micro-organismo. Após, tem-se a fase estacionária e a fase de declínio devido ao esgotamento de algum dos componentes do meio ou ao acúmulo de metabólitos inibidores, causando a morte das células (HISS, 2001). Desta forma, para garantir a reprodutibilidade de cultivos microbianos faz-se necessária a padronização do inóculo.

A medida da densidade ótica (DO) das culturas bacterianas é amplamente utilizada em microbiologia, como uma forma rápida e confiável de avaliar a concentração de células presentes, já que a mesma é proporcional ao número de células ou massa seca de células (MADDIGAN et al., 2016). Geralmente é utilizado o comprimento de onda de 600 nm (CAPELLARI, 2010; ZHANG; VADLANI, 2015), pois as medidas de suspensões celulares mais densas são mais precisas com comprimentos de onda mais longos (MADDIGAN et al., 2016).

O meio de cultivo *Man, Rogosa e Sharp* (MRS) tem sido utilizado no cultivo de bactérias ácido lácticas (BAL) (BERNARDO et al., 2016; COELHO et al., 2011; FITZPATRICK; AHRENS; SMITH, 2001; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010; OLIVEIRA et al., 2009; PRADA-PALOMO et al., 2012), pois estas bactérias requererem nutrientes complexos para o crescimento, tais como vitaminas do complexo B, minerais específicos e diversos aminoácidos (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009; STANIER et al., 1986). A fonte de carbono padrão deste meio é a glicose, sendo que a substituição desta por coprodutos agroindustriais tem sido avaliada como, por exemplo, pelo melaço (COELHO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2009), soro de leite (BERNARDO et al., 2016; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010), permeado de soro (PS) (FITZPATRICK; AHRENS; SMITH,

2001) e glicerol residual (GR) (PRADO-PALOMO et al., 2012), visando à produção de ácido láctico (AL) por diferentes espécies de *Lactobacillus*.

A utilização de matérias-primas de baixo custo em processos biotecnológicos para obtenção de AL possui vantagens significativas, no que diz respeito aos custos do processo (CAPELLARI, 2010). O AL é um importante bioproduto, tendo aplicações na indústria química, farmacêutica e principalmente na indústria de alimentos, como acidulante e conservante de bebidas e alimentos (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010). Além da composição do meio, a agitação e a aeração são variáveis importantes para o crescimento dos micro-organismos, pois promove a homogeneização dos componentes do meio, fornecendo oxigênio para a atividade respiratória (SCHMIDELL et al., 2001). Entretanto, as BAL, consideradas micro-organismos microaerófilos, requerem baixos níveis de oxigênio, sendo o crescimento mais acentuado em níveis de 1 a 15%. Sendo assim, não toleram os níveis de oxigênio presente no ar atmosférico (PELCZAR Jr.; CHAN; KRIEG, 1996).

Por outro lado, a maioria dos estudos relacionados a *Lactobacillus* cultivados em laboratório utilizam a agitação de 150 a 200 rpm (BERNARDO et al., 2016; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010; RIVALDI et al., 2013; WANG et al., 2016; ZHANG; VADLANI, 2015) a fim de promover a homogeneização e a aeração do meio. Entretanto, uma vez que *Lactobacillus* são bactérias microaerófilas (PELCZAR Jr.; CHAN; KRIEG, 1996), o cultivo estático pode ser uma alternativa, com um menor custo energético.

De acordo com o acima exposto, tem-se como objetivo do presente trabalho padronizar o preparo do inóculo de oito cepas de *Lactobacillus*, definindo uma DO que garanta o uso de células na fase exponencial de crescimento, bem como avaliar a influência do emprego da agitação no seu preparo e a substituição da glicose por fontes alternativas (GR ou PS), bem como selecionar a cepa mais promissora quanto à produção de AL.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Micro-organismos

As seguintes espécies de *Lactobacillus* foram utilizadas: *L. rhamnosus* INCQS 00223, *L. fermentum* INCQS 00224, *L. helveticus* INCQS 00227, *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, *L. acidophilus* INCQS 00076, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS

00035, *L. leichmannii* INCQS 00008 e *L. plantarum* INCQS 00007, sendo estas mencionadas na literatura como produtoras de AL. As mesmas foram disponibilizadas, na forma liofilizada, pelo Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS, 2015) – Fundação Oswaldo Cruz, localizada no Rio de Janeiro - RJ.

2.1.2 Glicerol residual

O GR, proveniente da obtenção do biodiesel a partir do óleo de soja por via metanólica, foi fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo-RS, contendo aproximadamente 81,92 % (m v⁻¹) de glicerol (Anexo A).

2.1.3 Permeado de soro

O PS em pó utilizado foi cedido pelo Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - CETEC - UNIVATES, localizado em Lajeado-RS, produzido pela empresa *Arla Foods Ingredients*, localizada na Dinamarca, contendo aproximadamente 85 % (m v⁻¹) de lactose (Anexo B).

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Reidratação das culturas liofilizadas

As culturas acondicionadas em ampolas de vidro foram rompidas em condições assépticas, sendo adicionadas à ampola 5 gotas do Caldo Nutriente, contendo (g L⁻¹) peptona (5), NaCl (5), extrato de carne (1,5) e extrato de levedura (1,5). A suspensão foi vertida em placas de Petri com ágar *Man*, *Rogosa* e *Sharpe* (MRS) (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960), contendo (g L⁻¹) peptona (10), extrato de carne (10), extrato de levedura (5), glicose (20), *Tween* 80 (1), citrato de amônia (2), acetato de sódio tri-hidratado (5), sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,1), sulfato de manganês tetra-hidratado (0,05), fosfato de potássio dibásico (2) e ágar (10), sendo então incubadas em estufa (Quimis Q-316 M2, Brasil) a 37 °C durante 48 h (INCQS, 2015).

2.2.2 Manutenção e reativação das culturas

Os micro-organismos foram mantidos refrigerados, sendo realizados repiques mensais. Para reativação das culturas estoques, foram realizados repiques sucessivos, sendo utilizado o ágar MRS, incubando-se a 37 °C por 48 h (INCQS, 2015).

2.2.3 Estudo da padronização do inóculo

Para o acompanhamento do crescimento bacteriano durante o preparo do inóculo foram realizados cultivos estáticos (sem agitação) e com agitação (150 rpm). Um tubo da cultura reativada foi raspado com 10 mL de água peptonada 0,1% (m v⁻¹) e o conteúdo transferido para frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de caldo MRS. A suspensão foi incubada a 37 °C em incubadora (Tecnal TE-420, Brasil), sendo retiradas alíquotas a cada 3 h nas primeiras 12 h de cultivo e, após, de 6 em 6 h até 48 h de cultivo, sendo medida a DO a 600 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China).

2.2.4 Screening das BAL

Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL de meio, inoculados com suspensão da bactéria em estudo. O inóculo correspondeu a 10% (v v⁻¹) do volume final. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada (Tecnal TE-420, Brasil) a 37 °C, sem agitação, retirando-se alíquotas a cada 2 h nas primeiras 8 h e após este tempo as alíquotas foram retiradas a cada 24 h até 96 h de cultivo, sendo estas centrifugadas a 10.000 × g (Cientec CT-5000R, Brasil) para as determinações analíticas no sobrenadante (pH, item 2.3.1; AL, item 2.3.3) e sedimento (biomassa, item 2.3.2). As oito cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas com meio MRS (20 g L⁻¹ de glicose) e com meio MRS modificado (20 g L⁻¹ de GR ou PS), a fim de selecionar a cepa e a fonte de carbono mais promissoras para produção de AL. Com os dados obtidos foram calculados a biomassa máxima $X_{\text{máx}}$ (g L⁻¹), a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$) e a produtividade em biomassa (g L⁻¹ h⁻¹).

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Determinação do pH

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

2.3.2 Determinação da biomassa

A biomassa foi monitorada por medida da absorbância a 600 nm do sedimento ressuspensionado em água, baseado no procedimento descrito por Trindade, Munhoz e Burkert (2015), sendo expressa em massa seca (g L^{-1}), obtida a partir de uma curva de calibração previamente determinada para cada micro-organismo (Apêndice 1A), permitindo assim traçar as curvas de crescimento celular.

2.3.3 Determinação de AL

Às amostras (sobrenadante) foi adicionada acetona PA ($1:3 \text{ v v}^{-1}$) para remoção de proteínas, sendo centrifugadas a $13.000 \times g$ por 15 min. A acetona foi evaporada em banho termostatzado (Stern 6, Brasil) a 37°C e borbulhamento de ar através de uma bomba de aquário (SC-7500) por 2 min, sendo as amostras devidamente diluídas, filtradas em membrana hidrofílica de $0,22 \mu\text{m}$ e transferidas para *vials*. A metodologia utilizada para a detecção do AL foi descrita por Oliveira, Buzato e Haully (2005). O AL foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (*Shimadzu*, Japão), utilizando uma coluna *Aminex HPX - 87H* ($300 \times 7,8 \text{ mm}$) (*Bio-Rad*, EUA), uma pré- coluna (*Bio-Rad*, EUA), detector UV/Visível a 210 nm e solução de H_2SO_4 ($0,005 \text{ M}$) como fase móvel, com um fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 35°C . O volume de injeção foi de $20 \mu\text{L}$, com tempo de corrida de 25 min, sendo o tempo de retenção do AL de aproximadamente 12 min. A concentração de AL foi determinada através de uma curva padrão de AL (Sigma, Aldrich), com faixa de linearidade de 1,0 a $7,0 \text{ g L}^{-1}$ (Apêndice E).

2.4 PARÂMETROS CINÉTICOS

2.4.1 Velocidade específica máxima de crescimento celular e produtividade

A partir das curvas de crescimento celular foram obtidos os parâmetros de velocidade específica máxima e produtividade (HISS, 2001).

A velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$), em h^{-1} , é definida pela Equação 1, calculada através do *software* Excel (Microsoft Inc., EUA)

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

A produtividade em biomassa, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, é definida pela Equação 2.

$$\text{Produtividade} = \frac{X_{\text{máx}} - X_0}{t_f} \quad (2)$$

Onde:

$X_{\text{máx}}$: biomassa máxima (g L^{-1}) atingida no t_f

X_0 : biomassa inicial (g L^{-1})

t_f : tempo (h) de cultivo referente a $X_{\text{máx}}$

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores médios e desvios-padrão de ln (DO), pH, biomassa e AL foram calculados através do *software* Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA) e submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey (MONTGOMERY, 2004), a fim de verificar a existência de diferenças significativas ($p \leq 0,05$) sendo que para a construção dos gráficos utilizou-se o *software* OriginPro 8 (OriginLab, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

As Figuras 1, 2 e 3 apresentam ln (DO) ao longo do tempo, para o cultivo estático e com 150 rpm de agitação, das oito diferentes cepas de *Lactobacillus* avaliadas.

Figura 1 - Acompanhamento do ln (DO) (■) com e (□) sem agitação ao longo do tempo para (a) *L. rhamnosus* INCQS 00223, (b) *L. fermentum* INCQS 00224 e (c) *L. helveticus* INCQS 00227

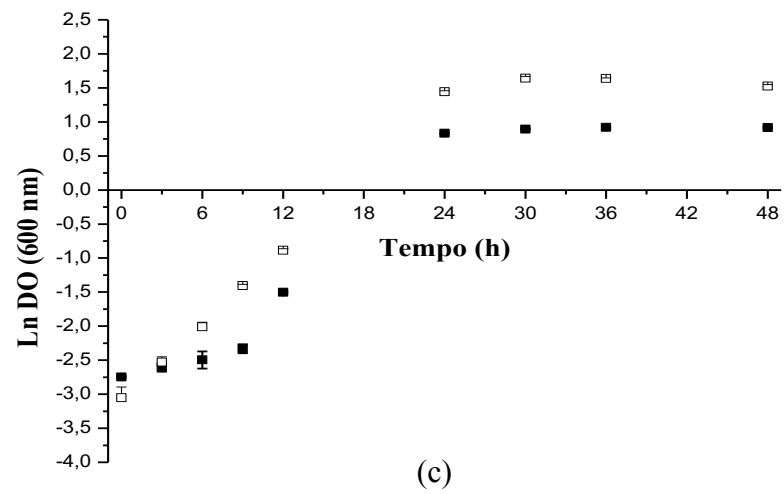
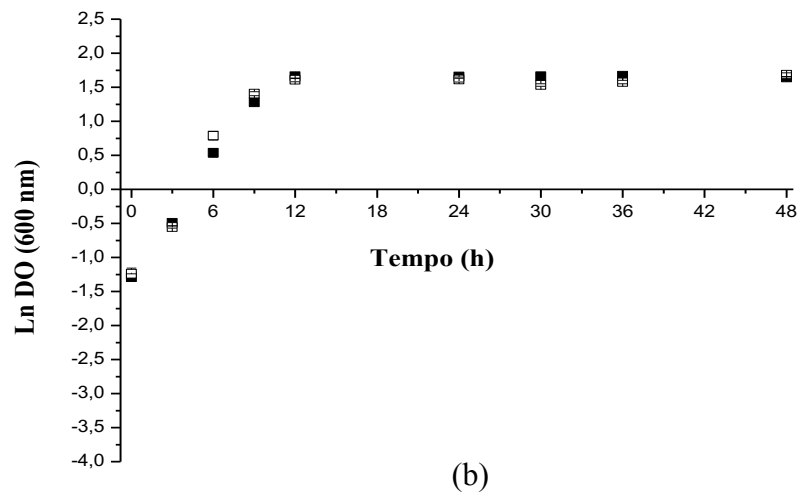
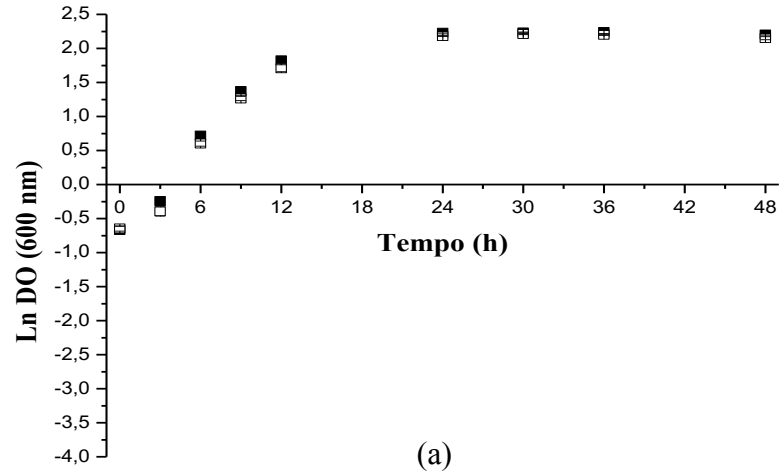


Figura 2 - Acompanhamento do ln (DO) (■) com e (□) sem agitação ao longo do tempo para (a) *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, (b) *L. acidophilus* INCQS 00076 e (c) *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035

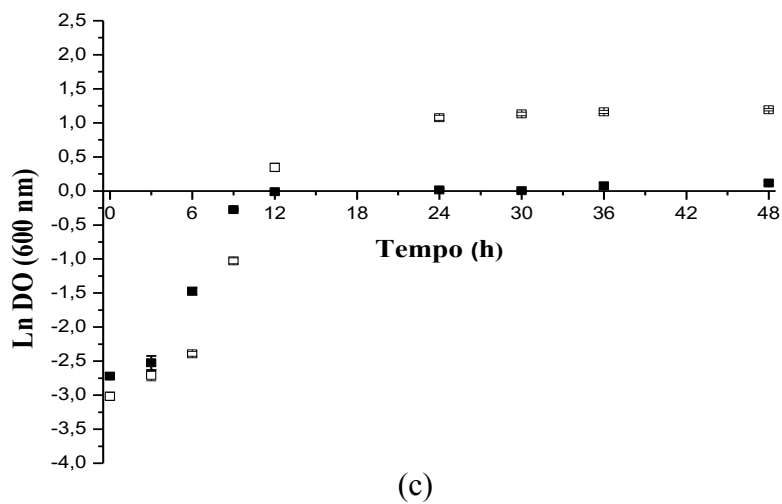
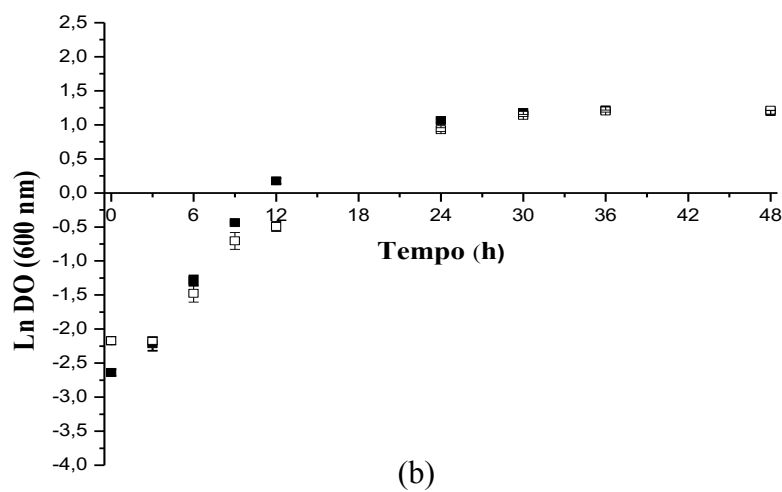
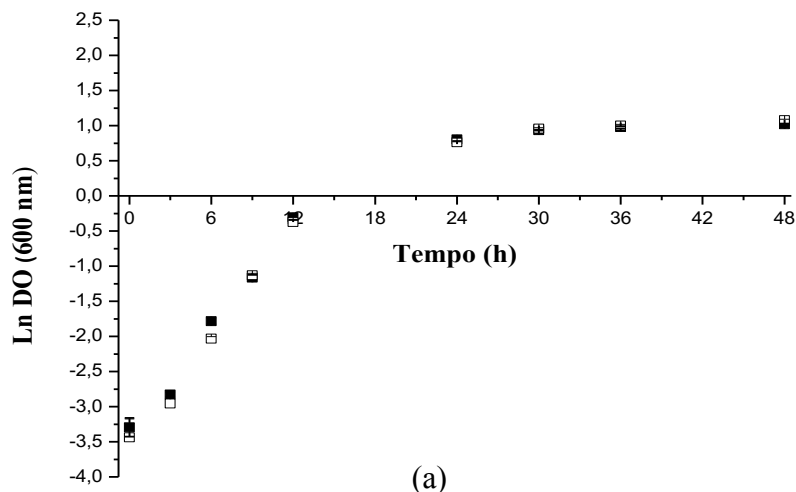
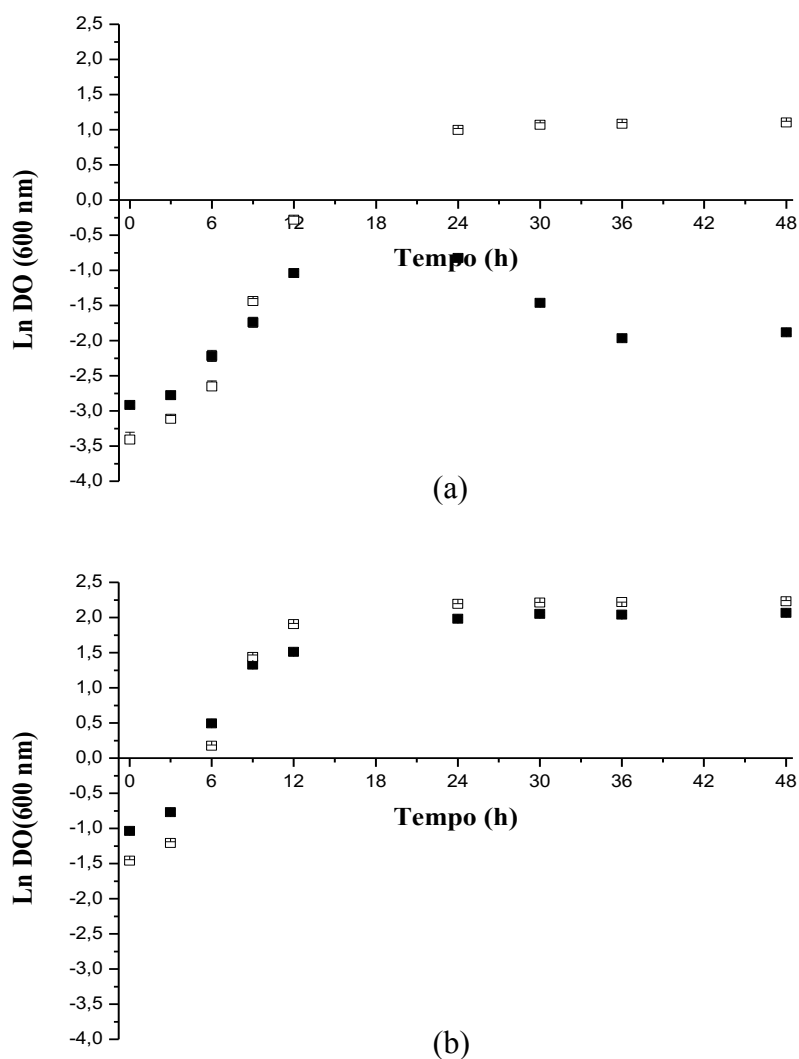


Figura 3 - Acompanhamento do ln (DO) (■) com e (□) sem agitação ao longo do tempo para (a) *L. leichmannii* INCQS 00008 e (b) *L. plantarum* INCQS 00007.



Pode-se observar claramente as fases de crescimento dos micro-organismos: a fase *lag*, ou fase de adaptação, caracterizada pela pequena variação de ln (DO), ocorre nas primeiras horas de cultivo; a fase exponencial, de rápido crescimento celular, caracterizada pela relação linear entre ln (DO) e tempo; e a fase estacionária, caracterizada pela estabilização no valor de ln (DO).

A partir da análise das curvas, para a padronização dos inóculos das diferentes cepas foi escolhida a DO igual a 1,0, pois todos os micro-organismos utilizados encontravam-se na fase exponencial de crescimento neste valor, que corresponde a ln (DO) igual a zero. Cabe ressaltar que alguns destes micro-organismos alcançaram valores de DO mais elevados, indicando um crescimento bem mais acentuado (Apêndice 1B).

Para *L. rhamnosus* INCQS 00223 (Figura 1a), em ambos os cultivos, com e sem agitação, a DO 1,0 foi alcançada em pouco mais de 3 h de cultivo, sendo que o mesmo comportamento foi observado para *L. fermentum* INCQS 00224 (Figura 1b) e *L. plantarum* INCQS 00007 (Figura 3b).

Com *L. helveticus* INCQS 00227 (Figura 1c) e *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222 (Figura 2a), a DO estipulada foi somente alcançada em aproximadamente 14 h de cultivo, sendo o mesmo comportamento observado para *L. leichmanii* INCQS 00008 (Figura 3a), mas apenas alcançada no cultivo estático. Para *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035 (Figura 2c), a DO foi alcançada em torno de 12 h de cultivo ao utilizar agitação, sendo em torno de 9-12 h ao utilizar o cultivo estático. *L. acidophilus* INCQS 00076 (Figura 2b) também alcançou a DO estipulada em torno de 9-12 h para o cultivo agitado, sendo que para o cultivo estático a DO foi alcançada em torno de 16 h.

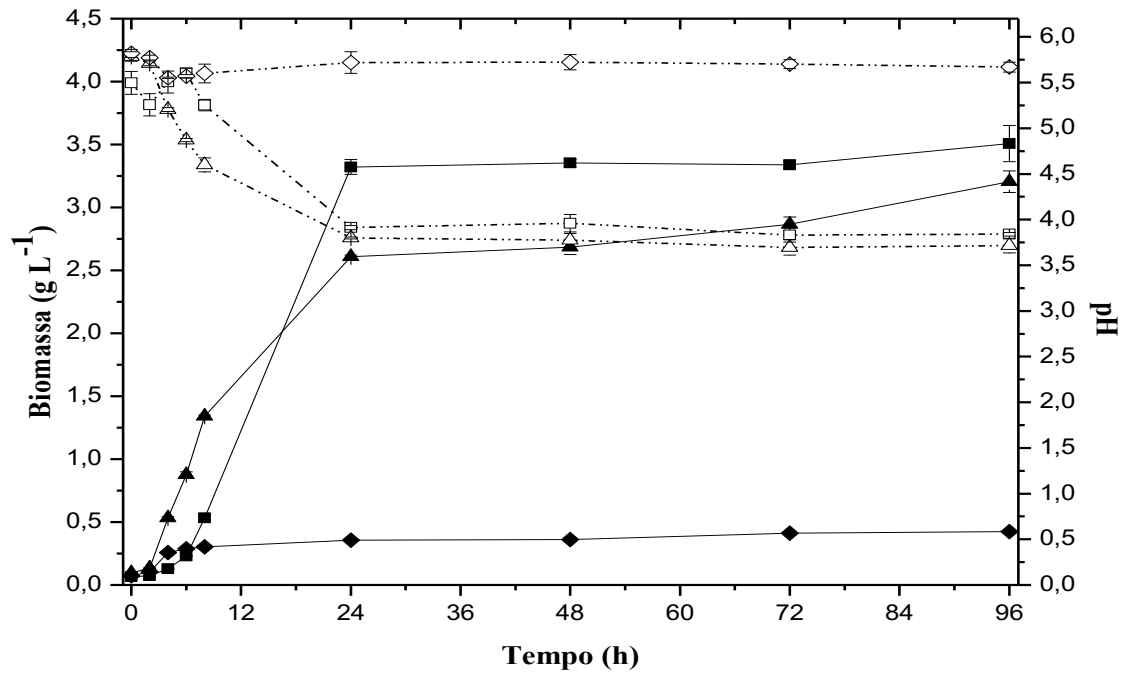
A diferença da DO para os cultivos com e sem agitação das oito cepas de *Lactobacillus*, de um modo geral, não foi expressiva, sendo ainda observado que para todas as bactérias estudadas houve maior ou igual crescimento em cultivo estático quando comparado ao cultivo agitado, provavelmente pela característica microaerófila de *Lactobacillus*. Inclusive *L. leichmanii* INCQS 00008 (Figura 3a) não cresceu satisfatoriamente quando utilizada a agitação de 150 rpm, apresentando bom crescimento apenas no cultivo estático. Dessa maneira foi selecionado o cultivo sem agitação para o preparo do inóculo, com a vantagem de minimizar gastos com energia.

São poucos os trabalhos encontrados relacionados ao estudo do preparo do inóculo, sendo que em alguns estudos a padronização se dá através do tempo de incubação. Lima, Coelho e Contiero (2010) e Bernardo et al. (2016) estabeleceram que em 18 h as bactérias *Lactobacillus* sp. LMI8 e *Lactobacillus rhamnosus* B103, respectivamente, encontravam-se na fase exponencial. Panesar et al. (2010), utilizando a bactéria *L. casei* e como fonte de carbono o soro de leite, verificaram não haver diferença significativa ($p > 0,05$) entre o cultivo com (100 rpm) e sem agitação, o que está de acordo com o encontrado no presente trabalho, implicando assim em menores custos energéticos.

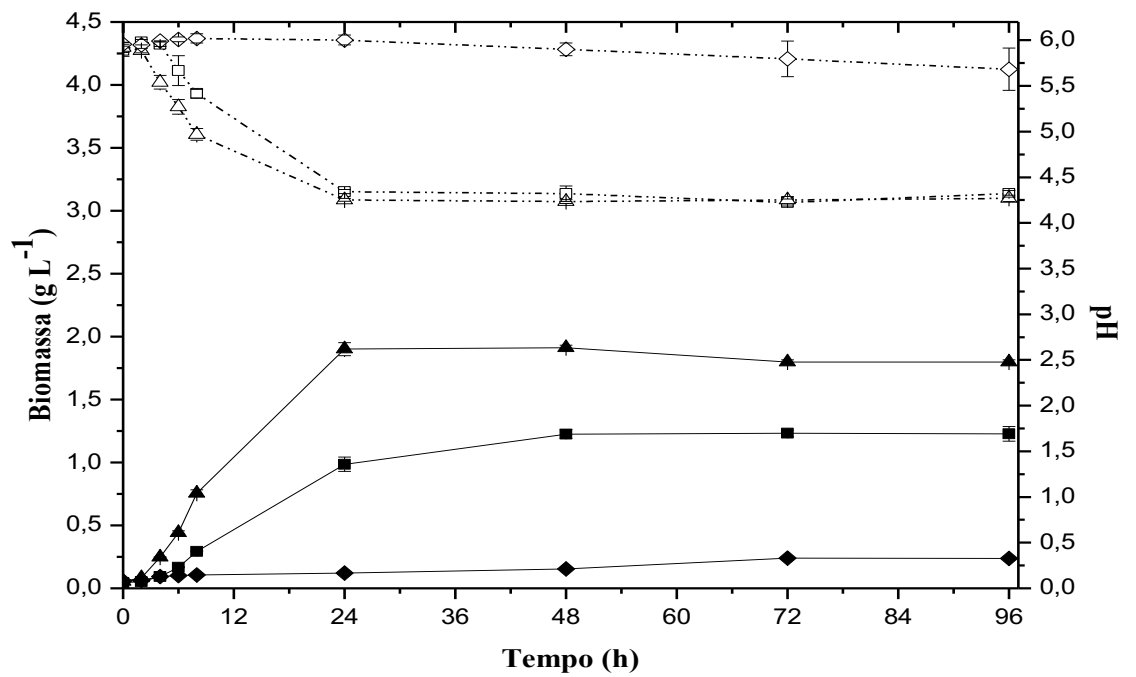
3.2 SCREENING DAS BAL: CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE AL

As Figuras 4, 5, 6 e 7 apresentam o acompanhamento da biomassa e pH das diferentes cepas de *Lactobacillus*.

Figura 4 - Acompanhamento da biomassa () e pH (---), utilizando (▲) glicose, (■) PS e (◆) GR como fonte de carbono para (a) *L. rhamnosus* INCQS 00223 e (b) *L. fermentum* INCQS 00224

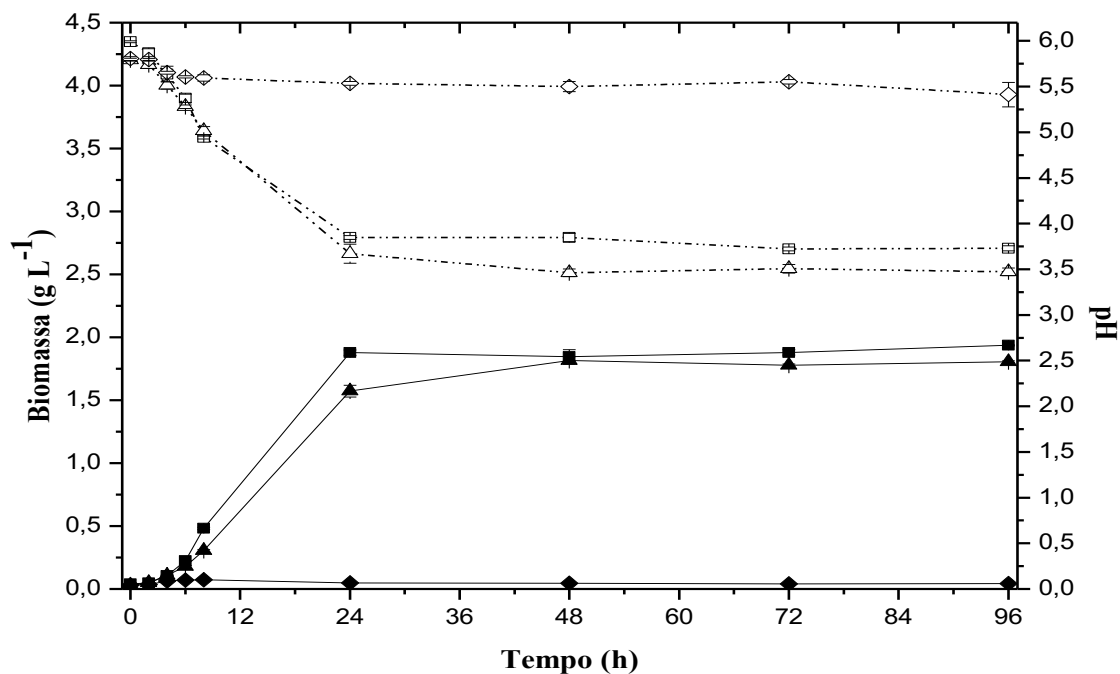


(a)

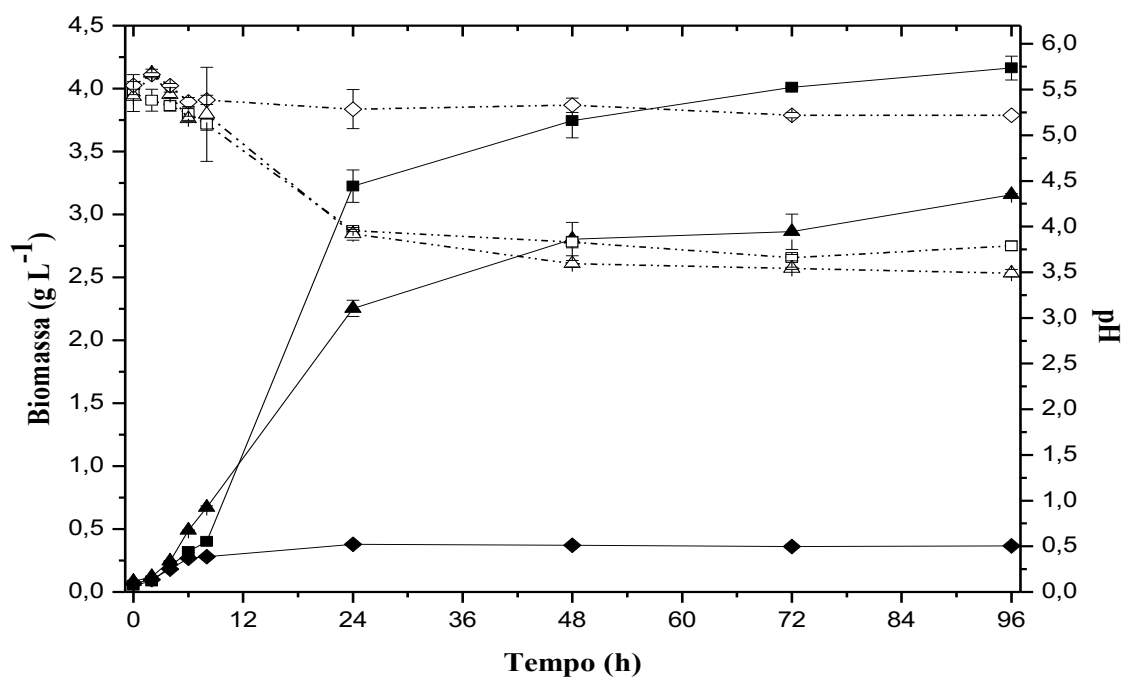


(b)

Figura 5 - Acompanhamento da biomassa (—) e pH (---), utilizando (▲) glicose, (■) PS e (◆) GR como fonte de carbono para (a) *L. helveticus* INCQS 00227 e (b) *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222



(a)



(b)

Figura 6 - Acompanhamento da biomassa (—) e pH (---), utilizando (▲) glicose, (■) PS e (◆) GR como fonte de carbono para (a) *L. acidophilus* INCQS 00076 e (b) *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035

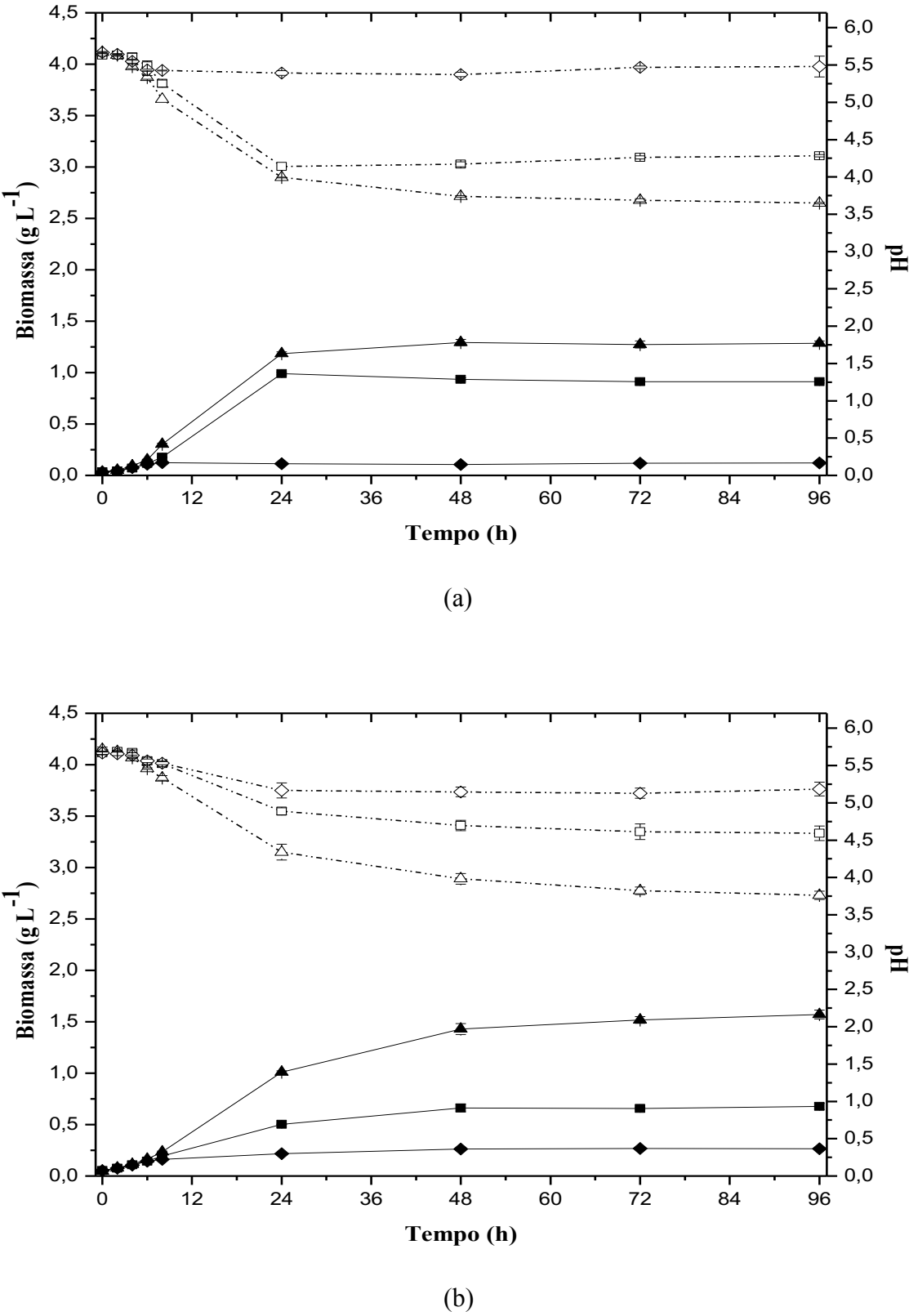
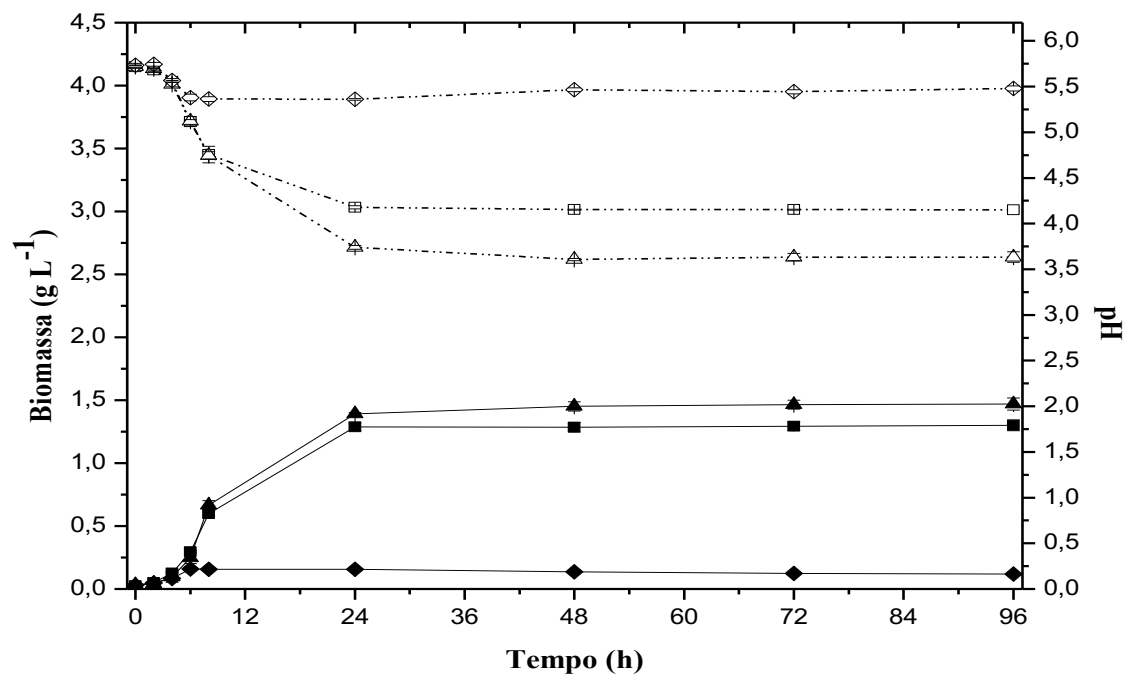
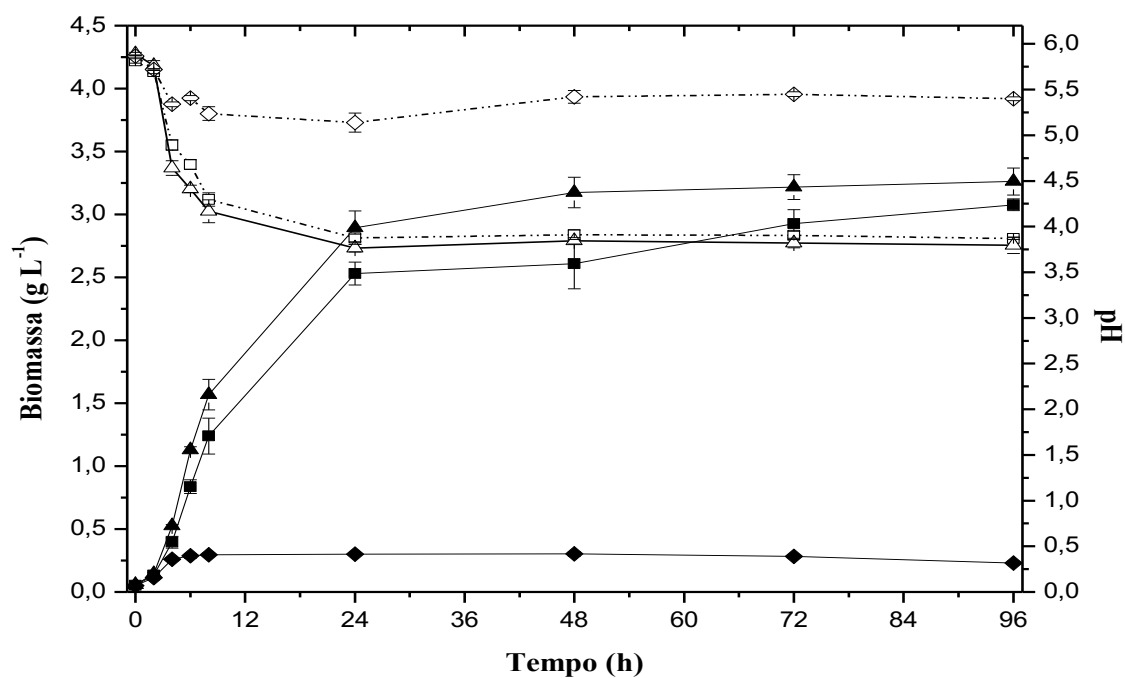


Figura 7 - Acompanhamento da biomassa (—) e pH (---), utilizando (▲) glicose, (■) PS e (◆) GR como fonte de carbono para (a) *L. leichmannii* INCQS 00008 e (b) *L. plantarum* INCQS 00007



(a)



(b)

Ao observar as Figuras 4, 5, 6 e 7 pode-se perceber que todas as bactérias foram capazes de crescer no meio à base de PS; entretanto, quando o GR foi a fonte de carbono utilizada, o crescimento foi menor. *L. paracasei* foi a bactéria que apresentou maior concentração de biomassa com PS, atingindo $4,16 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$, diferindo significativamente ($p < 0,05$) em relação à glicose ($3,15 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$). Foi também observado para as bactérias *L. rhamnosus* e *L. helveticus* um maior crescimento em meio com PS. *L. plantarum*, *L. leichmannii*, *L. fermentum* e *L. acidophilus* também demonstraram crescimento bastante significativo em meio com PS, mas este não foi superior à glicose.

O decréscimo de pH nos cultivos, indicativo da produção de AL, foi mais acentuado com PS e glicose, mas ao utilizar-se GR o pH manteve-se praticamente constante, um indício da baixa atividade metabólica dos micro-organismos com este substrato, o que corrobora o baixo crescimento celular observado.

Lavari et al. (2015), utilizando fermentador com volume de 1 L, encontraram para *L. rhamnosus* 64 uma concentração máxima de biomassa de $3,05 \text{ g L}^{-1}$ em condições anaeróbicas e $2,82 \text{ g L}^{-1}$ em condições aeróbicas, ao utilizar PS (aproximadamente 29 g L^{-1} de lactose) como fonte de carbono, extrato de levedura, peptona, Tween 80 e solução de Mn-Mg. No presente trabalho foi encontrado $3,51 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa utilizando *L. rhamnosus* INCQS 00223 e meio MRS modificado com 20 g L^{-1} de PS, sendo então verificado uma alta conversão de substrato em biomassa.

Rivaldi et al. (2013), utilizando *shaker* e GR no cultivo de *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii* UFV-H2B20 e *L. plantarum* ATCC 8014, observaram um crescimento, em 24 h de cultivo, de 2,11, 2,06 e $1,36 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, sendo que comportamento similar não foi observado no presente trabalho, onde o crescimento em meio com GR foi bem inferior. Segundo Bartowsky; Costello e Chambers, (2015), um estudo de BAL associadas ao vinho demonstrou que a capacidade de *Lactobacillus* sp. em fermentar o glicerol é limitada, sendo apenas 31%, o que provavelmente ocorreu no presente trabalho, o que acarretou baixo crescimento celular.

Mussato et al. (2008), ao utilizar *L. delbrueckii*, em *shaker*, sem agitação, com uma mistura de $57,8 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $7,5 \text{ g L}^{-1}$ de celobiose, produziram $2,15 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, sendo que no presente trabalho a concentração de biomassa, utilizando outra cepa de *L. delbrueckii*, foi de $1,57 \text{ g L}^{-1}$, ao utilizar menos da metade da concentração da fonte de carbono (20 g L^{-1} de glicose).

Kwan, Hu e Lin (2016), utilizando *L. casei* e 20 g L⁻¹ de glicose, encontraram 2,6 g L⁻¹ de biomassa. Fitzpatrick, Ahrens e Smith (2001) utilizaram 50 g L⁻¹ de PS como fonte de carbono, em biorreator, no cultivo com o mesmo micro-organismo, obtendo 3,4 g L⁻¹ de biomassa. Fitzpatrick e O'Keeffe (2001), no cultivo de *L. helveticus*, em biorreator com 100 g L⁻¹ de PS, atingiram 1,8 g L⁻¹ sem suplementação e 3,1 g L⁻¹ quando o meio foi suplementado com 3 e 4% de proteína hidrolisada do soro de leite, respectivamente. No presente trabalho, a cepa de *L. helveticus* alcançou uma concentração de biomassa de 1,94 g L⁻¹ ao utilizar 20 g L⁻¹ da mesma fonte de carbono, ou seja, ao utilizar uma concentração de PS cinco vezes menor obteve-se uma concentração de biomassa similar ao encontrado por Fitzpatrick e O'Keeffe (2001), sem suplementação.

De acordo com o acima exposto, pode-se verificar que a composição do meio, fonte de carbono e agitação são variáveis importantes que influenciam diretamente o crescimento do micro-organismo, indicando a importância do estudo destes fatores.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros cinéticos, tais como biomassa máxima, velocidade específica de crescimento e produtividade, para as diferentes cepas de *Lactobacillus*, nos diferentes meios estudados.

De acordo com a Tabela 1, a biomassa máxima encontrada foi em meio à base de PS para o micro-organismo *L. paracasei*, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do meio à base de glicose e GR e diferindo também dos demais micro-organismos em estudo. Também foi encontrada uma elevada biomassa máxima para *L. rhamnosus* ($3,51 \pm 0,14$ g L⁻¹) e *L. plantarum* ($3,08 \pm 0,05$ g L⁻¹). Quando utilizada a fonte de carbono padrão, glicose, a maior biomassa máxima foi encontrada para *L. plantarum*, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) de *L. rhamnosus* e *L. paracasei*. Em meio com GR a maior biomassa máxima alcançada foi com a bactéria *L. rhamnosus*, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) das demais bactérias, sendo os valores encontrados em meio com esta fonte de carbono consideravelmente inferiores às demais fontes testadas.

A maior velocidade específica máxima de crescimento foi encontrada em meio com glicose para *L. plantarum*, seguida das bactérias *L. leichmanii*, *L. rhamnosus*, e *L. fermentum*. Também foi encontrada uma alta velocidade específica quando o PS foi a fonte de carbono utilizada, sendo o maior valor encontrado para *L. plantarum*, seguido por *L. leichmanii* e *L. rhamnosus*. Ao analisar a velocidade específica máxima em meio contendo GR como fonte de carbono, *L. plantarum* e *L. leichmanii* foram as bactérias que mais se destacaram, não

havendo diferença estatística ($p > 0,05$) entre os micro-organismos citados, sendo encontrado valores similares também para *L. rhamnosus*.

Tabela 1 - Biomassa máxima ($X_{\text{máx}}$) velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e produtividade em biomassa* para diferentes *Lactobacillus*, utilizando PS, glicose e GR como fonte de carbono

		$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
<i>L. rhamnosus</i>	Permeado	3,51 (0,14) ^{a,B}	0,33 (<0,01) ^{b,C}	0,14 (<0,01) ^{b,B,C}
	Glicose	3,20 (0,09) ^{b,A}	0,36 (<0,01) ^{a,C}	0,16 (<0,01) ^{a,B}
	Glicerol	0,42 (0,01) ^{c,A}	0,25 (<0,01) ^{c,B,C}	0,05 (<0,01) ^{c,B}
<i>L. fermentum</i>	Permeado	1,23 (0,03) ^{b,F}	0,28 (<0,01) ^{b,D}	0,04 (<0,01) ^{b,D,E}
	Glicose	1,91 (0,02) ^{a,C}	0,34 (<0,01) ^{a,C}	0,05 (<0,01) ^{a,F}
	Glicerol	0,24 (<0,01) ^{c,E}	0,10 (<0,01) ^{c,F}	0,01 (<0,01) ^{c,G}
<i>L. helveticus</i>	Permeado	1,94 (<0,01) ^{a,E}	0,39 (<0,01) ^{a,B}	0,08 (<0,01) ^{a,C,D,E}
	Glicose	1,82 (0,03) ^{b,C}	0,30 (<0,01) ^{b,D}	0,06 (<0,01) ^{b,E,F}
	Glicerol	0,07 (<0,01) ^{c,H}	0,15 (<0,01) ^{c,E}	0,01 (<0,01) ^{c,G}
<i>L. paracasei</i>	Permeado	4,16 (0,10) ^{a,A}	0,27 (0,01) ^{a,D,E}	0,21 (0,04) ^{a,A}
	Glicose	3,16 (0,01) ^{b,A}	0,28 (<0,01) ^{a,D}	0,12 (0,03) ^{b,C}
	Glicerol	0,38 (<0,01) ^{c,B}	0,23 (<0,01) ^{b,C}	0,03 (<0,01) ^{c,C}
<i>L. acidophilus</i>	Permeado	0,99 (0,01) ^{b,G}	0,24 (<0,01) ^{b,E}	0,04 (<0,01) ^{b,D,E}
	Glicose	1,29 (0,03) ^{a,E}	0,28 (<0,01) ^{a,D}	0,05 (<0,01) ^{a,F}
	Glicerol	0,12 (0,01) ^{c,G}	0,20 (<0,01) ^{c,D}	0,01 (<0,01) ^{c,F}
<i>L. delbrueckii</i>	Permeado	0,68 (0,03) ^{b,H}	0,16 (<0,01) ^{b,F}	0,02 (<0,01) ^{b,E}
	Glicose	1,57 (0,04) ^{a,D}	0,20 (<0,01) ^{a,E}	0,04 (<0,01) ^{a,F}
	Glicerol	0,27 (0,01) ^{c,D}	0,14 (<0,01) ^{c,E}	0,02 (<0,01) ^{c,F}
<i>L. leichmanii</i>	Permeado	1,30 (0,04) ^{b,F}	0,40 (0,01) ^{b,B}	0,07 (<0,01) ^{b,C,D,E}
	Glicose	1,47 (0,05) ^{a,D}	0,46 (0,02) ^{a,B}	0,08 (<0,01) ^{a,D,E}
	Glicerol	0,16 (0,01) ^{c,F}	0,28 (0,01) ^{c,A}	0,02 (<0,01) ^{c,E}
<i>L. plantarum</i>	Permeado	3,08 (0,05) ^{b,C}	0,47 (0,02) ^{b,A}	0,15 (0,02) ^{b,A,B}
	Glicose	3,26 (0,11) ^{a,A}	0,51 (<0,01) ^{a,A}	0,19 (0,01) ^{a,A}
	Glicerol	0,30 (0,02) ^{c,C}	0,30 (<0,01) ^{c,A}	0,05 (<0,01) ^{c,A}

*Média (desvio padrão), n = 3. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono para um mesmo micro-organismo ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre os micro-organismos para uma mesma fonte de carbono ($p < 0,05$).

Apesar do pequeno crescimento observado com o uso do meio contendo GR, evidenciado pelos baixos valores de $X_{\text{máx}}$, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ para alguns micro-organismos foram equivalentes àqueles observados para glicose e PS, demonstrando crescimento nas primeiras horas de cultivo, fato que pode estar associado ao consumo de açúcares oriundos do inóculo e/ou posterior inibição do crescimento microbiano.

A maior produtividade encontrada foi em meio utilizando o PS para a bactéria *L. paracasei*, não diferindo ($p > 0,05$) de *L. plantarum*. Ao utilizar a glicose como fonte de carbono, a maior produtividade encontrada foi para *L. plantarum*, diferindo ($p < 0,05$) dos demais micro-organismos; sendo que em meio com GR a maior produtividade foi encontrada para este mesmo micro-organismo. Ao analisar a produtividade das três fontes de carbono, podem ser verificados valores de produtividade inferiores em meio com GR.

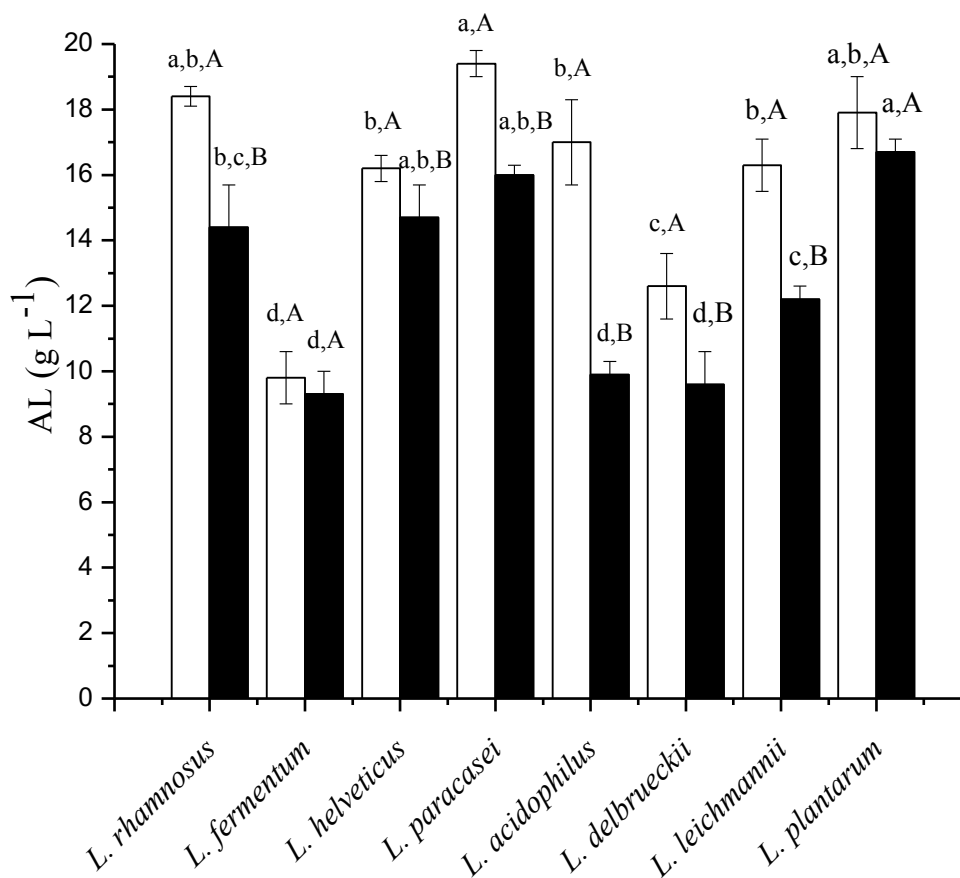
Hugo, Bruno e Golowczyc (2016) encontraram uma maior velocidade específica para *L. plantarum* CIDCA 83114 ao utilizar o meio MRS padrão ($0,819 \text{ h}^{-1}$) e $0,110 \text{ h}^{-1}$ quando PS foi utilizado. O mesmo comportamento foi encontrado no presente trabalho, ou seja, uma velocidade específica maior no meio padrão. Lavari et al. (2015) encontraram para *L. rhamnosus* 64 uma velocidade específica de $0,292 \text{ h}^{-1}$ e biomassa máxima de $2,82 \text{ g L}^{-1}$ ao utilizar o PS como fonte de carbono; resultados estes bastante semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Rivaldi et al. (2013) estudaram o comportamento de três espécies de *Lactobacillus*, obtendo para *L. delbrueckii* UFV-H2b20 e *L. acidophilus* ATCC 4356 resultados muito semelhantes, sendo eles $2,06$ e $2,11 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, $0,09$ e $0,09 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de produtividade e $0,33$ e $0,32 \text{ h}^{-1}$ de velocidade específica máxima, respectivamente; já para *L. plantarum* ATCC 8014, os resultados encontrados foram de $1,36 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa, $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de produtividade e $0,26 \text{ h}^{-1}$ de velocidade específica máxima, resultados bastante diferentes dos encontrados no presente trabalho, onde, entre estes micro-organismos, *L. plantarum* foi o que apresentou parâmetros de crescimento superiores.

A Figura 8 apresenta a concentração de AL para os *Lactobacillus* em estudo, em 96 h de cultivo, em meio com glicose e PS. Para os cultivos com GR, a determinação de AL não foi realizada, em virtude do baixo crescimento do micro-organismo e pequena variação de pH observados.

Pode-se verificar que a concentração de AL variou de $9,8 \text{ g L}^{-1}$ (*L. fermentum*) a $19,4 \text{ g L}^{-1}$ (*L. paracasei*) quando se utilizou glicose, e de $9,3 \text{ g L}^{-1}$ (*L. fermentum*) a $16,7 \text{ g L}^{-1}$ (*L. plantarum*) ao utilizar PS.

Ao compara-se as diferentes fontes de carbono para cada micro-organismo verificou-se que, para a maioria das bactérias, maiores concentrações de AL foram encontradas em meio com glicose. Mesmo assim, com as bactérias *L. plantarum* e *L. fermentum*, diferenças significativas não foram observadas ($p>0,05$), sendo que para as demais cepas, mesmo havendo diferença significativa ($p<0,05$) entre as fontes de carbono (glicose e PS), quantidades expressivas de AL foram produzidas por todas as bactérias, sendo a produção de AL, utilizando o PS como fonte de carbono, no mínimo de 60 % em relação à glicose, mostrando a potencialidade do PS como fonte de carbono no cultivo destes micro-organismos.

Figura 8 - Concentração de AL* em 6 h de cultivo, utilizando □ glicose e ■ PS como fonte de carbono



* Média e desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa ($p<0,05$) entre os micro-organismos, para uma mesma fonte de carbono. Letras maiúsculas diferentes indicam que há diferença significativa ($p<0,05$) entre as fontes de carbono, para um mesmo micro-organismo. AL: ácido láctico; PS: permeado de soro

Mussato et al. (2008) encontraram para *L. delbrueckii*, utilizando *shaker* e uma concentração de 57,8 g L⁻¹ glicose e 7,5 g L⁻¹ celobiose, 35,54 g L⁻¹ de AL, ou seja, 54,42 % da fonte de carbono convertida em produto, sendo que resultados semelhantes foram encontrados no presente trabalho (12,58 ± 1,01 g L⁻¹ de AL), ao utilizar 20 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono, correspondendo a uma conversão de 62,9 % de substrato em produto.

Resultados semelhantes de concentrações de AL (15,5 ± 0,5 g L⁻¹) foram encontrados por Kwan, Hu e Lin (2016) utilizando a bactéria *L. casei* shirota e 20 g L⁻¹ de glicose. No presente trabalho, foi encontrado para a bactéria *L. rhamnosus*, 14,38 ± 1,33 g L⁻¹ de AL ao utilizar 20 g L⁻¹ de PS, ou seja, 71,90 % do substrato foi convertido em produto. Já Bernardo et al. (2016) encontraram 143,70 g L⁻¹ de AL ao utilizar aproximadamente 500 g L⁻¹ de soro de leite em pó, no cultivo de outra cepa de *L. rhamnosus*, sendo este em biorreator, podendo ter ocorrido, neste caso uma inibição do micro-organismo pela alta concentração inicial de substrato, pois apenas 28,74 % de substrato foi convertido em produto.

Zhang e Vadlani (2015), no cultivo de *L. plantarum*, em *shaker*, com 25,5 g L⁻¹ de glicose e 8,7 g L⁻¹ de xilose, encontraram 24,3 g L⁻¹ de AL, sendo que no presente trabalho, ao utilizar 20 g L⁻¹ de glicose, encontrou-se 17,88 g L⁻¹ de AL.

Portanto, entre as bactérias estudadas, *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. helveticus* não diferiram (p>0,05) na concentração de AL em meio com PS, sendo que *L. plantarum* foi a bactéria que apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento e uma alta produtividade (0,47 ± 0,02 h⁻¹ e 0,15 ± 0,02 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente), ao comparar-se com as demais bactérias em estudo, em meio com PS. Além disso, diferenças significativas não foram observadas entre glicose e PS no cultivo de *L. plantarum*, enquanto que *L. paracasei* e *L. helveticus* apresentaram melhor produção com glicose. Desta forma, a bactéria *L. plantarum* destacou-se como a mais promissora na produção de AL em meio com PS como fonte de carbono.

4 CONCLUSÕES

De acordo com as curvas de crescimento foi possível estabelecer uma DO de 1,0 para a padronização do inóculo para todas as espécies de *Lactobacillus* avaliados, garantindo a inoculação dos mesmos na fase exponencial.

A diferença da DO para o inóculo com e sem agitação de um modo geral não foi expressiva, provavelmente pela característica microaerófila das cepas de *Lactobacillus*,

podendo o preparo do inóculo ser conduzido em cultivo estático, com um menor gasto energético.

O GR não se apresentou como uma boa alternativa no cultivo de *Lactobacillus*. Por outro lado, o PS mostrou-se como uma promissora alternativa, pois todas as bactérias foram capazes de assimilá-lo e de produzir quantidades expressivas de AL. *L. plantarum* foi a espécie escolhida por ser a mais promissora quanto à produção de AL, pois também foi a bactéria que apresentou uma maior velocidade específica máxima de crescimento e produtividade, ao comparar com as demais estudadas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC, **Official Methods of Analysis**, 17 ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.

BARTOWSKY, E.; COSTELLO, P.J.; CHAMBERS, P.J. Emerging trends in the application of malolactic fermentation. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, n. 21, p. 663-669, 2015.

BERNARDO, M. P.; COELHO, L. F.; SASS, D. C.; CONTIERO, J. L. (+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 640-646, 2016.

CAPELLARI, J. **Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais**. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

COELHO, L. F.; LIMA, C. J. B.; RODOVALHO, C. M.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. L. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 27-36, 2011.

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, p. 671-675, 2001.

FITZPATRICK, J. J.; O'KEEFFE, U. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate bath fermentations for producing lactic acid. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 183-186, 2001.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 738-747, 2009.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In _____. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher Ltda, 2001. cap. 6. p. 93-121.

HUGO, A. A.; BRUNO, F.; GOLOWCZYC, M. A. Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. **Food Science and Technology**, v. 69, p. 185-190, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz. **Instruções para reidratação das culturas**. Manguinhos, Rio de Janeiro, 2015.

KWAN, T. H.; HU, Y.; LIN, C. S. K. Valorization of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 129-136, 2016.

LAVARI, L.; IANNIELLO, R.; PAEZ, 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. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 322-330, 2015.

LIMA, C. J. B.; COELHO, L. F.; CONTIERO, J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 175-181, 2010.

MADDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. 14^a ed. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1032 p.

MAN, J. D., ROGOSA, M., SHARPE, M. E., A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 23, p. 130-135, 1960.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4^a Ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004. 512 p.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 437-444, 2008.

OLIVEIRA, A. R.; BUZATO, J. B.; HAULY, M. C. O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 53-60, 2005.

OLIVEIRA, R. F.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M. V. S.; LIMA, H. O. S. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, p. 34-40, 2009.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J.; KNILL, J. F.; KOSSEVA, M. Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 219-226, 2010.

PELCZAR Jr. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2^a ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 518 p.

PIO, T. F.; FRAGA, L. P.; MACEDO, G. A.; Inoculum padronization for the

production of cutinase by *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 74-77, 2008.

PRADA-PALOMO, Y.; ROMERO-VANEGAS, M.; DIAZ-RUIZ, P.; MOLINA-VELASCO, D.; GUZMÁN-LUNA, C. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. from biodiesel derived raw glycerol. **Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 5, n. 1, p. 57-66, 2012.

RIVALDI, J. D.; SILVA, M. L. C. S.; DUARTE, L. C.; FERREIRA, A. E. N.; CORDEIRO, C.; FELIPE, M. G. A.; FREIRE, A. P.; MANCILHA, I. M. Metabolism of biodiesel derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1735-1743, 2013.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 554 p.

STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, J.L.; PAINTER, P.R. **General Microbiology**, 5th ed. London, England: Macmillan Education, 1986. 689 p.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Raw glicerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide-production bacteria. **Journal of Applied Biotechnology**, n. 2, v. 3, p. 61-73, 2015.

WANG, Y.; CHEN, C.; CAI, D.; WANG, Z.; QIN, P.; TAN, T. The optimization of lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 1098-1105, 2016.

ZHANG, Y.; VADLANI, P. Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 694-699, 2015.

ARTIGO II

EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE PERMEADO DE SORO EM ÁCIDO LÁTICO POR *Lactobacillus plantarum*

EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA BIOCONVERSÃO DE PERMEADO DE SORO EM ÁCIDO LÁTICO POR *Lactobacillus plantarum*

RESUMO

O presente trabalho visou avaliar os efeitos das condições de cultivo na bioconversão do permeado de soro (PS) em ácido lático (AL) por *L. plantarum* INCQS 00007, utilizando meio MRS modificado pela substituição da glicose por PS. Inicialmente, foi proposto um delineamento *Plackett Burman* de doze variáveis, incluindo temperatura, agitação e os componentes do meio de cultivo. O PS, extrato de carne e a temperatura foram as variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) na concentração de AL, sendo observado que quantidades expressivas de lactose não foram consumidas em muitos ensaios, fato possivelmente associado à inibição pela acidificação do meio. Portanto, optou-se pelo ajuste do pH do meio ao longo do cultivo, resultando no consumo total do substrato pela bactéria, alcançando $39,35 \pm 1,40 \text{ g L}^{-1}$ de AL quando utilizou-se, em g L^{-1} : 40 de PS, 20 de extrato de carne, 20 de peptona, 5 de acetato de sódio, 1,5 de *Tween* 80, 0,05 de sulfato de manganês, sem agitação, na temperatura de 32°C . Posteriormente, aumentou-se a concentração do PS para 60, 80, 120 e 160 g L^{-1} , sendo observado que até a concentração de 80 g L^{-1} a lactose presente no meio foi praticamente toda consumida, e nas maiores concentrações estudadas ocorreu uma possível inibição da bactéria pela alta concentração inicial do substrato. Sendo assim, optou-se por realizar um cultivo em batelada alimentada, iniciando com 40 g L^{-1} , com duas alimentações (40 g L^{-1} cada) nos tempos de 48 e 96 h, totalizando 120 g L^{-1} . A maior concentração de AL foi obtida na batelada alimentada, com alimentação total de 120 g L^{-1} de PS ($56,97 \pm 1,58 \text{ g L}^{-1}$), correspondente a $Y_{P/S}$ de $0,62 \text{ g g}^{-1}$, sendo a maior conversão de substrato em produto ($Y_{P/S} 0,95 \text{ g g}^{-1}$) obtida na concentração de 60 g L^{-1} , atingindo $50,30 \pm 0,89 \text{ g L}^{-1}$ de AL.

Palavras chave: Coprodutos Agroindustriais. *Plackett Burnan*. Batelada Alimentada.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são divididas em treze gêneros, dentre eles *Lactobacillus* representa o maior dos gêneros, com mais de 125 espécies e subsespécies identificadas, sendo muitas destas espécies reconhecidas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (HOFVENDAHL; HAHN-HAGERDAL, 2000; PANESAR et al., 2007).

Algumas espécies de *Lactobacillus*, por exemplo *L. plantarum*, possuem papel fundamental na produção e preservação de alimentos, além de apresentarem propriedades probióticas com efeitos benéficos à saúde (HUYS et al., 2006; LOPES, 2015), sendo largamente utilizadas na indústria de alimentos, em particular em produtos lácteos (LAVARI et al., 2015). São consideradas heterofermentativas facultativas, por serem capazes de fermentar hexoses e também pentoses, produzindo altas concentrações de ácido láctico (AL), ocasionando a diminuição do pH do meio, chegando a pH em torno de 4,0 ou até mesmo valores inferiores (PARK; KIM, 2012).

A bactéria *L. plantarum* é mencionada na literatura como produtora de AL, sendo que o meio de cultivo *Man, Rogosa e Sharp* (MRS) tem sido utilizado no cultivo destas bactérias (COELHO et al., 2011; LIU et al., 2010; ZHANG; VADLANI, 2015) por ser um meio bastante completo. Este meio contém todos os nutrientes que as BAL necessitam, como vitaminas do complexo B, minerais específicos e diversos aminoácidos para seu crescimento (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009; STANIER et al., 1986). Como fontes de carbono utilizada no cultivo destas bactérias a literatura reporta o emprego de glicose, que é a fonte usual (LIU et al., 2010), mistura de glicose e xilose (ZHANG; VADLANI, 2015) e, como coproduto agroindustrial, o melaço (COELHO et al., 2011). A escolha do substrato bem como os demais componentes do meio utilizado precisam preencher as necessidades nutricionais do micro-organismo, além de ser economicamente viável. Além da composição do meio, a agitação e aeração são fatores importantes no fornecimento de oxigênio para atividade respiratória (SCHMIDELL et al., 2001), bem como a temperatura de crescimento, que pode variar de 20 a 45 °C (WOOD; HOLZAPFEL, 1995; PANESAR et al., 2007).

O AL, um metabólito proveniente do cultivo de *Lactobacillus*, é um composto bastante versátil, possuindo numerosas aplicações na indústria química, farmacêutica, têxtil (LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010; YU et al., 2008) e principalmente na indústria de alimentos, como acidulante e conservante de bebidas e alimentos (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009; LIMA; COELHO; CONTIERO, 2010).

Diante do acima exposto, a utilização do PS como fonte de carbono no cultivo de *L. plantarum* enquadra-se neste contexto como uma promissora alternativa. O PS é obtido quando o soro de queijo é ultrafiltrado para concentrar as proteínas, que ficam retidas e, então, a lactose, sais minerais e vitaminas atravessam a membrana para o permeado (ZACARCHENCO et al., 2012). De acordo com a SOORO (2017), o PS pode ser aplicado em produtos cárneos, lácteos, panificação, confeitaria, *snacks*, salgadinhos, sorvetes, suplemento alimentar, ração animal, entre outros, pois possui no mínimo 85 % de lactose, podendo constituir uma fonte de carbono promissora para cultivos microbianos, mas se indevidamente tratado pode acarretar em sérios problemas ambientais.

Não é reportado na literatura o uso do PS por *L. plantarum* para produção de AL, somente para produção de biomassa (HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016) e para produção de D-tagatose (JAYAMUTHUNAGAI et al., 2017), o que indica que a bactéria *L. plantarum* é capaz de assimilar este coproduto agroindustrial.

Sendo assim, tem-se como objetivo do presente trabalho avaliar os efeitos dos diferentes componentes do meio de cultivo, agitação e temperatura, visando maximizar a produção de AL.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Micro-organismo

A bactéria *L. plantarum* INCQS 00007 foi disponibilizada pelo Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, localizada no Rio de Janeiro - RJ.

2.1.2 Permeado de soro

Foi utilizado o PS em pó cedido pelo Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - CETEC - UNIVATES, em Lajeado-RS, produzido pela empresa *Arla Foods Ingredients*, na Dinamarca, contendo aproximadamente 85 % (m v⁻¹) de lactose (Anexo B).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

2.2.1 Caracterização do PS

2.2.1.1 Composição proximal

O conteúdo de umidade foi determinado usando a metodologia da AOAC (2000) (Método nº 935.29).

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla usando a metodologia da AOAC (2000) (Método nº 923.03).

O teor de nitrogênio foi determinado através do método de *Kjeldahl* usando a metodologia da AOAC (2000) (Método nº 920.87), sendo o conteúdo de proteínas calculado multiplicando por 6,38, sendo este fator utilizado para produtos lácteos.

O teor de lipídios foi determinado de acordo com método do butirômetro, utilizado para leite e produtos lácteos (MAPA, 2014).

O teor de carboidratos foi determinado por diferença.

2.2.1.2 Análise de minerais

Primeiramente as amostras foram digeridas em triplicata, utilizando 0,4 g de amostra com 2,5 mL de ácido nítrico (Vetec, Brasil) e 3 mL de peróxido de hidrogênio (Synth, Brasil) durante 12 h, após adicionou-se 2,5 mL de ácido nítrico e colocou-se em bloco digestor por 2 h a uma temperatura de 150 °C. Para a determinação dos elementos foi utilizado um Espectrômetro de Absorção Atômica (modelo AA800, *Perkin Elmer*, EUA), sendo operado com chama de ar acetileno fornecido pela Air Liquide (Brasil), e linhas de ressonância principais para Ca, K, Mg e Na (422,6 nm, 766,5 nm, 285,2 nm e 588,9 nm, respectivamente). Foram preparadas curvas de calibração utilizando diluições adequadas das soluções padrões adquiridas comercialmente. A análise foi realizada no Laboratório de Eletro-espectro Analítica (LEEA) e no Laboratório de Análise Instrumental da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

2.2.2 Determinação de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N)

Os teores de C, H e N no PS, bem como do extrato de levedura (EL), extrato de carne (EC) e peptona foram determinados em analisador elementar CHNS/O (modelo 2400 Série II,

Perkin Elmer, EUA) (WALLNER-KERSANACH; RIBEIRO; MACHADO, 2010), sendo as análises realizadas no Laboratório de Hidroquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Para calibração do equipamento foi utilizada acetônida como material de referência.

2.3 CULTIVOS COM *L. plantarum*

2.3.1 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foi utilizado um tubo de cultura microbiana reativada, sendo raspada com 10 mL de água peptonada 0,1 % (m v⁻¹), transferindo a suspensão para *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de caldo *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) (MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960), contendo (g L⁻¹): peptona (10), EC (10), EL (5), glicose (20), *Tween* 80 (1), citrato de amônia (2), acetato de sódio tri-hidratado (5), sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,1), sulfato de manganês tetra-hidratado (0,05) e fosfato de potássio dibásico (2).

A suspensão foi incubada a 37 °C em frascos sem agitação até atingir a DO 1,0, sendo esta atingida em aproximadamente 5 h.

2.3.2 Delineamento experimental *Plackett Burman*

Um delineamento experimental *Plackett Burman* (PB) foi proposto, composto por 12 variáveis, sendo elas as concentrações dos componentes do caldo MRS modificado pela substituição da glicose pelo PS, agitação e temperatura, a fim de determinar os efeitos dos fatores sobre as respostas biomassa e AL, conforme Tabela 1.

Os cultivos foram realizados em incubadora refrigerada (Tecnal TE-420, Brasil), em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 200 mL de meio, inoculados com *L. plantarum* em volume correspondente a 10 % (v v⁻¹) do volume final.

Foram retiradas alíquotas a cada 24 h, totalizando 96 h de cultivo, sendo estas centrifugadas (Cientec CT-5000R, Brasil) para as determinações analíticas no sobrenadante (pH, item 2.4.1; açúcares redutores (AR), item 2.4.3; AL, item 2.4.4) e sedimento (biomassa, item 2.4.2).

Tabela 1 - Matriz do delineamento experimental PB com valores reais (codificados)

Ensaio	Variáveis											
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂
1	40(+1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	5(+1)	0,5(-1)	0(-1)	2(+1)	0,1(+1)	0(-1)	100(+1)	32(-1)
2	40(+1)	10(+1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	1,5(+1)	0(-1)	0(-1)	0,1(+1)	0,05(+1)	0(-1)	42(+1)
3	40(+1)	10(+1)	20(+1)	0(-1)	0(-1)	0,5(-1)	2(+1)	0(-1)	0(-1)	0,05(+1)	100(+1)	32(-1)
4	40(+1)	10(+1)	20(+1)	20(+1)	0(-1)	0,5(-1)	0(-1)	2(+1)	0(-1)	0(-1)	100(+1)	42(+1)
5	20(-1)	10(+1)	20(+1)	20(+1)	5(+1)	0,5(-1)	0(-1)	0(-1)	0,1(+1)	0(-1)	0(-1)	42(+1)
6	40(+1)	0(-1)	20(+1)	20(+1)	5(+1)	1,5(+1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0,05(+1)	0(-1)	32(-1)
7	20(-1)	10(+1)	0(-1)	20(+1)	5(+1)	1,5(+1)	2(+1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	100(+1)	32(-1)
8	40(+1)	0(-1)	20(+1)	0(-1)	5(+1)	1,5(+1)	2(+1)	2(+1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	42(+1)
9	40(+1)	10(+1)	0(-1)	20(+1)	0(-1)	1,5(+1)	2(+1)	2(+1)	0,1(+1)	0(-1)	0(-1)	32(-1)
10	20(-1)	10(+1)	20(+1)	0(-1)	5(+1)	0,5(-1)	2(+1)	2(+1)	0,1(+1)	0,05(+1)	0(-1)	32(-1)
11	20(-1)	0(-1)	20(+1)	20(+1)	0(-1)	1,5(+1)	0(-1)	2(+1)	0,1(+1)	0,05(+1)	100(+1)	32(-1)
12	40(+1)	0(-1)	0(-1)	20(+1)	5(+1)	0,5(-1)	2(+1)	0(-1)	0,1(+1)	0,05(+1)	100(+1)	42(+1)
13	20(-1)	10(+1)	0(-1)	0(-1)	5(+1)	1,5(+1)	0(-1)	2(+1)	0(-1)	0,05(+1)	100(+1)	42(+1)
14	20(-1)	0(-1)	20(+1)	0(-1)	0(-1)	1,5(+1)	2(+1)	0(-1)	0,1(+1)	0(-1)	100(+1)	42(+1)
15	20(-1)	0(-1)	0(-1)	20(+1)	0(-1)	0,5(-1)	2(+1)	2(+1)	0(-1)	0,05(+1)	0(-1)	42(+1)
16	20(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0,5(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	0(-1)	32(-1)
17	30(0)	5(0)	10(0)	10(0)	2,5(0)	1(0)	1(0)	1(0)	0,05(0)	0,025(0)	50(0)	37(0)
18	30(0)	5(0)	10(0)	10(0)	2,5(0)	1(0)	1(0)	1(0)	0,05(0)	0,025(0)	50(0)	37(0)
19	30(0)	5(0)	10(0)	10(0)	2,5(0)	1(0)	1(0)	1(0)	0,05(0)	0,025(0)	50(0)	37(0)
20	30(0)	5(0)	10(0)	10(0)	2,5(0)	1(0)	1(0)	1(0)	0,05(0)	0,025(0)	50(0)	37(0)

X₁ permeado de soro (g L⁻¹); X₂ extrato de levedura (g L⁻¹); X₃ extrato de carne (g L⁻¹); X₄ peptona (g L⁻¹); X₅ acetato de sódio (g L⁻¹); X₆ Tween 80 (g L⁻¹); X₇ fosfato de potássio (g L⁻¹); X₈ citrato de amônio (g L⁻¹); X₉ sulfato de magnésio (g L⁻¹); X₁₀ sulfato de manganês (g L⁻¹); X₁₁ agitação (rpm) e X₁₂ temperatura (°C)

2.3.3 Ajuste do pH do meio ao longo do cultivo

Após se verificar quais as variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$) na concentração do AL, foi proposto um novo cultivo para a melhor condição do PB, onde o pH do meio foi ajustado (NaOH 4N) para 5,5-6,0 em 18 h de cultivo.

2.3.4 Efeito da concentração do PS na produção de AL

Foram testadas as concentrações de PS de 60, 80, 120 e 160 g L⁻¹, com o pH do meio ajustado (NaOH 4N) para 5,5-6,0 em 18, 42, 66, 90 e 116 h.

2.3.5 Cultivos em batelada alimentada

O cultivo referente à batelada alimentada iniciou com 40 g L⁻¹ de PS, sendo realizadas duas alimentações de 10 mL de 40 g L⁻¹ cada, totalizando 120 g L⁻¹ de PS, após a coleta de amostra nos tempos de 48 e 96 h, pois nestes tempos foi verificada a queda acentuada da concentração do substrato.

2.4 PARÂMETROS DETERMINADOS AO LONGO DO CULTIVO

2.4.1 Determinação do pH

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

2.4.2 Determinação da biomassa

A biomassa foi monitorada por medida da absorbância a 600 nm do sedimento ressuspensionado em água, baseado no procedimento descrito por Trindade, Munhoz e Burkert (2015), sendo expressa em massa seca (g L⁻¹), obtida a partir de uma curva de calibração previamente determinada (Apêndice A - Figura h).

2.4.3 Determinação de açúcares redutores (AR)

A concentração de AR foi determinada pelo método do ácido 3,5 ácido dinitrossalicílico, de acordo com Miller (1959), com medida de absorbância a 540 nm a partir de uma curva padrão de lactose, com faixa de linearidade de 0,03 a 0,4 g L⁻¹ (Apêndice C).

2.4.4 Determinação do AL

Às amostras (sobrenadante) foi adicionada acetona PA (1:3 v v⁻¹) para remoção de proteínas, sendo centrifugadas a 13.000 × g por 15 min. A acetona foi evaporada em banho termostatizado (Stern 6, Brasil) a 37 °C e borbulhamento de ar através de uma bomba de aquário (SC-7500) por 2 min, sendo as amostras devidamente diluídas, filtradas em membrana hidrofílica de 0,22 µm e transferidas para *vials*. A metodologia utilizada para a detecção do AL foi descrita por Oliveira, Buzato e Haully (2005). O AL foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (*Shimadzu*, Japão), utilizando uma coluna *Aminex HPX - 87H* (300 x 7,8 mm) (*Bio-Rad*, EUA), uma pré- coluna (*Bio-Rad*, EUA), detector UV/Visível a 210 nm e solução de H₂SO₄ (0,005 M) como fase móvel, com um fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura de 35 °C. O volume de injeção foi de 20 µL, com tempo de corrida de 25 min, sendo o tempo de retenção do AL de aproximadamente 12 min. A concentração de AL foi determinada através de uma curva padrão de AL (Sigma, Aldrich), com faixa de linearidade de 1,0 a 7,0 g L⁻¹ (Apêndice E).

2.4.5 Fatores de conversão

Foram calculados os fatores de conversão de substrato em biomassa (Y_{X/S}), substrato em produto (Y_{P/S}) e biomassa em produto (Y_{P/X}) de acordo com as Equações 1, 2 e 3, respectivamente (HISS, 2001):

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (1)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (2)$$

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

Onde:

X: Concentração de biomassa (g L⁻¹) ao final do cultivo;

X₀: Concentração de biomassa (g L⁻¹) inicial;

P: Concentração de AL (g L⁻¹) ao final do cultivo;

P₀: Concentração de AL (g L⁻¹) inicial;

S: Concentração de AR (g L⁻¹) ao final do cultivo;

S₀: Concentração de AR (g L⁻¹) inicial.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos efeitos das variáveis sobre as respostas biomassa e AL, no delineamento PB, utilizou-se o *software Statistica 5.0* (StatSoft Inc., EUA) (MONTGOMERY, 2004), sendo que para a construção dos gráficos utilizou-se o *software OriginPro 8* (OriginLab, EUA).

Todos os demais experimentos foram realizados em triplicata. Os valores médios e desvios-padrão referentes à caracterização química do PS, pH, biomassa, concentração de lactose e concentração de AL foram calculados através do *software Statistica 5.0* (StatSoft Inc., EUA). Os dados foram submetidos à Análise de Variância e teste de Tukey (MONTGOMERY, 2004), a fim de verificar a existência de diferenças significativas ($p \leq 0,0$) sendo que para a construção dos gráficos utilizou-se o *software OriginPro 8* (OriginLab, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO PS

A Tabela 2 apresenta a composição proximal e a composição de minerais do PS.

Pode-se observar que as concentrações encontradas estão de acordo com o laudo fornecido pela *Arla Foods Ingredients* (Anexo B), apresentando uma alta concentração de carboidratos e baixa concentração de proteínas.

De acordo com os resultados de minerais do PS, pode-se observar que o mesmo possui uma maior concentração de K, seguido por Na, Ca e Mg. De acordo com RUSSO (2016), o PS possui de 8 a 20 % de minerais, sendo rico em nutrientes como cálcio, potássio e sódio, contém de 68 a 85 % de lactose, em média 3 a 8 % de proteínas, e tende a não conter gordura pois, assim como as proteínas, devida à alta massa molar, fica retida pela membrana na fração do concentrado.

Tabela 2 - Composição proximal em base seca e de minerais (mg kg⁻¹) do PS*

Composição proximal do PS			
Proteínas (%)	Cinzas (%)	Lipídios (%)	Carboidratos (%)
1,37 (0,12)	5,80 (0,06)	ND	92,83
Composição de minerais (mg kg ⁻¹)			
Sódio (Na)	Potássio (K)	Magnésio (Mg)	Cálcio (Ca)
5942,95 ± 450,95	14042,55 ± 43,80	1253,35 ± 41,65	4309,90 ± 92,75

* Média (desvio padrão), n = 3. ** ND: não detectado

MRS é o meio padrão geralmente utilizado no cultivo de BAL, por ser um meio bastante completo, uma vez que o crescimento destas bactérias requer nutrientes complexos e minerais específicos (GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009; STANIER et al., 1986), sendo este composto pelos minerais magnésio, potássio, sódio, entre outros. Uma vez que o PS já possui os minerais em quantidades apreciáveis, pode ser viável diminuir as concentrações destes no meio de cultivo.

3.2 DETERMINAÇÃO DE C, H E N

A Tabela 3 apresenta os resultados do percentual de carbono, nitrogênio e hidrogênio do PS, EL, EC e peptona utilizados.

De acordo com Cipolatti (2012), a concentração de carbono e nitrogênio do EL foi de 38,40 e 10,67 %, respectivamente, já os teores de carbono e nitrogênio encontrados para a peptona foram de 43,47 e 14,45 %, respectivamente. valores similares aos encontrados no presente trabalho. Por outro lado, para o PS e EC não é mencionado na literatura o percentual de carbono e nitrogênio.

Tabela 3 - Análise elementar do PS, EL, EC e peptona

Amostra	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Hidrogênio (%)
PS	37,76	0,23	3,79
EL	39,12	10,66	6,23
EC	39,90	12,18	6,14
Peptona	43,47	15,32	6,32

PS: permeado de soro; EL: extrato de levedura; EC: extrato de carne

3.3 ACOMPANHAMENTO DOS CULTIVOS DO PB

A Figura 1 apresenta o acompanhamento da biomassa e pH, enquanto a Figura 2 apresenta a concentração de AR e AL ao longo das 96 h de cultivo.

Ao analisar a biomassa pode-se observar que maiores concentrações foram encontradas nos Ensaios 3, 6 (Figura 1a), 7, 10 e 11 (Figura 1c), e nos ensaios correspondentes ao ponto central (Ensaios 17 a 20, Figura 1b), sendo estas, respectivamente, de 3,17; 3,01; 2,33; 2,88; 2,69 e em média 2,07 g L⁻¹ (ponto central), em 96 h de cultivo. Pode-se verificar que todos os ensaios citados, que apresentaram as maiores concentrações de biomassa, foram cultivos empregando a temperatura de 32 °C, com exceção do ponto central (Figura 1b), no qual se utilizou a temperatura de 37 °C, não possuindo outra relação entre as maiores concentrações encontradas e as variáveis estudadas (apenas a temperatura), o que corrobora com o resultado encontrado na Tabela 6, onde a temperatura foi o parâmetro mais influente dentre os estudados.

Ao analisar o consumo de lactose, pode-se verificar que nos ensaios onde houve um maior crescimento celular foram também os que apresentaram um maior consumo da lactose, como nos Ensaios 3, 6 (Figura 2a), 7, 10 e 11 (Figura 2c), que apresentaram um consumo de 70,73; 78,83; 95,15; 93,43 e 94,06 %, respectivamente, e também no ponto central (Figura 2b), em média de 81,62 %.

Pode-se perceber que em muitos ensaios a lactose foi pouco consumida, por exemplo, nos Ensaios 2, 12 (Figura 1a) e 5 (Figura 1c), em que obteve-se apenas 12,56; 45,09 e 28,12 % de lactose consumida, enquanto que nos demais ensaios mais de 50 % da lactose foi consumida.

Figura 1 - Acompanhamento da biomassa (a,b,c) e pH (d,e,f) ao longo do tempo nos ensaios do PB

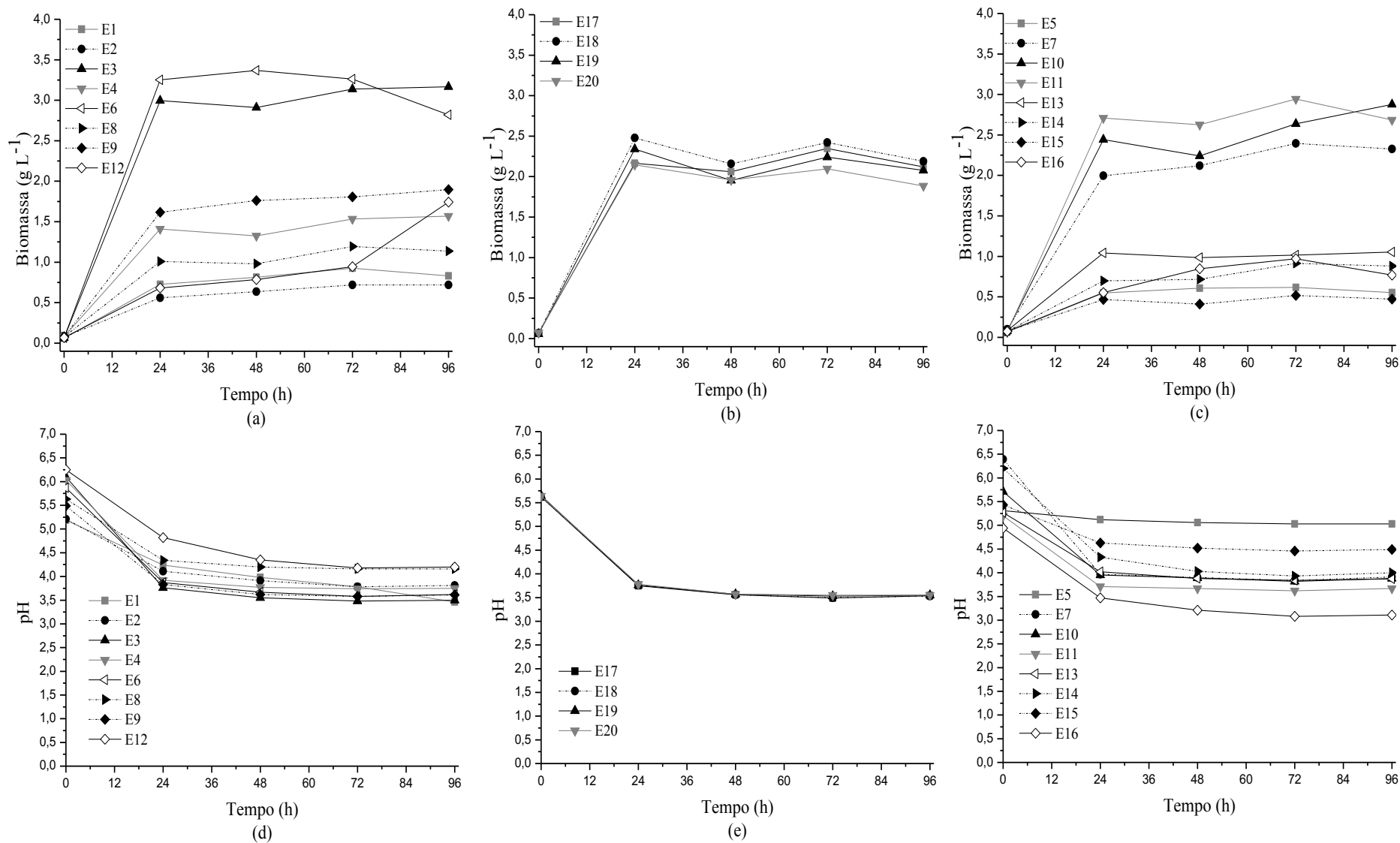
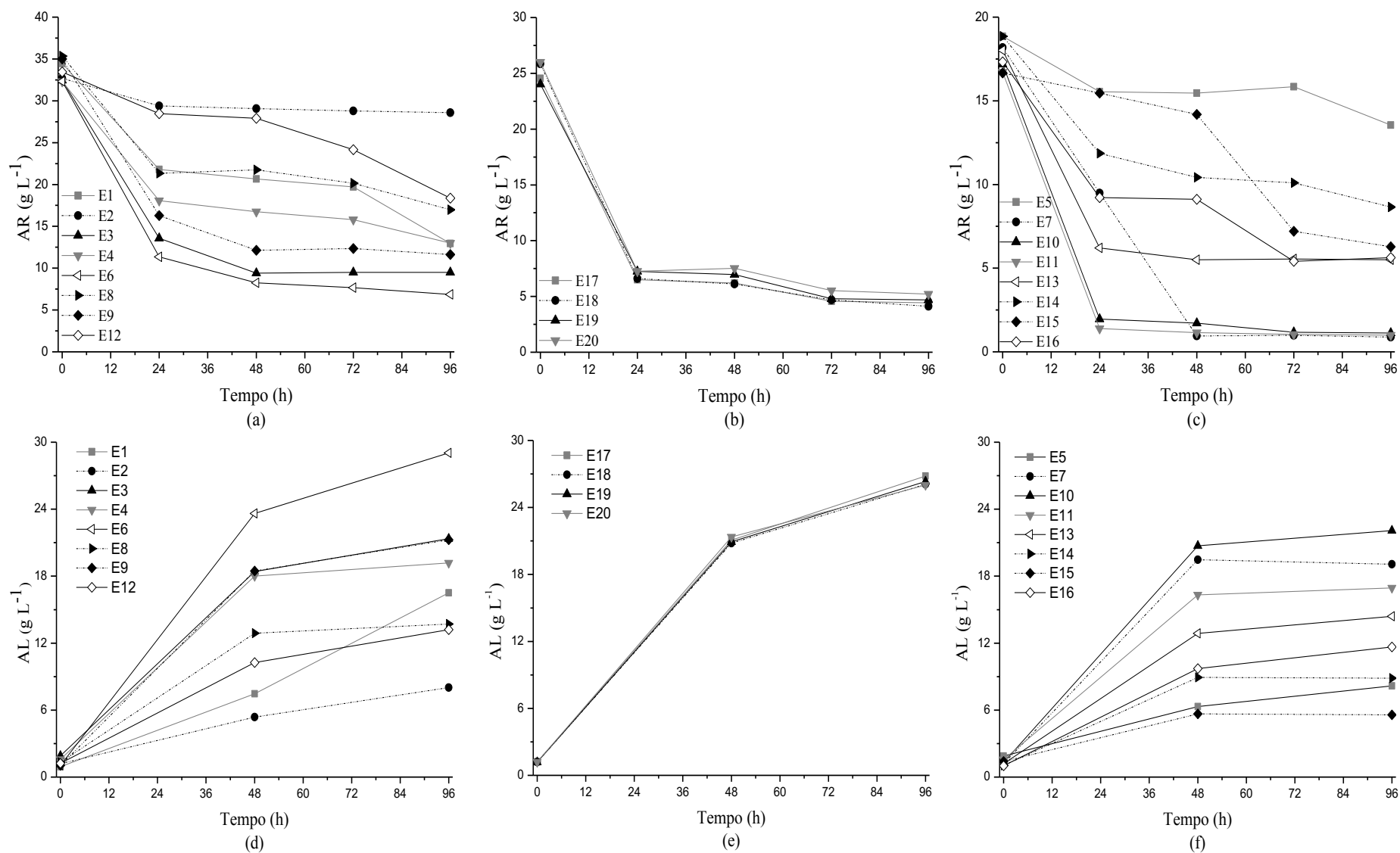


Figura 2 - Acompanhamento dos AR (a,b,c) e AL (d,e,f) ao longo do tempo nos ensaios do PB



O pH final ficou em média 3,8. Os ensaios onde os maiores valores de pH foram encontrados foram aqueles onde não houve um crescimento muito acentuado da bactéria nem um consumo muito acentuado da lactose, por exemplo, nos Ensaios 5, 8, 12 (Figura 1d) e Ensaio 15 (Figura 1f). Se por um lado o decréscimo do pH pode indicar o aumento da concentração de AL no meio, por outro lado pode ocasionar a inibição da bactéria pelo fato da acidificação muito acentuada do meio.

Ao analisar o AL, a menor concentração de AL foi encontrada no Ensaio 15 (Figura 2f), sendo esta de apenas 5,57 g L⁻¹ em 96 h de cultivo, o que se justifica pelo fato do mesmo não possuir EC e a temperatura ser muito elevada (42 °C). Nos Ensaios 8 e 12 (13,72 e 13,20 g L⁻¹ de AL, respectivamente) os mesmos valores de EC e temperatura foram utilizados, mas o meio continha 40 g L⁻¹ de PS, diferentemente do Ensaio 15 (Figura 2f), composto por apenas 20 g L⁻¹ de PS, ou seja, uma maior concentração inicial do substrato resultou em maior concentração de lactose e outros nutrientes disponíveis no meio. A condição representada pelos pontos centrais (Ensaios 17 a 20, Figura 2e) também possibilitaram alcançar uma alta concentração de AL (em média 26,3 g L⁻¹). Pode-se ainda observar que no Ensaio 16 (Figura 2f) foi obtida uma concentração de AL bastante significativa, sendo esta de 11,65 g L⁻¹, considerando que todas as variáveis apresentavam-se no nível -1, constituindo um meio composto apenas por 20 g L⁻¹ de PS e 0,5 g L⁻¹ de *Tween* 80, o que se pode justificar pelo fato do PS possuir alguns dos minerais necessários que o micro-organismo necessita para seu crescimento e consequente produção de AL, como observado em sua composição de minerais, onde o mesmo possui sódio, potássio e magnésio (Tabela 2).

A maior concentração de AL (29,04 g L⁻¹) foi encontrada no Ensaio 6 (Figura 2d), sendo que neste ensaio também foi observada alta concentração de biomassa (2,82 g L⁻¹) (Figura 1a), bem como alto consumo da lactose (Figura 2a), restando apenas 6,85 g L⁻¹ de lactose ao utilizar 40 g L⁻¹ de PS (Figura 3b). Neste ensaio foram empregados 40 g L⁻¹ de PS, 20 g L⁻¹ de EC, 20 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de acetato de sódio, 1,5 g L⁻¹ de *Tween* 80, 0,05 g L⁻¹ de sulfato de manganês, sem agitação e com temperatura de 32 °C, correspondendo a um acréscimo de 73,9 % na produção de AL quando comparada com a condição inicialmente testada (Artigo 1).

A Tabela 4 mostra os valores da biomassa e AL em 96 h de cultivo para os ensaios do PB, pois foi o tempo em que se verificou os maiores valores de biomassa e AL, enquanto que a Tabela 5 apresenta os efeitos das variáveis sobre as respostas citadas. Dados adicionais são apresentados no Apêndice D.

Tabela 4 - Matriz do delineamento experimental PB com valores codificados e suas respectivas respostas

Ensaio	Variáveis												AL (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂		
1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	16,51	0,83
2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	8,02	0,72
3	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	21,35	3,17
4	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	19,19	1,57
5	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	8,18	0,55
6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	29,04	2,82
7	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	19,07	2,33
8	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	13,72	1,14
9	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	21,27	1,90
10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	22,08	2,88
11	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	16,95	2,69
12	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	13,20	1,74
13	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	14,40	1,05
14	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	8,86	0,88
15	-1,	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	5,57	0,47
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	11,65	0,77
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,81	2,12
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,07	2,19
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,32	2,08
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,01	1,88

X₁ permeado de soro (g L⁻¹); X₂ extrato de levedura (g L⁻¹); X₃ extrato de carne (g L⁻¹); X₄ peptona (g L⁻¹); X₅ acetato de sódio (g L⁻¹); X₆ Tween 80 (g L⁻¹); X₇ fosfato de potássio (g L⁻¹); X₈ citrato de amônio (g L⁻¹); X₉ sulfato de magnésio (g L⁻¹); X₁₀ sulfato de manganês (g L⁻¹); X₁₁ agitação (rpm) e X₁₂ temperatura (°C) e AL: ácido láctico

Tabela 5 - Efeitos das variáveis sobre biomassa e AL em 96 h de cultivo

Variáveis	Biomassa				AL			
	Efeito (g L ⁻¹)	Erro padrão	t (7)	p-valor	Efeito (g L ⁻¹)	Erro padrão	t (6)	p-valor
Média*	1,69	0,09	17,80	<0,01	21,47	3,58	5,99	<0,01
PS	0,28	0,21	1,33	0,22	4,44	1,60	2,77	0,03
EL	0,35	0,21	1,66	0,14	2,26	1,60	1,41	0,21
EC*	0,73	0,21	3,46	0,01	3,71	1,60	2,31	0,05
Peptona	0,33	0,21	1,55	0,16	1,98	1,60	1,24	0,26
Acetato de sódio	0,15	0,21	0,69	0,51	2,92	1,60	1,82	0,12
<i>Tween</i> 80	0,19	0,21	0,90	0,39	1,70	1,60	1,06	0,33
Fosfato de potássio*	0,44	0,21	2,06	0,08	0,15	1,60	0,09	0,93
Citrato de amônio	-0,06	0,21	-0,26	0,80	1,29	1,60	0,80	0,45
Sulfato de magnésio	-0,14	0,21	-0,66	0,53	-2,36	1,60	-1,47	0,19
Sulfato de manganês*	0,70	0,21	3,28	0,01	1,52	1,60	0,95	0,38
Agitação	0,38	0,21	1,77	0,12	1,25	1,60	0,78	0,46
Temperatura*	-1,16	0,21	-5,44	<0,01	-8,35	1,60	-5,21	<0,01

*Variáveis significativas (p<0,1)

PS: permeado de soro; EL: extrato de levedura; EC: extrato de carne; AL: ácido lático

De acordo com a Tabela 5 pode-se observar que apenas o EC e a temperatura foram as variáveis que apresentaram efeito significativo concomitantemente para as duas respostas em estudo, biomassa e AL, e que o EL, peptona, acetato de sódio, *Tween* 80, citrato de amônio, sulfato de magnésio e a agitação não apresentaram efeitos significativos ($p < 0,1$) para ambos os parâmetros estudados.

Ao avaliar somente a biomassa como resposta, pode-se observar que o EC, fosfato de potássio, sulfato de manganês e temperatura foram os parâmetros que apresentaram efeito significativo ao nível de 90% de confiança. A variação da concentração do EC de 0 g L^{-1} (nível -1) para 20 g L^{-1} (nível +1) resultou em um efeito positivo de $0,73 \text{ g L}^{-1}$ na biomassa; ao variar o fosfato de potássio do nível -1 (0 g L^{-1}) para o nível +1 (2 g L^{-1}) resultou em um incremento de $0,44 \text{ g L}^{-1}$ na resposta biomassa; para o sulfato de manganês, a variação de 0 g L^{-1} (nível -1) para $0,05 \text{ g L}^{-1}$ (nível +1) resultou em um incremento de $0,70 \text{ g L}^{-1}$ na mesma resposta; e, para a temperatura, um acréscimo de $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (nível -1) para $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (nível +1) resultou em um efeito negativo (redução) de $1,16 \text{ g L}^{-1}$ na biomassa. As demais variáveis não apresentaram efeito significativo ($p > 0,1$) sobre esta resposta.

Ao analisar o AL como resposta, verificou-se que somente o PS, o EC e a temperatura foram as variáveis que apresentaram efeito significativo ao nível de 90 % de confiança. A variação da concentração do PS de 20 g L^{-1} (nível -1) para 40 g L^{-1} (nível +1) resultou em um efeito positivo de $4,44 \text{ g L}^{-1}$. Ao variar o EC do nível -1 (0 g L^{-1}) para o nível +1 (20 g L^{-1}) resultou em um incremento de $3,71 \text{ g L}^{-1}$ nesta resposta e, para a temperatura, um acréscimo de $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (nível -1) para $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (nível +1) resultou em um efeito negativo de $8,35 \text{ g L}^{-1}$ na concentração de AL. As demais variáveis não apresentaram efeito significativo ($p > 0,1$).

Inicialmente, os resultados obtidos no PB nos levaram a concluir que o aumento da concentração do PS e do EC para valores ainda maiores resultariam em maiores concentrações de AL. Por outro lado, ao verificar o consumo do substrato (Figuras 1 a 5), pode-se observar que quantidades expressivas de lactose não foram consumidas em muitos ensaios, fato possivelmente associado à inibição do crescimento microbiano pela acidificação do meio, já que o pH final atingiu valores ao redor de 3,5. De acordo com Kashket (1987), dependendo da cepa de *Lactobacillus*, suas funções celulares são inibidas quando o pH diminui abaixo de 4,4. Desta forma, o aumento destas concentrações possivelmente implicaria em maiores parcelas de substrato não consumido, uma vez que, provavelmente, houve a

inibição do crescimento da bactéria pela acidificação do meio a valores abaixo dos tolerados pela bactéria.

Sendo assim, optou-se por repetir o experimento correspondente ao Ensaio 6 do PB (40 g L⁻¹ de PS, 20 g L⁻¹ de extrato de carne, 20 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de acetato de sódio, 1,5 g L⁻¹ de *Tween* 80, 0,05 g L⁻¹ de sulfato de manganês, sem agitação, na temperatura de 32 °C), em triplicata, ajustando o pH do meio, em 18 h de cultivo, pois foi verificado no cultivo anterior um decréscimo bastante acentuado do pH neste tempo, a fim de verificar se havia inibição da bactéria e se a mesma seria capaz de consumir toda a fonte de carbono presente e, conseqüentemente, aumentar a concentração do AL.

3.4 AJUSTE DO pH AO LONGO DO CULTIVO

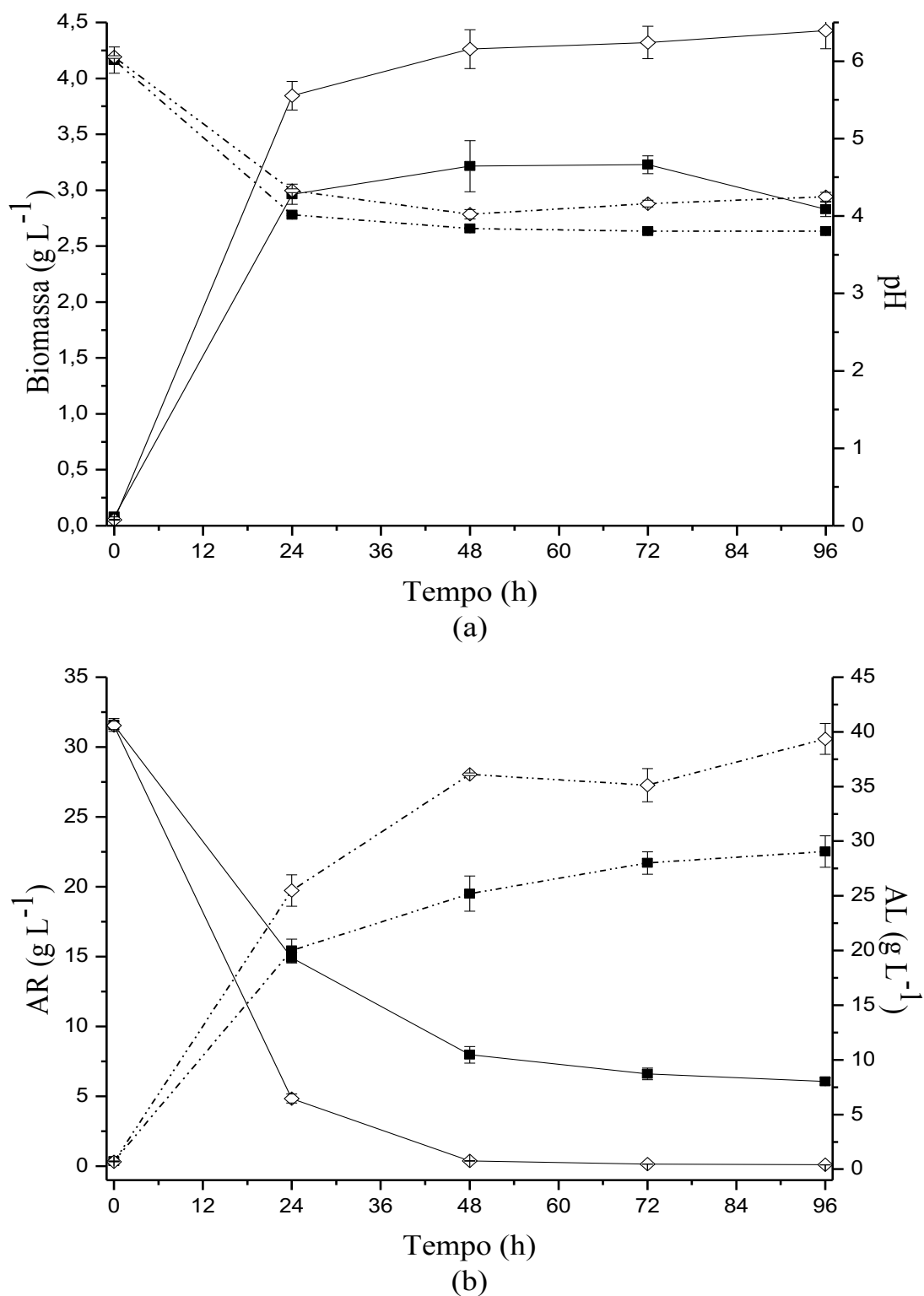
A Figura 3a apresenta o acompanhamento da biomassa e pH e a Figura 3b apresenta a concentração de AR e a concentração de AL ao longo do tempo para a melhor condição do PB (Ensaio 6) com e sem ajuste do pH ao longo do cultivo.

De acordo com a Figura 3, pode-se observar uma diferença bastante acentuada nos dois cultivos. Ao ajustar o pH do meio de cultivo, a concentração de biomassa passou de $3,23 \pm 0,08$ para $4,43 \pm 0,16$ g L⁻¹, o pH de $3,80 \pm 0,01$ manteve-se em torno de $4,25 \pm 0,06$, a concentração de AR não consumidos passou de $6,06 \pm 0,25$ para $0,09 < 0,01$ g L⁻¹, e a concentração do AL passou de $29,05 \pm 1,44$ para $39,36 \pm 1,41$ g L⁻¹.

Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que o ajuste do pH na faixa de 5,5-6,0, resultou em uma maior concentração de biomassa, maiores valores de pH, consumo total do substrato e maiores concentrações de AL, o que indica que a acidez do meio estava inibindo o crescimento da bactéria e, como consequência, impedindo a total conversão da lactose em AL.

Panesar et al. (2010), utilizando a bactéria *Lactobacillus casei*, e como fonte de carbono soro de leite, avaliaram o efeito de diversos valores de pH inicial (5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 6,8) na produção do AL, obtendo como melhor resposta o pH de 6,5, alcançando 33,73 g L⁻¹ de AL, ao utilizar 35 g L⁻¹ de soro de leite, sendo observado um alto consumo da lactose e produção do AL, levando em consideração a concentração inicial da fonte de carbono. Foi ainda observado que entre os pH estudados a concentração do AL manteve-se muito similar, havendo uma diminuição mais acentuada na concentração do AL apenas em pH 5,0.

Figura 3 - Acompanhamento da (a) biomassa e pH, (b) AR e AL da melhor condição do PB* ao longo do tempo (■) sem ajuste do pH, (◇) com ajuste do pH, sendo () biomassa e AR e (--) pH e AL



* 40 g L⁻¹ de PS, 20 g L⁻¹ de EC, 20 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de acetato de sódio, 1,5 g L⁻¹ Tween 80, 0,05 g L⁻¹ de sulfato de manganês, sem agitação na temperatura de 32 °C. PS: permeado de soro; EC: extrato de carne; AR: açúcares redutores; AL: ácido láctico

Mussato et al. (2008), utilizando *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20, em meio MRS com 50 g L⁻¹ de glicose, encontraram 8,33 g L⁻¹ de AL sem ajuste do pH e 23,46 g L⁻¹ de AL quando o pH foi ajustado em 6,0.

Sendo assim, optou-se por manter o pH do meio ajustado e aumentar a concentração do PS, de 40 para 60, 80, 120 e 160 g L⁻¹ a fim de aumentar a concentração do AL.

3.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO PS

A Figura 4 (a) apresenta o acompanhamento da biomassa e pH e a Figura 4 (b) apresenta o consumo de AR e a concentração de AL ao longo do tempo para os cultivos utilizando 60, 80, 120 e 160 g L⁻¹. Os principais parâmetros dos cultivos são apresentados na Tabela 7.

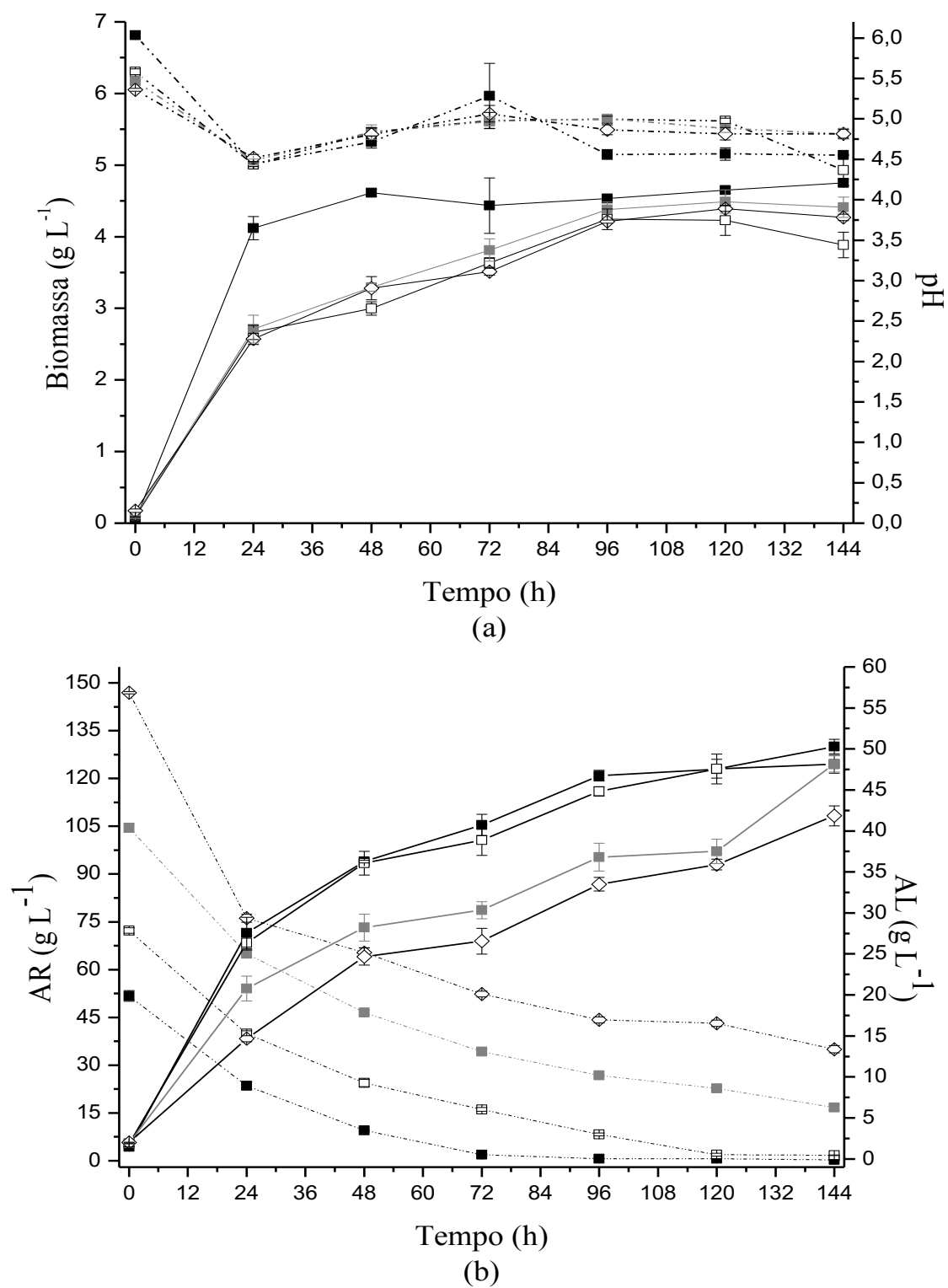
Pode-se observar que a biomassa máxima encontradas no cultivo utilizando 60 g L⁻¹, foi de 4,75 g L⁻¹, não diferindo significativamente ($p>0,05$) da concentração de 120 g L⁻¹, sendo esta de 4,49 g L⁻¹, e esta última não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) das concentrações de 80 e 160 g L⁻¹ de PS (4,24 e 4,39 g L⁻¹, respectivamente). O pH, como pode-se observar, manteve-se praticamente constante devido ao ajuste do mesmo ao longo do cultivo, com a finalidade de impedir a inibição da bactéria pela acidificação do meio.

Ao utilizar 60 e 80 g L⁻¹ de PS a lactose foi totalmente consumida em 72 h e 120 h de cultivo, respectivamente, sendo que o mesmo comportamento não foi encontrado para as demais concentrações (120 e 160 g L⁻¹ de PS), ou seja, a lactose não foi totalmente consumida pela bactéria, restando ainda 16,67 e 34,98 g L⁻¹, respectivamente, de substrato não consumido no meio.

A maior concentração de AL encontrada foi de 50,30 g L⁻¹, ao utilizar a menor concentração de PS (60 g L⁻¹), obtendo-se um $Y_{P/S}$ de 0,95 g g⁻¹; seguida pela concentração de 80 g L⁻¹, onde a concentração de AL foi de 48,14 g L⁻¹ e $Y_{P/S}$ 0,66 g g⁻¹. Ao utilizar 120 e 160 g L⁻¹ de PS, a concentração do AL foi de 48,17 e 41,84 g L⁻¹, respectivamente, sendo que o $Y_{P/S}$ reduziu para 0,53 e 0,36 g g⁻¹, respectivamente.

Ao observar os demais parâmetros do processo pode-se observar que o maior $Y_{X/S}$ foi obtido ao utilizar 60 g L⁻¹ de PS (0,09 g g⁻¹), diferindo significativamente ($p<0,05$) das demais concentrações de PS.

Figura 4 - Acompanhamento da (a) biomassa e pH, (b) AR e AL ao longo do tempo, utilizando (■) 60, (□) 80, (▣) 120 e (◇) 160 g L⁻¹ de PS, sendo a (—) biomassa e AL e (---) pH e AR



AR: açúcares redutores; AL: ácido lático

Pode-se também observar altos valores de $Y_{P/X}$ para todas as concentrações de PS, demonstrando a alta capacidade do micro-organismo na formação do produto. Já a maior produtividade foi encontrada ao utilizar 60 g L⁻¹ de PS, não diferindo significativamente ($p>0,05$) das concentrações de 80 e 120 g L⁻¹ de PS.

Os resultados indicam que ao utilizar a partir de 80 g L⁻¹ de PS houve uma redução expressiva no $Y_{P/S}$, indicando redução da conversão do substrato disponível em produto, sendo que nas concentrações mais elevadas (120 e 160 g L⁻¹) pode ter ocorrido inibição da bactéria pela alta concentração inicial do substrato. De acordo com Fonseca e Teixeira (2007), em concentrações de substrato muito elevadas, o próprio substrato pode ocasionar a inibição do micro-organismo.

Tabela 6 - Biomassa máxima, AL, AR residual, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ e produtividade em AL para diferentes concentrações iniciais de PS em 144 h de cultivo*

PS (g L ⁻¹)	$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	AL (g L ⁻¹)	AR residual (g L ⁻¹)
60	4,75 (0,05) ^a	50,30 (0,89) ^a	0,28 (< 0,01) ^d
80	4,24 (0,14) ^b	48,14 (1,09) ^a	1,69 (0,09) ^c
120	4,49 (0,16) ^{a,b}	48,17 (0,98) ^a	16,67 (0,91) ^b
160	4,39 (0,04) ^b	41,84 (1,21) ^b	34,98 (0,13) ^a

PS (g L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
60	0,95 (0,03) ^a	0,09 (< 0,01) ^a	10,37 (0,29) ^b	0,34 (< 0,01) ^a
80	0,66 (0,02) ^b	0,05 (< 0,01) ^b	12,12 (0,66) ^a	0,32 (< 0,01) ^a
120	0,53 (0,01) ^c	0,05 (< 0,01) ^b	10,75 (0,05) ^b	0,32 (< 0,01) ^a
160	0,36 (0,01) ^d	0,04 (< 0,01) ^c	9,73 (0,35) ^b	0,28 (< 0,01) ^b

* Média (desvio padrão), n = 3. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa ($p<0,05$) para um mesmo parâmetro nas diferentes concentrações de PS. PS: permeado de soro; AL: ácido láctico; AR: açúcares redutores; $X_{\text{máx}}$: biomassa máxima; $Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/X}$: fator de conversão de biomassa em produto

Hujanen et al. (2001), utilizando uma cepa de *L. casei* com 80, 100, 130 e 160 g L⁻¹ de glicose, mantendo os demais componentes do meio MRS, encontraram aproximadamente 68, 80, 100 e 118 g L⁻¹ de AL, ou seja o aumento da fonte de carbono acarretou em um

aumento da concentração do AL, comportamento diferente do observado no presente trabalho, onde nas concentrações mais elevadas da fonte de carbono, a concentração de AL não aumentou proporcionalmente, ou até mesmo diminuiu, fato este provavelmente explicado por tratar-se de outra cepa, pois o mesmo comportamento foi observado por outros autores, tais como Lima, Coelho e Contiero (2010); Yu et al. (2008) e Coelho et al. (2011).

Lima, Coelho e Contiero (2010), cultivando *Lactobacillus* sp. LMI8 com 29,26; 55 e 80,74 g L⁻¹ de soro de leite, mantendo os demais componentes do meio MRS, obtiveram 12,98; 18,22 e 14,04 g L⁻¹ de AL, respectivamente, sendo encontrado um baixo consumo da lactose pelo micro-organismo, e também verificado uma possível inibição da bactéria pelo substrato, pois concentrações maiores de substrato não levaram a maiores concentrações de AL. Yu et al. (2008), utilizando uma cepa de *L. rhamnosus*, com 72, 120 e 168 g L⁻¹ de glicose, mantendo os demais constituintes do meio MRS, encontraram 71,5; 112,1; 61,7 g L⁻¹ de AL, respectivamente.

Coelho et al. (2011), utilizando *L. plantarum* com 70 g L⁻¹ de melaço, encontraram 63,40 g L⁻¹ de AL. Mantendo as mesmas concentrações do meio, aumentando apenas a concentração do melaço para 170 e 270 g L⁻¹, encontraram 85,55 e 78,30 g L⁻¹ de AL, respectivamente. Coelho et al. (2011), utilizando *L. plantarum*, em *shaker*, mas com 193,5 g L⁻¹ melaço, encontraram 94,85 g L⁻¹ de AL, relatando que aproximadamente um quarto do açúcar (50 g L⁻¹) não foi utilizado, indicando que possivelmente ocorreu a inibição do micro-organismo pela alta concentração inicial do substrato. Pode-se então observar que, dependendo do meio, não existe uma relação direta entre o aumento da concentração da fonte de carbono com o aumento da produção do AL, pois concentrações muito altas desta não necessariamente resultam em maiores concentrações de AL.

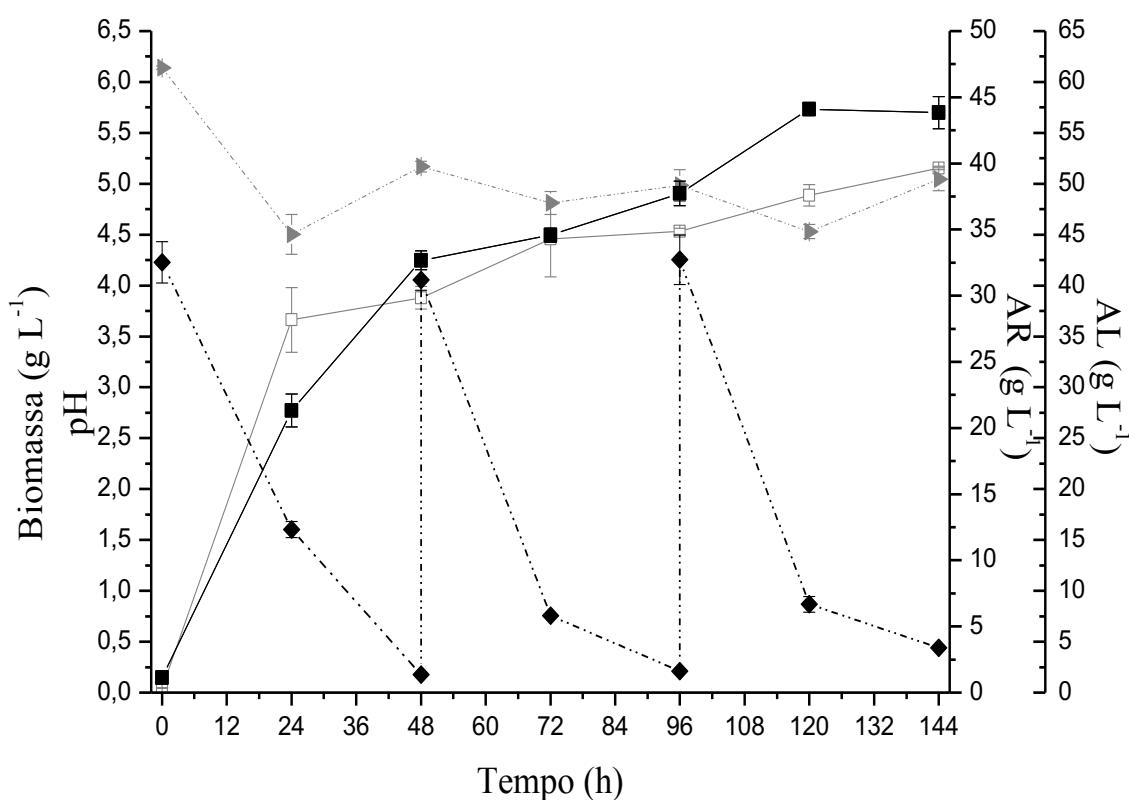
Tais resultados encontrados no presente trabalho nos levam a concluir que ao elevar a concentração de PS a valores maiores que 80 g L⁻¹ ocorreu uma inibição da bactéria pelo substrato (fonte de carbono em excesso), visto que as condições impostas ao cultivo da bactéria em estudo não foram capazes de proporcionar a conversão de todo substrato disponível no produto de interesse (AL). Sendo assim, optou-se por realizar um novo cultivo, com a melhor condição do PB, Ensaio 6, com ajuste do pH, sendo a concentração inicial do PS de 40 g L⁻¹ e realizadas mais duas alimentações de 40 g L⁻¹, pois foi a concentração onde houve o consumo total da lactose pela bactéria, sendo as alimentações realizadas nos tempos de 48 e 96 h, a fim de minimizar a inibição da bactéria pela alta concentração de inicial de substrato.

3.6 BATELADA ALIMENTADA

A Figura 5 apresenta o acompanhamento da biomassa, pH, AR e concentração de AL ao longo do tempo para o cultivo em batelada alimentada, já a Tabela 7 apresenta a comparação entre a batelada simples e a batelada alimentada.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que a maior concentração de biomassa foi de $5,15 \text{ g L}^{-1}$ ao utilizar a batelada alimentada correspondendo a duas alimentações em 48 e 96 h, totalizando 120 g L^{-1} de substrato, resultado este superior ao cultivo em batelada simples com substrato em quantidade equivalente ($4,41 \text{ g L}^{-1}$). O mesmo comportamento foi encontrado por Aguirre-Ezkauriatza et al. (2010), onde as culturas de *L. casei* quando alimentadas proporcionaram maiores concentrações de biomassa. O pH manteve-se praticamente constante, o que já era esperado, devido ao ajuste do mesmo ao longo do cultivo.

Figura 5 - Acompanhamento da ($\square$) biomassa, ($\blacktriangleright$) pH; ($\blacklozenge$) concentração de AR e ($\blacksquare$) concentração de AL ao longo do tempo, sendo () biomassa e AL e (--) pH e AR



AR: açúcares redutores; AL: ácido lático

Ao analisar a Tabela 7, pode-se verificar também que ao utilizar a alimentação em 48 h totalizando 80 g L⁻¹, foi encontrado o maior valor de Y_{P/S}, sendo estes de 0,77 g g⁻¹, diferindo significativamente (p<0,05) das demais condições, sendo encontrada uma maior produtividade também para esta condição de cultivo, diferindo significativamente (p<0,05) das demais condições.

Pode-se observar que a maior concentração de AL foi de 56,97 g L⁻¹ ao utilizar batelada alimentada (120 g L⁻¹ PS, totalizando duas alimentações durante o cultivo), diferindo significativamente (p<0,05) de quando utilizada a batelada simples (48,17 g L⁻¹) com concentração inicial de 120 g L⁻¹, verificando assim um aumento de quase 9 g L⁻¹ ao utilizar a batelada alimentada, restando apenas 3,40 g L⁻¹ de AR ao final da batelada alimentada e 16,67 g L⁻¹ de AR na batelada simples. Ao analisar a outra condição de alimentação (80 g L⁻¹ de substrato, com apenas uma alimentação durante o cultivo), pode-se verificar que a concentração de AL não diferiu significativamente (p>0,05) da batelada simples, restando em ambos os casos aproximadamente 1,70 g L⁻¹ de lactose no meio.

Tabela 7 - Biomassa, AL, AR residual, Y_{P/S}, Y_{X/S}, Y_{P/X} e produtividade em AL para os cultivos em batelada simples e batelada alimentada*

Estratégia de cultivo	Alimentação (g L ⁻¹ PS)	Biomassa (g L ⁻¹)	AL (g L ⁻¹)	AR (g L ⁻¹)
Batelada simples	80 (144 h)	3,88 (0,18) ^{c,B}	48,14 (1,09) ^{b,A}	1,69 (0,09) ^{c,A}
	120 (144 h)	4,41 (0,14) ^{b,B}	48,17 (0,98) ^{b,B}	16,67 (0,91) ^{a,A}
Batelada alimentada	40+40 (96 h)	4,53 (0,03) ^{b,A}	49,05 (1,22) ^{b,A}	1,61 (0,08) ^{c,A}
	40+40+40 (144 h)	5,15 (0,02) ^{a,A}	56,97 (1,58) ^{a,A}	3,40 (0,15) ^{b,B}

Estratégia de cultivo	Alim. (g L ⁻¹ PS)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	Y _{P/X} (g g ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Batelada simples	80 (144 h)	0,66(0,02) ^{b,B}	0,05(<0,01) ^{b,B}	12,12(0,66) ^{a,A}	0,32(<0,01) ^{c,B}
	120 (144 h)	0,53(0,01) ^{c,B}	0,05(<0,01) ^{b,A}	10,75(0,05) ^{b,A}	0,32(<0,01) ^{c,B}
Batelada alimentada	40+40 (96 h)	0,77(0,03) ^{a,A}	0,07(<0,01) ^{a,A}	10,61(0,22) ^{b,B}	0,50(0,01) ^{a,A}
	40+40+40 (144 h)	0,60(0,03) ^{b,A}	0,05(<0,01) ^{b,A}	10,87(0,34) ^{b,A}	0,38(0,01) ^{b,A}

* Média (desvio padrão), n = 3. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna para um mesmo parâmetro indicam diferença significativa entre as condições de cultivo testadas (p<0,05); letras maiúsculas diferentes na mesma coluna para um mesmo parâmetro indicam diferença significativa entre batelada e batelada alimentada (p<0,05) para a mesma quantidade de substrato alimentado

As estratégias de cultivo em batelada alimentada apresentaram maiores concentrações de biomassa nas duas condições de alimentação, e maior concentração de AL foi obtida com as duas alimentações (120 g L^{-1}), sendo que ao utilizar apenas uma alimentação (80 g L^{-1}), não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre a batelada simples e alimentada, já o teor de açúcar consumido foi menor na alimentação de 80 g L^{-1} , nas duas estratégias de alimentação.

4 CONCLUSÕES

Após o delineamento experimental PB, utilizando *L. plantarum* INCQS 00007, a maior concentração de AL ($29,04 \text{ g L}^{-1}$, Ensaio 6) foi obtida utilizando 40 g L^{-1} de PS, 20 g L^{-1} de EC, 20 g L^{-1} de peptona, 5 g L^{-1} de acetato de sódio, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Tween 80, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de manganês, sem agitação e com temperatura de $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que os parâmetros que apresentaram efeitos significativos foram o PS (positivo), EC (positivo) e a temperatura (negativo).

Como quantidades expressivas de lactose não foram consumidas em muitos ensaios do PB, optou-se pelo Ensaio 6, porque esta condição apresentou a máxima produção de AL, com ajuste do pH ao longo do cultivo, o que acarretou em um aumento da biomassa em 37,15% e da concentração de AL de 35,50 %, sendo que a lactose foi totalmente consumida e convertida em AL pela bactéria, o que indica que a acidez do meio estava inibindo o crescimento microbiano e como consequência impedindo a conversão da lactose em AL.

O aumento da concentração do PS de 40 para 60 e 80 g L^{-1} resultou em total consumo da lactose pela bactéria; o mesmo comportamento não foi observado nas concentrações de 120 e 160 g L^{-1} , indicando possível inibição pelo substrato. Já o cultivo utilizando batelada alimentada implicou em uma maior concentração de AL, sendo esta de $56,97 \pm 1,58 \text{ g L}^{-1}$ e $Y_{P/S}$ de $0,60 \pm 0,03 \text{ g g}^{-1}$ utilizando 120 g L^{-1} PS. Por outro lado, o maior $Y_{P/S}$ foi de $0,95 \pm 0,03 \text{ g g}^{-1}$ ao utilizar apenas 60 g L^{-1} de PS, o que correspondeu a $50,30 \pm 0,89 \text{ g L}^{-1}$ de AL, representando uma alta conversão do PS em AL, demonstrando ser a melhor alternativa, pois resultou no maior $Y_{P/S}$, além de apresentar um aumento da concentração de AL de 73,21 % quando comparada com a condição inicial, utilizando 40 g L^{-1} de PS, sem ajuste do pH ($29,04 \pm 0,03 \text{ g g}^{-1}$).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE-EZKAURIATZA, E. J.; AGUILAR-YÁÑEZ, J. M.; RAMÍREZ-MEDRANO, A.; ALVAREZ, M. M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2837-2844, 2010.

AOAC, **Official Methods of Analysis**. 17 ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

COELHO, L. F.; LIMA, C. J. B.; RODOVALHO, C. M.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. L. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n 1, p. 27-36, 2011.

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S. H.; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivates. **Microbiology Reviews**, v. 16, p. 221-231, 1995.

DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reatores biológicos - fundamentos e aplicações**. v. 1, Lisboa, Porto: Editora Lidel, 2007. 488 p.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 738-747, 2009.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In _____. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher Ltda, 2001. cap. 6. p. 93-121.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors effecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000.

HUGO, A. A.; BRUNO, F.; GOLOWCZYC, M. A. Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. **Food Science and Technology**, v. 69, p. 185-190, 2016.

HUJANEN, M.; LINKO, S.; LINKO, Y. Y.; LEISOLA, M. Optimization of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 126-130, 2001.

HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; D'HAENE, K.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; SWINGS, J. Accuracy of the species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 803-810, 2006.

JAYAMUTHUNAGAI, J.; SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M.; GAUTAM, P. D-Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 250-55, 2017.

KASHKET, E. R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 46, p. 233-244, 1987.

LAVARI, L.; IANNIELLO, R.; PAEZ, 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. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 322-330, 2015.

LIMA, C. J. B.; COELHO, L. F.; CONTIERO, J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 175-181, 2010.

LIU, B.; YANG, M.; QI, B.; CHEN, X.; SU, Z.; WAN, Y. Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As 1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 212-219, 2010.

LOPES, J. *Lactobacillus plantarum*. 2015. Disponível em: <http://knoow.net/ciencterravida/lactobacillus-plantarum/>. Acesso em: 16 de outubro de 2017.

MAN, J. D., ROGOSA, M., SHARPE, M. E., A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 23, p. 130-135, 1960.

MAPA - **Determinação de lipídios em leite e produtos lácteos pelo método butirômetro** - Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS, 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. 512 p.

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 437-444, 2008.

OLIVEIRA, A. R.; BUZATO, J. B.; HAULY, M. C. O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 53-60, 2005.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J.F; KNILL, J. F.; KOSSEVA, M. Production of L (+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 219-226, 2010.

PARK, K-Y.; KIM, B. K. Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. In: _____ **Lactic acid bacteria - microbiological and functional aspects**. v. 4. Boca Raton, Estados Unidos: Taylor and Francis Group, 2012. cap. 10. p. 187-212.

RUSSO, J. F. S. **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: 15 de março de 2018.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 554 p.

SOORO Ingredientes confiáveis. **Produtos**. 2017. Disponível em: <http://www.sooro.com.br/produtos/permeado-em-po/>. Acesso em: 02 de janeiro de 2017.

STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, J.L.; PAINTER, P.R. **General Microbiology**, 5th ed. London, England: Macmillan Education, 1986. 689 p.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Raw glycerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide-producing bacteria. **Journal of Applied Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 61-73, 2015.

WALLNER-KERSANACH, M.; RIBEIRO, A. R. L.; MACHADO, E. C. 2010. Análise Instrumental - Analisador Elementar CHNS/O. In: BAUMGARTEN, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M. & NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de análises em oceanografia química**. Editora da FURG, p. 145-166.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. 1995. **The genera of lactic acid bacteria**. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995. 397 p.

YU, L.; LEI, T.; REN, X.; PEI, X.; FENG, Y. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 496-502, 2008.

ZACARCHENCO, P.B.; VAN DENDER, A.G.F.; SPADOTI, L.M.; GALFINA, D.A.; TRENTA, F.K.H.S.; ALVES, A.T.S. Permeado de soro. **Guia de referência do setor lácteo 2012**, p. 48-52, 2012.

ZHANG, Y.; VADLANI, P. Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 694-699, 2015.

ARTIGO III

**EXOPOLISSACARÍDEO DE *Mesorhizobium loti* SEMIA 816 A PARTIR DE
PERMEADO DE SORO: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA**

EXOPOLISSACARÍDEO DE *Mesorhizobium loti* SEMIA 816 A PARTIR DE PERMEADO DE SORO: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso do permeado de soro (PS) no cultivo de *Mesorhizobium loti* Semia 816, visando produzir exopolissacarídeos (EPS), verificando o efeito de diferentes razões carbono/nitrogênio (C/N) e diferentes concentrações do substrato na produção do EPS e sua viscosidade. Primeiramente foram realizados seis cultivos: com manitol (C/N 96,5), substituindo o manitol pelo PS (C/N 60) e ajustando a concentração do extrato de levedura (EL) a fim de resultar na mesma razão C/N (96,5) utilizando o PS, com e sem ajuste inicial do pH. O ajuste do pH inicial mostrou-se um parâmetro importante e a maior viscosidade foi encontrada na razão de 60 em meio contendo PS. Diferentes razões C/N (96,5, 60, 40, 20 e 10) foram testadas, sendo encontrada uma maior concentração de EPS ($4,03 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$) com C/N 20 e viscosidade até mesmo superior à fonte de carbono padrão na razão C/N 96,5. A substituição do EL por água de maceração de milho (AMM) e nitrato também foi avaliada, entretanto, apesar do crescimento satisfatório com AMM, houve redução na produção de EPS. O aumento da concentração de PS para 20 e 30 g L⁻¹ mantendo C/N 20 resultou no incremento de produção do EPS. Com 20 g L⁻¹, *M. loti* Semia 816 produziu $8,21 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$ de EPS, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) da concentração de 30 g L⁻¹ ($9,46 \pm 0,80 \text{ g L}^{-1}$), obtendo um comportamento pseudoplástico para ambas as soluções de EPS (1 % m v⁻¹).

Palavras chave: Razão C/N. Coprodutos Agroindustriais. Bactérias Diazotróficas.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias diazotróficas são responsáveis pela fixação biológica do nitrogênio (N_2), convertendo o nitrogênio atmosférico em uma forma que pode ser utilizada pela célula, ou seja, uma forma assimilável (NH_3). Dentre estas bactérias têm-se as do gênero *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*, bactérias Gram-negativas, aeróbias, capazes de produzir desde homopolissacarídeos, como simples glicanas, até heteropolissacarídeos (MONTEIRO et al., 2012; RIBEIRO; BURKERT, 2016).

A produção de exopolissacarídeos (EPS) pode ser induzida como parte de uma resposta ao estresse, ou resposta a condições ambientais, como temperatura, pressão e intensidade da luz, sendo geralmente favorecida por excesso da fonte de carbono, concomitante com limitação de outro nutriente (FREITAS et al., 2010; DONOT et al., 2012). Os EPS são polímeros solúveis em água, com grande diversidade de propriedades reológicas e estruturais, possuindo diversas aplicações industriais, como agentes espessantes, estabilizantes, emulsificantes, texturizantes e gelificantes (BAJAJ et al., 2006; CANUTO, 2006).

A possibilidade de aplicações industriais de EPS produzidos por bactérias diazotróficas tem atraído o interesse de pesquisadores pelo estudo de parâmetros do processo relacionados à sua obtenção, bem como sua caracterização (CASTELLANE et al., 2014; CASTELLANE et al., 2015; CASTELLANE et al., 2017; MORETTO et al., 2015; RIBEIRO; BURKERT, 2016).

No cultivo dessas bactérias para produção de EPS, o manitol é geralmente a fonte de carbono utilizada (CASTELLANE et al., 2014; DUTA et al., 2004; STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012), sendo mencionado por Castellane e Lemos (2007) o uso de glicerol, galactose, glicose e sacarose no cultivo de duas cepas de *Rhizobium tropici* e, também, de coprodutos agroindustriais, tais como farelo de arroz (DEVI; VIJAYENDRA; SHAMALA, 2012), soro do leite (ZHOU et al., 2014) e água residuária de indústria de pescados (SELLAMI et al., 2015).

Neste contexto, o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande - FURG vem se dedicando ao uso de bactérias diazotróficas para produção de EPS com coprodutos agroindustriais. Ribeiro (2015) estudou a produção e caracterização de EPS a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meio à base de glicerol residual (GR), enquanto Oliveira (2017) estudou a caracterização do EPS produzido pela bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816 utilizando GR como fonte de carbono.

O permeado de soro (PS) é considerado um coproduto da indústria de laticínios, podendo constituir uma fonte de carbono promissora para cultivos microbianos, pois de acordo com a *Arla Foods Ingredients* (2017) é constituído de no mínimo 85% de lactose. O PS é obtido quando o soro de queijo é submetido à ultrafiltração para concentrar as proteínas, onde as proteínas remanescentes, juntamente com a lactose, sais minerais e vitaminas, ultrapassam a membrana para o permeado (ZACARCHENCO et al., 2012). Ressalta-se ainda que não há na literatura trabalhos que utilizem o PS como fonte de carbono na produção de EPS por bactérias diazotróficas.

Por outro lado, como fonte de nitrogênio geralmente utiliza-se extrato de levedura (EL) (RIBEIRO, 2015; OLIVEIRA, 2017), não sendo mencionada na literatura a utilização da água de maceração (AMM) para estas bactérias, apenas na produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (NASCIMENTO et al., 2015), de proteases por *Bacillus* sp.(NASCIMENTO; MARTINS, 2006; SILVA, 2006), de carotenóides bacterianos (CIPOLATTI, 2012) e também para produção de ácido láctico a partir de *L. rhamnosus* (VICTORELLI, 2011), o que significa que a AMM pode vir a constituir uma alternativa como fonte de nitrogênio no cultivo destes micro-organismos, pois a utilização de coprodutos acarreta a diminuição de custos com o meio.

Há relatos na literatura que os EPS são produzidos por excesso da fonte de carbono concomitante à limitação de outro nutriente, por exemplo nitrogênio, e que altos níveis deste podem inibir sua produção (BARBOSA et al., 2004; FREITAS et al., 2010), sendo então necessária uma investigação mais aprofundada acerca da relação entre as concentrações de carbono e nitrogênio utilizadas nos meios de cultura.

De acordo com o acima exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da razão C/N na produção de EPS no cultivo da bactéria *M. loti* Semia 816, bem como diferentes fontes de nitrogênio e concentração de PS, avaliando o comportamento reológico dos diferentes EPS produzidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Micro-organismos

A bactéria *M. loti* Semia 816 foi obtida do Banco de Culturas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária - FEPAGRO (Porto Alegre - RS).

2.1.2 Permeado de soro

Foi utilizado o PS em pó, cedido pelo Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - CETEC - UNIVATES, localizada em Lajeado-RS, sendo produzido pela empresa *Arla Foods Ingredients*, localizada na Dinamarca, contendo, aproximadamente 85 % (m v⁻¹) de lactose (Anexo B).

2.1.3 Água de maceração de milho e nitrato

A AMM foi cedida pela empresa *Ingredion Brasil Ing. Ind. Ltda.* (Mogi Guaçu, Brasil) (Anexo C). Como a AMM possuía muitos sólidos em suspensão, o que interferiria na determinação da concentração de biomassa, com o objetivo de eliminar estes sólidos a mesma foi centrifugada a $13000 \times g$ por 20 min (centrífuga *Eppendorf 5804R*, Alemanha) e o pellet lavado com água destilada, a fim de extrair compostos solúveis. Após, centrifugou-se novamente, repetindo mais duas vezes o procedimento. As centrifugações foram acompanhadas pela determinação da concentração de proteína no sobrenadante pelo método de Lowry et al. (1951), com medida de absorbância a 540 nm a partir de uma curva padrão de glicose (0,2 g L⁻¹) com faixa de linearidade de 0,01 a 0,11 g L⁻¹ (Apêndice F).

A outra fonte de nitrogênio utilizada foi o nitrato de sódio (NaNO₃) (Labsynth, Brasil), contendo no mínimo 99 % de pureza.

2.2 DETERMINAÇÃO DO CARBONO, HIDROGÊNIO E NITROGÊNIO

Os teores de C, H e N no PS, extrato de levedura (EL) e AMM foram determinados em analisador elementar CHNS/O (modelo 2400 Série II, *Perkin Elmer*, EUA) (WALLNER-KERSANACH; RIBEIRO; MACHADO, 2010), sendo determinados no Laboratório de Hidroquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

2.3 CULTIVOS COM *M. loti* Semia 816

2.3.1 Manutenção e reativação da cultura

A bactéria foi mantida refrigerada, sendo realizados repiques trimestrais utilizando Agar *Yeast Manitol* (YMA), contendo (g L⁻¹): manitol (10), K₂HPO₄ (0,1), KH₂PO₄ (0,4),

MgSO₄.7H₂O (0,2), NaCl (0,1), EL (0,4) e ágar (15), incubando-se em temperatura controlada (30 °C) por 48 h (DUTA et al., 2004).

2.3.2 Padronização do inóculo

Para o acompanhamento do crescimento bacteriano durante o preparo do inóculo foi utilizado um tubo da cultura reativada, sendo raspada com 10 mL de água peptonada 0,1 % (m v⁻¹), e a suspensão resultante transferida para cada frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de caldo YMA. A suspensão foi incubada a 30 °C e 200 rpm (Tecnal TE-420, Brasil), sendo retiradas alíquotas a cada 3 h nas primeiras 12 h de cultivo e, após, de 6 em 6 h até 48 h de cultivo. A densidade ótica (DO) foi medida a 600 nm em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220, China). Foi definido um valor de DO (Apêndice 2B), com o objetivo de padronizar o inóculo e utilizar as células na fase exponencial do crescimento celular.

2.3.3 Cultivo de *M. loti* Semia 816

Foram realizados cultivos em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 100 mL de meio, inoculados com suspensão da bactéria *M. loti* Semia 816, sendo que o inóculo correspondeu a 10 % (v v⁻¹) do volume final. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada (Tecnal TE-420, Brasil), a 30 °C e 200 rpm (DUTA et al., 2004), tendo como meio de referência o caldo YMA, contendo (g L⁻¹): K₂HPO₄ (0,1), KH₂PO₄ (0,4), MgSO₄.7H₂O (0,2), NaCl (0,1), EL (0,4), MnCl₂.4H₂O (0,12), CaCl₂.2H₂O (0,15) e manitol (10). A composição desse meio foi baseada no proposto por Duta et al. (2006), com adição de CaCl₂.2H₂O em substituição ao carbonato de cálcio, conforme sugerido por Staudt, Wolf e Shrout (2012), sendo realizados diferentes cultivos com a substituição do manitol pelo PS e do EL pela AMM e nitrato.

Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo, conforme descrito nos itens subsequentes, sendo estas centrifugadas (centrífuga *Eppendorf* 5804R, Alemanha) a 10000 x g por 20 min para as determinações analíticas no sobrenadante (pH, item 2.5.1, açúcares redutores, item 2.5.3, EPS, item 2.5.4) e sedimento (biomassa, item 2.5.2), sendo o EPS determinado somente ao final do cultivo (96 h).

2.3.3.1 Ensaios preliminares

Primeiramente foi realizado o cultivo com o meio padrão, utilizando como fonte de carbono manitol, na razão C/N 96,5, sendo avaliada a substituição do manitol pelo PS na mesma concentração, resultando na razão C/N de 60, e também utilizando PS e ajustando a concentração do extrato de levedura (EL) a fim de resultar a mesma razão C/N do meio padrão (96,5), com e sem ajuste do pH (7,0). Foram retiradas alíquotas a cada 2 h nas primeiras 8 h, para determinar a velocidade específica máxima de crescimento (μ) e após este tempo as alíquotas foram retiradas a cada 24 h até 96 h de cultivo.

2.3.3.2 Efeitos da razão C/N

Ao verificar que o ajuste inicial do pH e a razão C/N mostraram-se variáveis importantes no processo e que a bactéria foi capaz de assimilar o PS, foram propostos cultivos com ajuste do pH inicial em 7,0 nas razões C/N de 60, 40, 20 e 10, mantendo a concentração do PS em 10 g L^{-1} , modificando a concentração de extrato EL, conforme Tabela 1, sendo as alíquotas retiradas de 24 em 24 h até 96 h de cultivo.

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo em termos de concentração de EL para as diferentes razões C/N, mantendo 10 g L^{-1} de PS

Razão C/N	EL (g L^{-1})
60	0,40
40	0,75
20	1,90
10	5,25

PS: permeado de soro; EL: extrato de levedura

2.3.3.3 Fontes alternativas de nitrogênio: AMM e nitrato

Após a escolha da melhor razão C/N (item 2.3.3.2) foram propostos cultivos substituindo a fonte de nitrogênio (EL) por AMM ou por nitrato (NaNO_3) visando diminuir custos do processo. A concentração do PS foi mantida em 10 g L^{-1} , ajustando a concentração de AMM e NaNO_3 a fim de resultar na razão C/N desejada, conforme Tabela 1, sendo as alíquotas retiradas de 24 em 24 h até 96 h de cultivo para as determinações analíticas.

Tabela 2 - Composição do meio de cultivo em termos da fonte de nitrogênio para as diferentes razões C/N, mantendo 10 g L⁻¹ de PS

Razão C/N	Fonte de nitrogênio	Concentração da fonte de nitrogênio (g L ⁻¹)
20	AMM	6,12
96,5	AMM	0,60
20	Nitrato	1,00
96,5	Nitrato	0,10

PS: permeado de soro; AMM: água de maceração de milho

2.3.3.4 Efeitos da concentração do PS

Após verificar qual a fonte de nitrogênio mais se adequava ao cultivo, foi proposto o aumento da concentração do PS de 10 para 20 e 30 g L⁻¹, mantendo a razão C/N em 20, sendo as alíquotas retiradas de 24 h em 24 h até 96 h de cultivo, para as determinações analíticas.

Tabela 3 - Composição do meio de cultivo em termos da fonte de nitrogênio utilizando 20 e 30 g L⁻¹ de PS, mantendo a razão C/N de 20

PS (g L ⁻¹)	Fonte de nitrogênio	Concentração da fonte de nitrogênio (g L ⁻¹)
20	AMM	12,25
30	AMM	18,40
20	EL	3,8
30	EL	5,7

PS: permeado de soro; AMM: água de maceração de milho; EL: extrato de levedura

2.4 PARÂMETROS CINÉTICOS

2.4.1 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 ($\mu_{\text{máx}}$), em h⁻¹, foi definida pela Equação 1, calculada através do *software* Excel (*Microsoft Inc*, EUA).

$$\mu_{\max} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

2.4.2 Produtividade

A produtividade em EPS, g L⁻¹ h⁻¹ foi definida pela Equação 2.

$$Produtividade = \frac{EPS_{\max} - EPS_0}{t_f} \quad (2)$$

Onde:

EPS_{máx} = Concentração de EPS (g L⁻¹) atingida no t_f

EPS₀ = Concentração de EPS inicial (g L⁻¹)

t_f = tempo (h) de cultivo

2.4.3 Fator de conversão de substrato em produto

Os fatores de conversão de substrato em biomassa (Y_{X/S}), substrato em produto (Y_{P/S}) e biomassa em produto (Y_{P/X}) foram calculados de acordo com as Equações 3, 4 e 5, respectivamente (HISS, 2001):

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (4)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0} \quad (5)$$

Onde:

X: Concentração de biomassa (g L⁻¹) ao final do cultivo;

X₀: Concentração de biomassa (g L⁻¹) inicial;

P: Concentração de EPS (g L⁻¹) ao final do cultivo;

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

S: Concentração de AR (g L^{-1}) ao final do cultivo;

S_0 : Concentração de AR (g L^{-1}) inicial.

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Determinação do pH

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

2.5.2 Determinação da biomassa

A biomassa foi monitorada por medida da absorbância a 600 nm do sedimento ressuspensionado em água, baseado no procedimento descrito por Trindade, Munhoz e Burkert (2015), sendo expressa em massa seca (g L^{-1}), obtida a partir de uma curva de calibração previamente determinada (Apêndice 2A).

2.5.3 Determinação de açúcares redutores

A concentração de AR foi determinada pelo método do ácido 3,5 ácido dinitrossalicílico, de acordo com Miller (1959), com medida de absorbância a 540 nm a partir de uma curva padrão de lactose, com faixa de linearidade de 0,03 a 0,4 g L^{-1} (Apêndice C).

2.5.4 Determinação do EPS

O EPS produzido foi recuperado centrifugando-se o caldo fermentado a $13.000 \times g$ por 20 min (centrífuga *Eppendorf* 5804R, Alemanha), para remoção das células e precipitando o EPS no sobrenadante por adição de etanol (1:3 v v⁻¹). Em seguida, deixou-se em repouso por 24 h, centrifugou-se novamente nas mesmas condições, dissolveu-se em água Mili-Q e dialisou-se (limite de exclusão de 12.000 Da) por 72 h, sendo a água trocada duas vezes ao dia, para eliminar moléculas de menor massa molar. Após congelou-se em ultrafreezer (Liotop UFR30, Brasil) a -80°C por 48 h e liofilizou-se (Liotop L101, Brasil), a

-80 °C por 48 h, sendo conservados congelados. Para sua quantificação, após a segunda centrifugação, o EPS foi seco em estufa a 50 °C e quantificado por gravimetria.

2.5.5 Determinação da viscosidade

Para solubilização da amostra foi realizado o procedimento descrito por Xuewu et al. (1996), onde o EPS foi diluído em água destilada, agitado por 2 h, seguido de aquecimento a 60 °C por 20 min.

A viscosidade aparente (mPa s) em função da taxa de cisalhamento (s^{-1}) e os parâmetros índice de consistência e índice de comportamento de fluxo das soluções de EPS a 1 % (m v⁻¹) foram determinados em reômetro rotacional *cone / Plate DV-III Ultra* (Brookfield *cone / Plate version*, Estados Unidos), com *spindle* 51, temperatura de 25 °C e tempo de 1 a 110 s.

As propriedades reológicas das soluções de EPS produzido por *M. loti* Semia 816 foram avaliadas através do modelo matemático de *Ostwald-De-Waele* (Lei da Potência), conforme Equação 7 (ARANDA-SELVERIO et al., 2010; HAMINIUK et al., 2006). Para a regressão linear, plotou-se $\ln \gamma \times \ln \tau$, obtendo-se os valores de índice de consistência (K) e índice de comportamento de fluxo (n).

$$\tau = K\gamma^n \quad (7)$$

Onde:

τ = tensão de cisalhamento (mPa)

γ = taxa de deformação (s^{-1})

K = índice de consistência (mPa sⁿ)

n = índice de fluxo (adimensional)

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cultivos foram realizados em triplicata. Os valores médios e desvios-padrão foram calculados através do *software Statistica 5.0* (StatSoft Inc., EUA). Os dados foram submetidos à Análise de Variância e teste de *Tukey* (MONTGOMERY, 2004), a fim de

verificar a existência de diferenças significativas ($p \leq 0,0$). Para a construção das curvas utilizou-se o *software OriginPro 8* (OriginLab, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO SUBSTRATO

A AMM foi centrifugada (5 mL) e no sobrenadante foi encontrado $222,01 \pm 22,91 \text{ g L}^{-1}$ de proteína. Após a lavagem do *pellet* com água destilada (5 mL), e nova centrifugação, a concentração de proteína encontrada no sobrenadante foi de $38,58 \pm 2,81 \text{ g L}^{-1}$, sendo realizado o mesmo procedimento para as lavagens e centrifugações posteriores, sendo que os valores de proteína foram de $6,97 \pm 0,55 \text{ g L}^{-1}$ e $1,24 \pm 0,03 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim, optou-se por utilizar a AMM submetida a duas lavagens e centrifugações sucessivas, juntando os volumes de sobrenadante, recuperando a maior parte das proteínas e evitando uma diluição excessiva dos nutrientes.

A Tabela 4 apresenta os resultados do percentual de carbono e nitrogênio do PS, EL e AMM, que foram utilizados para calcular a razão C/N dos meios de cultivos.

Redução nos teores de C e N foi observada após lavagens e centrifugações sucessivas em virtude da diluição promovida. Por outro lado, não é mencionado na literatura o percentual de carbono e nitrogênio para o PS.

Tabela 4 - Análise elementar do PS, EL e AMM

Amostra	Carbono (%)	Nitrogênio (%)	Hidrogênio (%)
PS	37,76	0,23	3,79
EL	39,12	10,66	6,23
AMM bruta	21,87	5,82	10,86
AMM após duas centrifugações	12,16	2,70	1,46

PS: Permeado de soros; EL: extrato de levedura; AMM: água de maceração de milho

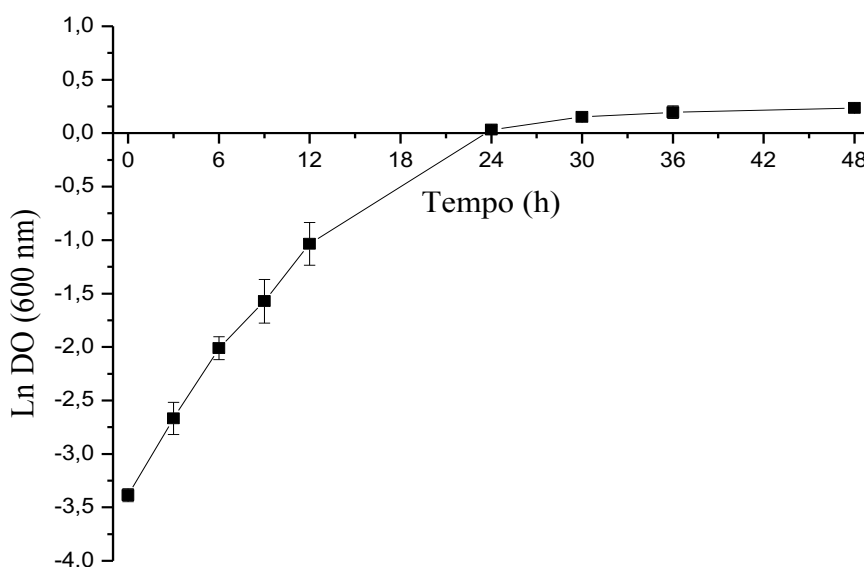
Ribeiro (2015) encontrou 39,63 e 12,06 % de carbono e nitrogênio, respectivamente, para o EL. De acordo com Cipolatti (2012), o teor de carbono e nitrogênio encontrado para o EL foi de 39,24 e 6,54 %, respectivamente, já a AMM foi de 17,83 e 3,80 %, respectivamente, sendo o valor encontrado para a amostra bruta, sem centrifugações, valores estes similares aos encontrados no presente trabalho.

No caso da utilização desses valores para calcular a razão C/N, tem-se a importância da determinação destes teores a cada diferente lote utilizado, pois se pode observar uma pequena variação nos teores de C, N e H para os diferentes lotes.

3.2 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

A Figura 1 apresenta o acompanhamento do ln (DO) para bactéria *M. loti* Semia 816. Para a padronização do preparo do inóculo, a DO escolhida foi 0,8, correspondente a ln (DO) de -0,22, o que ocorreu em aproximadamente 18 h de cultivo e correspondeu à fase exponencial de crescimento (Figura 1), sendo o mesmo valor utilizado por Staudt, Wolfe e Shrout (2012) ao utilizar uma cepa de *Rhizobium* e por Ribeiro (2015) e Oliveira (2017) para a mesma bactéria.

Figura 1 - Acompanhamento da ln (DO) para bactéria *M. loti* Semia 816



3.3 ENSAIOS PRELIMINARES

A Figura 2 apresenta o acompanhamento da concentração de biomassa e de AR no cultivo da bactéria *M. loti* Semia 816, onde a razão C/N do meio padrão (com manitol) é de 96,5. Inicialmente avaliou-se a substituição do manitol pelo PS na mesma concentração (10 g L⁻¹), resultando na razão C/N de 60, bem como a substituição do manitol pelo PS

(10 g L⁻¹) com modificação na concentração do EL (de 0,4 para 0,16 g L⁻¹) para manter a mesma relação C/N (96,5), com e sem ajuste do pH inicial do cultivo.

De acordo com a Figura 2 (a) e a Tabela 5, o cultivo em meio com PS, com razão C/N de 60 com ajuste do pH, foi o que promoveu um maior crescimento do micro-organismo, chegando a $0,72 \pm 0,04$ g L⁻¹ em 96 h de cultivo, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) do cultivo onde o pH não foi ajustado, sendo que se pode observar que a bactéria encontra-se ainda na fase exponencial de crescimento. Já o cultivo utilizando manitol como fonte de carbono, com ajuste do pH, alcançou $0,64 \pm 0,01$ g L⁻¹, diferindo significativamente do cultivo sem o ajuste do pH ($0,54 \pm 0,01$ g L⁻¹). O menor crescimento da bactéria ao utilizar o PS foi na maior razão C/N (96,5), sendo também observado que a bactéria ainda encontrava-se na fase de crescimento exponencial.

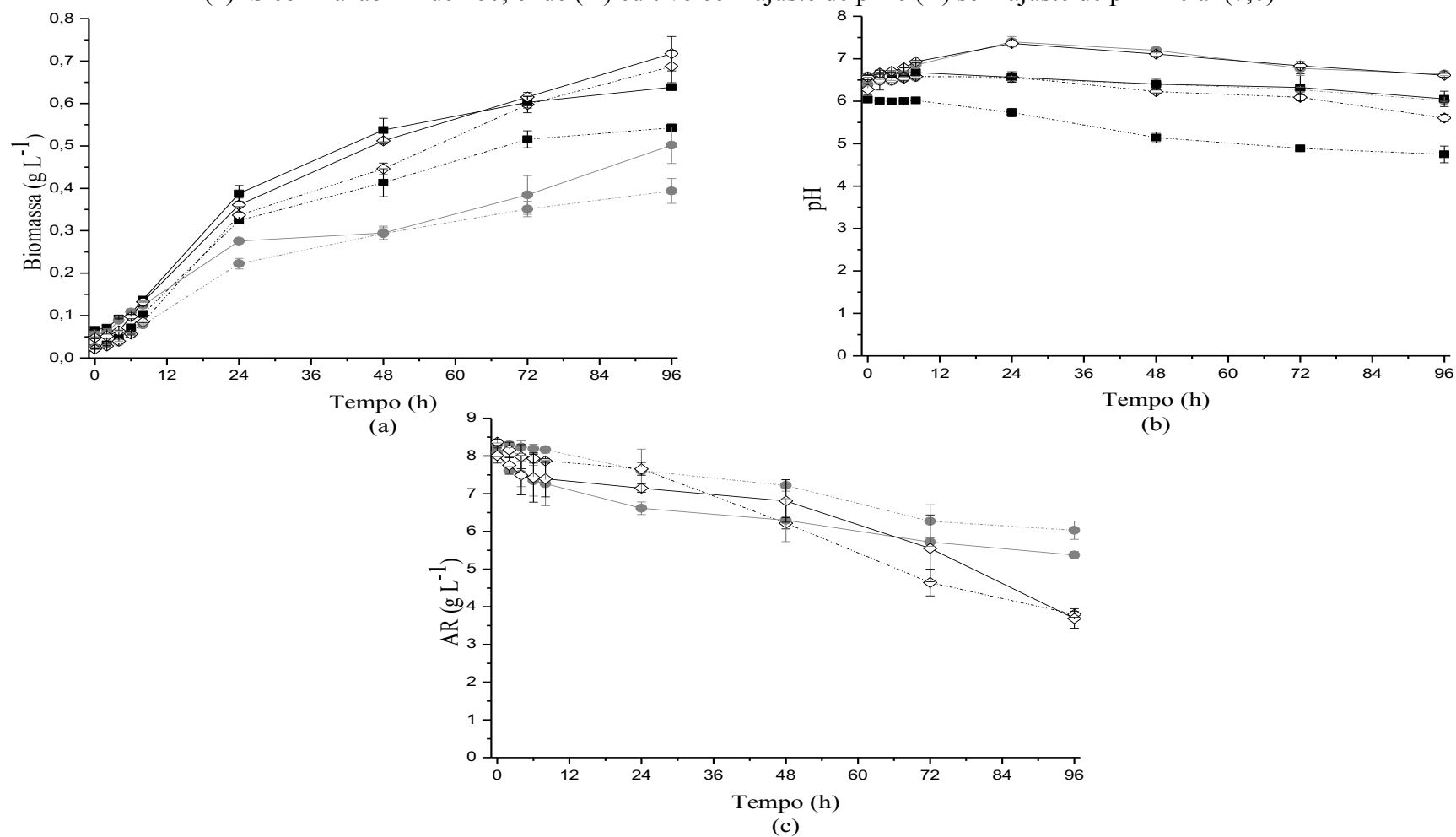
Pode-se observar que ao comparar os cultivos com e sem o ajuste do pH inicial, na maioria dos cultivos, onde foi realizado o ajuste do pH, houve um maior crescimento da bactéria em estudo, apenas com PS na razão C/N 60 foi observado não haver diferença significativa ($p > 0,05$) entre o cultivo com e sem ajuste do pH inicial (Figura 2a e Tabela 5).

Na Figura 2 (c), ao analisar a razão C/N de 96,5 a concentração de AR presente no meio em 96 h de cultivo foi de $6,03 \pm 0,24$ e $5,37 \pm 0,09$ g L⁻¹ sem e com ajuste de pH, respectivamente, diferindo significativamente entre si ($p < 0,05$) e ao analisar a razão C/N de 60, não houve diferença significativa entre os cultivos ($p > 0,05$), sendo as concentrações encontradas de $3,79 \pm 0,08$ e $3,69 \pm 0,25$ g L⁻¹ sem e com ajuste de pH, respectivamente. O que indica que o ajuste do pH inicial em 7,0 e a menor razão C/N favoreceram o consumo do substrato pela bactéria, o que está de acordo com Duta et al. (2004), que relata que o pH ideal para as bactérias diazotróficas é perto da neutralidade.

Na Figura 2 (b) pode-se observar que, de um modo geral, maiores valores de pH foram encontrados para os cultivos onde houve o ajuste inicial do pH, ou seja, pHs mais próximos da neutralidade ao final do cultivo.

Ao analisar a velocidade específica máxima de crescimento, pode-se observar que nos ensaios sem o ajuste do pH foram observados valores superiores aos ensaios com o ajuste de pH. Com relação à concentração de EPS, pode-se observar que a maior concentração ($1,57 \pm 0,10$ g L⁻¹) foi encontrada com ajuste do pH, em meio com manitol (C/N 96,5), não diferindo significativamente ($p > 0,05$) do PS com razão C/N de 60, sendo uma menor concentração ($1,12 \pm 0,04$ g L⁻¹) encontrada para o PS na razão C/N 96,5 (com ajuste do pH).

Figura 2 - Acompanhamento da (a) biomassa, (b) pH e (c) AR utilizando (■) manitol com razão C/N de 96,5, (○) PS com razão C/N de 96,5 e (◇) PS com razão de 60, onde (—) cultivo com ajuste de pH e (---) sem ajuste de pH inicial (7,0)



*Somente nos meios com permeado de soro; AR: açúcares redutores; PS: permeado de soro..

Tabela 5 - Biomassa máxima, velocidade específica máxima de crescimento, EPS e produtividade em EPS em 96 h de cultivo para *M. loti* Semia 816 nas diferentes condições de cultivo*

Razão C/N	Fonte de carbono	$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)		μ (h ⁻¹)	
		com ajuste	sem ajuste	com ajuste	sem ajuste
96,5	Manitol	0,64 (0,01) ^{b,A}	0,54 (0,01) ^{b,B}	0,09 (< 0,01) ^{c,B}	0,19 (< 0,01) ^{a,A}
96,5	PS	0,50 (0,04) ^{c,A}	0,39 (0,03) ^{c,B}	0,11 (< 0,01) ^{b,B}	0,15 (< 0,01) ^{c,A}
60	PS	0,72 (0,04) ^{a,A}	0,69 (0,04) ^{a,A}	0,13 (< 0,01) ^{a,B}	0,17 (< 0,01) ^{b,A}

Razão C/N	Fonte de carbono	EPS (g L ⁻¹)		Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)	
		com ajuste	sem ajuste	com ajuste	sem ajuste
96,5	Manitol	1,57 (0,10) ^{a,A}	0,66 (0,05) ^{c,B}	0,016 (0,001) ^{a,A}	0,007 (0,001) ^{c,B}
96,5	PS	1,12 (0,04) ^{b,A}	0,87 (0,03) ^{b,B}	0,011 (<0,001) ^{b,A}	0,009 (<0,001) ^{b,B}
60	PS	1,45 (0,07) ^{a,A}	1,10 (0,08) ^{a,B}	0,015 (< 0,001) ^{a,A}	0,011 (0,001) ^{a,B}

*Média (desvio padrão), n = 3. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as fontes de carbono e razão C/N para um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença significativa entre os parâmetros (com e sem ajuste) para uma mesma fonte de carbono e razão C/N ($p < 0,05$). PS: permeado de soro; EPS: exopolissacarídeos; $X_{\text{máx}}$: biomassa máxima; μ : velocidade específica máxima de crescimento

Valores inferiores de EPS foram encontrados quando o pH do meio não foi ajustado em todas as razões C/N estudadas, sendo que a produtividade em EPS seguiu o mesmo comportamento.

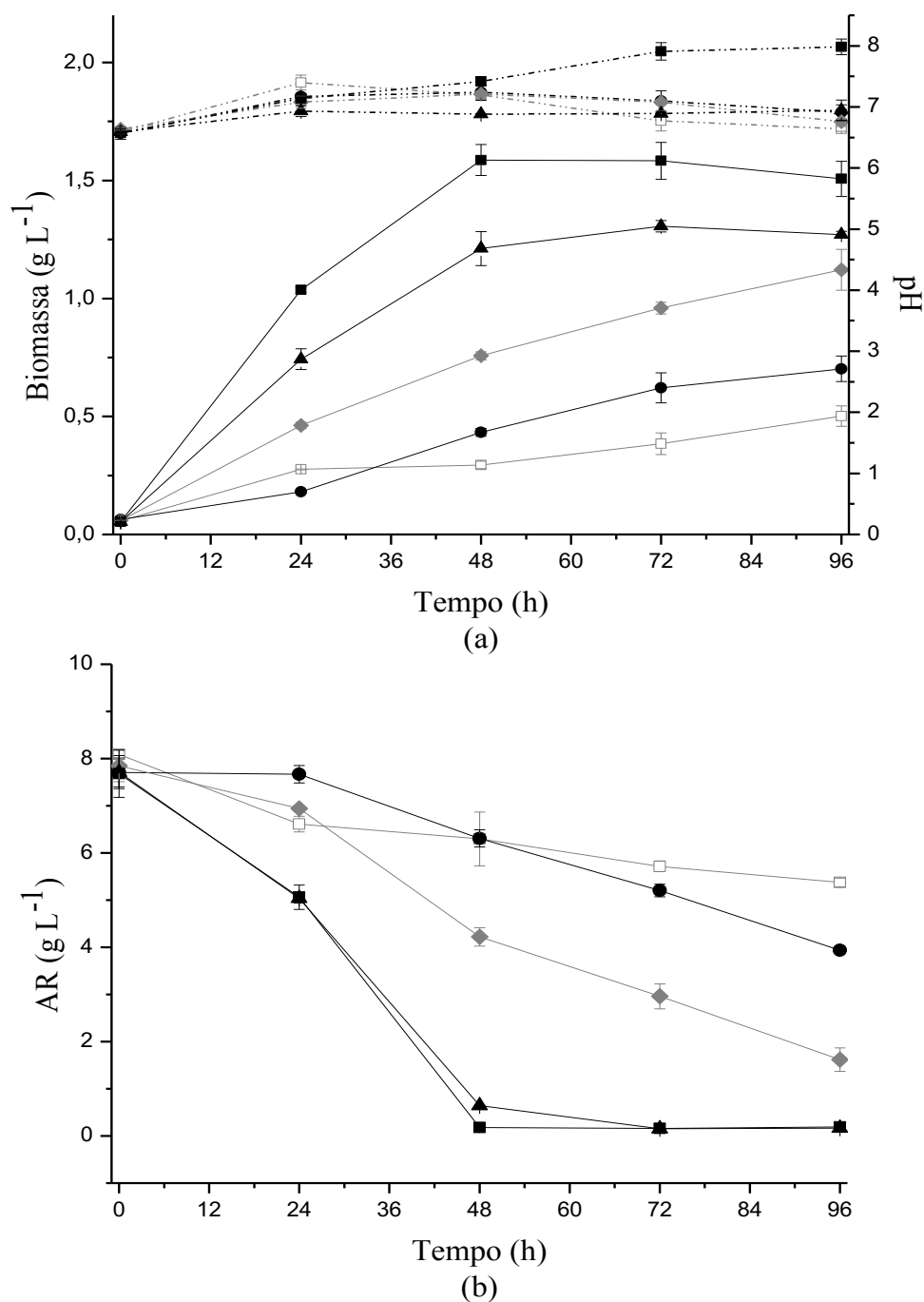
De acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que o pH inicial é uma variável importante do processo, e uma maior concentração do EPS, quando utilizado PS, foi encontrada quando utilizada a menor razão C/N (60), dentre as estudadas.

Assim, foram propostos novos experimentos onde o pH do meio foi ajustado em 7,0, sendo utilizadas razões C/N de 60, 40, 20 e 10.

3.4 EFEITOS DA RAZÃO C/N

A Figura 3 apresenta o acompanhamento da biomassa, pH e AR, com ajuste inicial do pH em 7,0, utilizando PS em diferentes razões C/N.

Figura 3 - Acompanhamento da (a) biomassa (—), pH (---) e (b) AR utilizando PS na razão C/N de (□) 6, (○) 10, (◇) 20, (▲) 40 e (■) 60



PS: permeado de soro; AR: açúcares redutores

Pode-se observar que ao analisar a biomassa (Figura 3a), quanto menor a razão C/N, maior a biomassa, sendo encontrado nas razões C/N de 10, 20, 40 e 60 valores de 1,59; 1,31; 1,12 e 0,70 g L⁻¹, respectivamente, e na razão C/N de 96,5 um valor de biomassa de 0,50 g L⁻¹. Ribeiro (2015), ao utilizar as razões C/N de 36, 61 e 94, encontrou $2,33 \pm 0,04$;

2,39 $\pm$ 0,04 e 1,69 $\pm$ 0,06 g L⁻¹, para a mesma bactéria com uma outra fonte de carbono (12,2 g L⁻¹ de GR), observado então o mesmo comportamento, ou seja, o aumento da razão C/N (diminuição da concentração de nitrogênio) acarreta diminuição da biomassa. O pH (Figura 3a) manteve-se praticamente constante, sendo observado um aumento no pH (aproximadamente 1,0) apenas na razão C/N de 10.

Quanto aos AR, pode-se verificar que nas razões C/N de 60 e 40 parte da lactose não foi consumida pelo micro-organismo, restando ainda 3,93 $\pm$ 0,04 e 1,72 $\pm$ 0,07 g L⁻¹ no meio, respectivamente. Nas demais razões C/N (10 e 20) a bactéria foi capaz de assimilar quase toda fonte de carbono presente no meio em apenas 48 h. A diminuição da razão C/N, ou seja, o aumento da concentração do EL (nitrogênio), favoreceu o maior crescimento celular, bem como o consumo da lactose presente no PS.

A Tabela 6 apresenta a biomassa máxima, concentração de EPS, produtividade em EPS, Y_{P/S}, Y_{X/S} e Y_{P/X} nas diferentes razões C/N.

Tabela 6 - Biomassa máxima, EPS, produtividade em EPS e Y_{P/S}, Y_{X/S}, e Y_{P/X} determinados em 96 h de cultivo nas diferentes razões C/N*

Razão C/N	X _{máx} (g L ⁻¹)	EPS (g L ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
96,5	0,50 (0,04) ^e	1,12 (0,04) ^d	0,012 (< 0,001) ^d
60	0,70 (0,05) ^d	1,58 (0,12) ^c	0,016 (0,001) ^c
40	1,12 (0,09) ^c	3,61 (0,20) ^b	0,038 (0,002) ^b
20	1,31 (0,02) ^b	4,03 (0,04) ^a	0,042 (< 0,001) ^a
10	1,59 (0,07) ^a	4,09 (0,11) ^a	0,043 (0,001) ^a
Razão C/N	Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	Y _{P/X} (g g ⁻¹)
96,5	0,41 (0,02) ^b	0,16 (0,01) ^a	2,52 (0,10) ^b
60	0,42 (0,03) ^b	0,17 (0,01) ^a	2,48 (0,15) ^b
40	0,59 (0,03) ^a	0,17 (0,02) ^a	3,40 (0,22) ^a
20	0,53 (0,05) ^a	0,16 (< 0,01) ^a	3,30 (0,07) ^a
10	0,55 (0,01) ^a	0,19 (0,01) ^a	2,82 (0,19) ^b

*Média (desvio padrão), n = 3. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as razões C/N para um mesmo parâmetro (p<0,05). EPS: exopolissacarídeos; X_{máx}: biomassa máxima; Y_{P/S}: fator de conversão de substrato em produto; Y_{X/S}: fator de conversão de substrato em biomassa; Y_{P/X}: fator de conversão de biomassa em produto

Pode observar que o maior valor encontrado para biomassa máxima foi ao utilizar a razão C/N de 10, havendo diferença ($p < 0,05$) significativa entre as demais razões estudadas. Ao analisar o $Y_{P/S}$ pode-se observar que maiores conversões de substrato em produto foram encontrados nas menores razões C/N (10, 20 e 40), não diferindo significativamente entre si ($p > 0,05$).

Ao analisar os parâmetros cinéticos do cultivo, pode-se observar que os maiores valores de fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foram encontrados ao utilizar as razões C/N 40, 20 e 10, não diferindo entre si ($p > 0,05$). Já ao analisar a conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) pode-se verificar que não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as razões C/N estudadas, indicando que a conversão do substrato em biomassa não é afetada pela limitação do nitrogênio. Entretanto, esta limitação implica em redução do consumo de substrato e, portanto, redução na biomassa atingida. Ao analisar $Y_{P/X}$ pode-se verificar maiores valores nas razões C/N de 20 e 40, indicando uma maior capacidade do micro-organismo para a formação do produto nestas condições.

Maiores concentrações de EPS foram encontradas em menores razões C/N, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as razões C/N de 10 e 20, sendo a concentração de EPS em torno de 4 g L^{-1} para ambas as razões C/N, sendo também encontrada uma maior produtividade para estas razões, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as razões citadas anteriormente, já que o EPS foi quantificado para ambas as razões C/N em 96 h de cultivo. A razão C/N 40 apresentou uma concentração expressiva de EPS, mas não superior à razão de 10 e 20, já as demais razões estudadas apresentaram valores bastante inferiores de EPS e, consecutivamente, menores produtividades. Comportamento contrário foi observado por Ribeiro (2015) para esta mesma bactéria, que encontrou utilizando $12,2 \text{ g L}^{-1}$ de GR uma concentração de EPS de 2,45; 4,90 e $3,9 \text{ g L}^{-1}$ de EPS ao utilizar uma razão C/N de 36, 61 e 132, respectivamente.

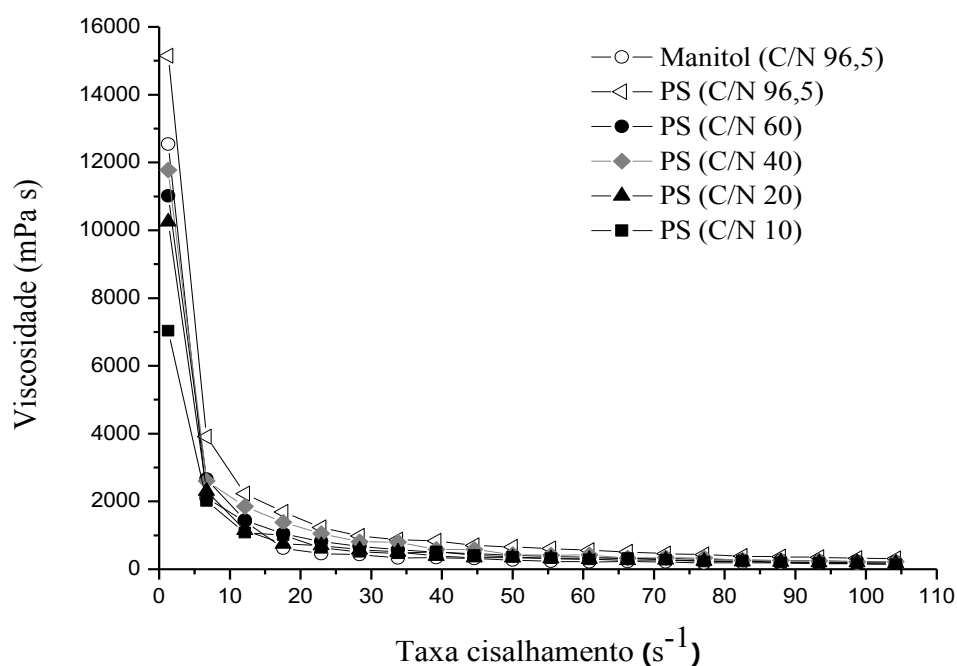
No referido estudo de Ribeiro (2015), houve um aumento da concentração de EPS com o aumento da razão C/N (diminuição da concentração de nitrogênio), chegando a um ponto onde provavelmente a concentração de nitrogênio ficou muito baixa, não havendo mais o aumento da concentração de EPS, pois o nitrogênio presente no meio se esgotou. No presente trabalho foi observado o contrário, onde a diminuição da razão C/N (aumento da concentração de nitrogênio), acarretou um aumento da concentração de EPS, o que indica que a razão C/N, bem como a fonte de carbono utilizada, influencia diretamente a produção do EPS.

Sendo assim, menores razões C/N resultaram em maiores concentrações de biomassa (Figura 3a), maior consumo da lactose (Figura 3b), bem como maiores concentrações de EPS (Tabela 6). Mesomo (2007) relata que o EPS é produzido muitas vezes durante a fase estacionária do crescimento celular, sendo então considerado um metabolismo secundário, não possuindo relação direta com o crescimento celular.

3.5 VISCOSIDADE PARA DIFERENTES RAZÕES C/N

O comportamento da viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das soluções de EPS 1% (m v⁻¹) produzidos pela bactéria *M. loti* Semia 816, a 25 °C, utilizando manitol (C/N 96,5) e PS nas diferentes razões C/N, pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Viscosidade para EPS (1 % m v⁻¹) para as diferentes razões C/N



PS: permeado de soro

Ao analisar a viscosidade dos EPS em diferentes razões C/N, utilizando PS e manitol como fontes de carbono, pode-se observar um comportamento semelhante para todos os biopolímeros, sendo esta relação entre a viscosidade e a taxa de cisalhamento descrita pelo modelo de *Ostwald-de-Waele*. Foi observado um decréscimo acentuado na viscosidade da

solução de EPS ($1 \% \text{ m v}^{-1}$) com o aumento da taxa de cisalhamento, demonstrando claramente um comportamento não Newtoniano. De acordo com Faria (2009), nos fluidos pseudoplásticos a viscosidade decresce com o aumento da taxa de cisalhamento.

Pode-se ainda verificar, na Figura 4, que a maior viscosidade foi encontrada em meio contendo como fonte de carbono o PS na razão C/N de 96,5, seguido pela viscosidade do EPS em meio contendo manitol e PS nas razões de 40, 60, 20 e 10. Nas razões C/N de 20, 40 e 60 utilizando PS foram obtidos valores de viscosidade muito próximos, sendo a razão mais baixa (C/N 10), em meio contendo PS, a que apresentou menor viscosidade.

Os parâmetros estimados pelo modelo de *Ostwald-de-Waele* podem ser observados na Tabela 7, onde o índice de consistência (K) indica o grau de resistência do fluido ao fluxo, ou seja, quanto maior o K, maior o grau de pseudoplasticidade enquanto o índice de comportamento do fluxo (n) deve ser menor do que 1, para facilitar a taxa de fluxo (BRANDÃO et al., 2013).

Tabela 7 - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções de EPS ($1 \% \text{ m v}^{-1}$) produzidos pela bactéria *M. loti* Semia 816, nas diferentes razões C/N

Razão C/N	Fonte de carbono	Índice de consistência (K) (mPa s^n)	Índice de comportamento de fluxo (n)	Coefficiente de determinação (R^2)
96,5	Manitol	55,09	0,23	0,90
96,5	PS	198,93	0,12	0,94
60	PS	135,09	0,11	0,98
40	PS	138,11	0,10	0,99
20	PS	129,28	0,08	0,94
10	PS	88,76	0,16	0,91

De acordo com os resultados observados (Tabela 7), o índice de consistência (K) foi maior para a solução de EPS obtida com a razão de 96,5, sendo o menor valor encontrado para a razão C/N de 96,5 em meio composto por manitol. As soluções dos EPS produzidos apresentaram $n < 1$, confirmando o perfil pseudoplástico do biopolímero. Segundo Faria (2009) e Almeida (2010), este comportamento é característico de biopolímeros bacterianos.

De acordo com Odian (2004), a variação da razão C/N pode induzir à formação de ligações cruzadas e aumentar a quantidade de ramificações na cadeia do biopolímero, aumentando assim o índice de consistência (K) dos EPS.

Visto que a maior concentração de EPS foi encontrada na razão C/N 20, mas a maior viscosidade foi encontrada na maior razão C/N 96,5, as duas razões C/N foram escolhidas para dar continuidade ao trabalho, testando a substituição da fonte de nitrogênio (EL) por AMM e nitrato.

3.6 SUBSTITUIÇÃO DO EL POR AMM OU NITRATO

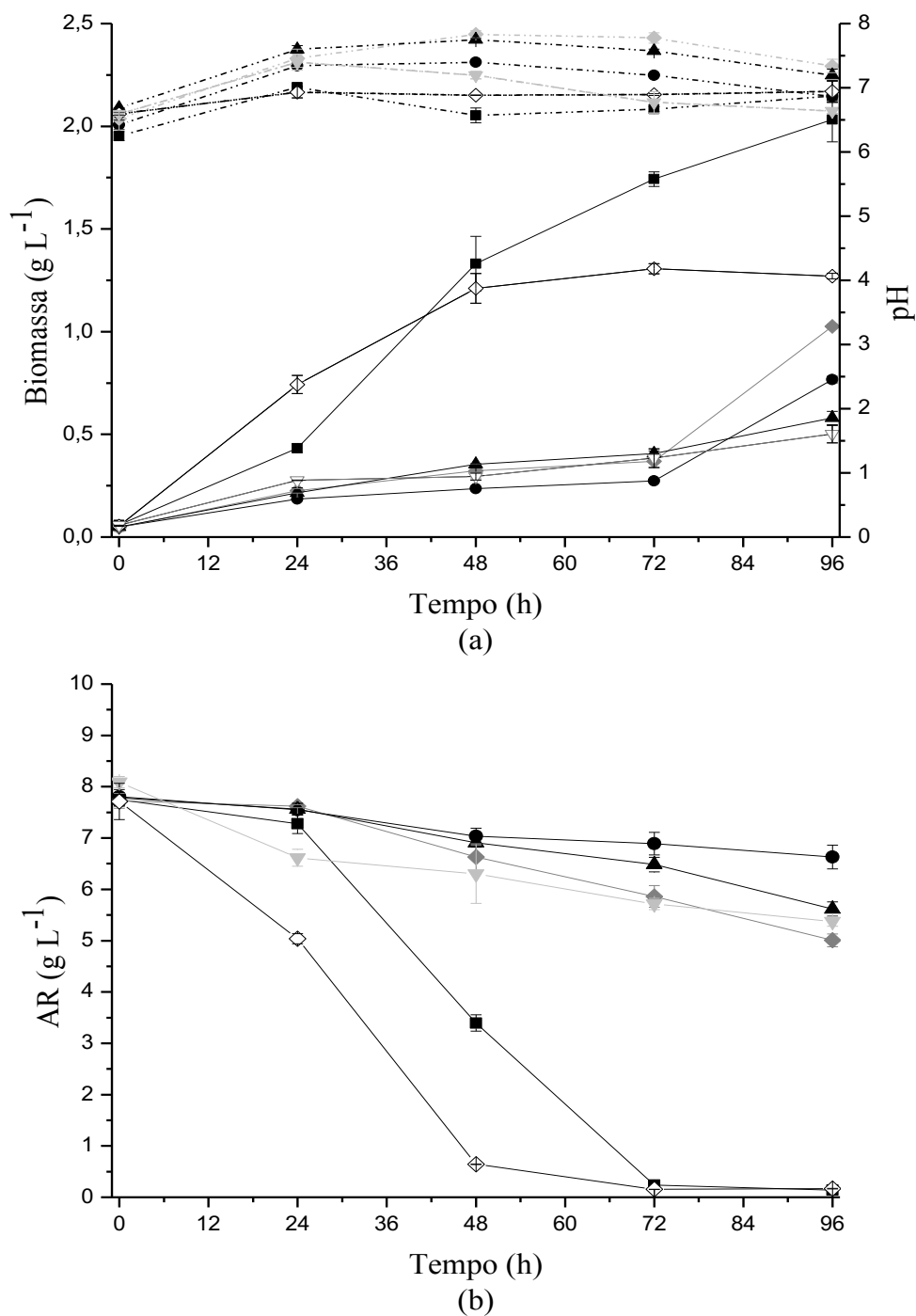
A Figura 5 apresenta o acompanhamento da biomassa, pH e AR, com ajuste inicial do pH em 7,0, substituindo o EL por AMM ou por nitrato nas razões C/N de 20 e 96,5.

Ao analisar a biomassa (Figura 5a) nas duas razões C/N, com as diferentes fontes de nitrogênio, AMM e nitrato, pode-se observar que o maior crescimento da bactéria foi em meio contendo AMM na razão C/N de 20, chegando a $2,03 \text{ g L}^{-1}$, resultado este superior quando o EL foi a fonte de nitrogênio utilizada na mesma razão C/N (Figura 3a, Tabela 8). Já ao utilizar nitrato, a biomassa foi de $1,03 \text{ g L}^{-1}$, sendo encontrado para a razão C/N de 96,5 com as duas diferentes fontes de nitrogênio valores de biomassa inferiores a 1 g L^{-1} , sendo o mesmo comportamento encontrado quando a fonte padrão de nitrogênio (EL) foi utilizada (Figura 2a), ou seja, valores inferiores a 1 g L^{-1} . Quanto ao pH (Figura 5a), pode-se observar que o mesmo manteve-se praticamente constante ao longo do cultivo para todas as condições estudadas.

Ao analisar o consumo da lactose, pode-se verificar que apenas na razão C/N de 20, utilizando AMM como fonte de nitrogênio, houve total consumo da lactose pelo micro-organismo em aproximadamente 72 h, sendo o mesmo comportamento observado ao utilizar a fonte de nitrogênio padrão (EL), com total consumo do substrato (Figura 3a). Para as demais condições, a lactose não foi totalmente consumida pelo micro-organismo. Ao utilizar nitrato na mesma razão C/N, a concentração de substrato restante no meio foi de $5,01 \pm 0,13 \text{ g L}^{-1}$, correspondendo a 64,90 % da concentração inicial.

Para as demais condições esta concentração não foi muito diferente, sendo de $6,63 \pm 0,23 \text{ g L}^{-1}$ e de $5,62 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$ ao utilizar AMM e nitrato, respectivamente, na razão C/N 96,5, sendo similar ao valor observado quando utilizada a razão C/N de 96,5 em meio composto por EL como fonte de nitrogênio, ($5,37 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ de AR presente no meio) (Figura 2b).

Figura 5 - Acompanhamento da (a) biomassa (—), pH (---) e (b) AR, utilizando (■) AMM C/N 20; (●) AMM C/N 96,5; (◆) nitrato C/N 20 e (▲) nitrato C/N 6; (◇) EL C/N 20 e (▼) EL C/N 96,5



AR: açúcares redutores; AMM: água de maceração de miho; EL: extrato de levedura

A Tabela 8 apresenta a biomassa máxima, concentração de EPS, produtividade em EPS, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/X}$ utilizando AMM, nitrato ou EL nas duas razões C/N (20 e 96,5). Ao

analisar a produtividade nas diferentes fontes de nitrogênio, pode-se observar que o maior valor foi encontrado ao utilizar EL como fonte de nitrogênio, sendo encontrados valores bastante inferiores ao utilizar as fontes de nitrogênio alternativas.

Tabela 8 - Biomassa máxima, EPS, produtividade em EPS, $Y_{P/S}$ $Y_{X/S}$ $Y_{P/X}$ determinados em 96 h de cultivo nas diferentes razões C/N*

Razão C/N	Fonte de nitrogênio	$X_{máx}$ (g L ⁻¹)	EPS (g L ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
20	AMM	2,03 (0,11) ^{a,A}	0,86 (0,04) ^{d,A}	0,009 (< 0,001) ^{d,A}
96,5	AMM	0,77 (0,02) ^{d,B}	0,52 (0,01) ^{e,B}	0,005 (< 0,001) ^{f,B}
20	Nitrato	1,03 (0,01) ^{c,A}	0,84 (0,11) ^{d,B}	0,008 (< 0,002) ^{e,B}
96,5	Nitrato	0,58 (0,03) ^{e,B}	1,27 (0,05) ^{b,A}	0,013 (< 0,001) ^{b,A}
20	EL	1,31 (0,02) ^{b,A}	4,03 (0,04) ^{a,A}	0,042 (< 0,001) ^{a,A}
96,5	EL	0,50 (0,04) ^{e,B}	1,12 (0,04) ^{c,B}	0,012 (< 0,001) ^{c,B}
Razão C/N	Fonte de nitrogênio	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)
20	AMM	0,11 (< 0,01) ^{d,B}	0,26 (0,01) ^{c,B}	0,44 (0,03) ^{d,B}
96,5	AMM	0,43 (0,01) ^{b,A}	0,62 (0,08) ^{a,A}	0,72 (0,02) ^{c,A}
20	Nitrato	0,31 (0,04) ^{c,B}	0,36 (0,02) ^{b,A}	0,85 (0,12) ^{c,B}
96,5	Nitrato	0,58 (0,02) ^{a,A}	0,25 (0,02) ^{c,B}	2,39 (0,18) ^{b,A}
20	EL	0,53 (0,05) ^{a,A}	0,16 (< 0,01) ^{d,A}	3,30 (0,07) ^{a,A}
96,5	EL	0,41 (0,02) ^{b,B}	0,16 (0,01) ^{d,A}	2,52 (0,10) ^{b,B}

*Média (desvio padrão), n = 3. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa indicam que há diferença significativa entre as condições testadas (p<0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as razões C/N para a mesma fonte de nitrogênio (p<0,05). AMM: água de maceração de milho; EL: extrato de levedura; EPS: exopolissacarídeos; $X_{máx}$: biomassa máxima; $Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/X}$: fator de conversão de biomassa em produto

O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi elevado na razão C/N 96,5 ao utilizar nitrato como fonte de nitrogênio, não diferindo significativamente (p>0,05) de quando a fonte de nitrogênio utilizada foi o EL, na razão C/N 20. Já ao analisar o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$) pode-se verificar que maiores conversões foram encontradas ao utilizar AMM na razão C/N de 96,5. Por outro lado, o maior fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{P/X}$) foi obtido ao utilizar EL como fonte de nitrogênio na razão C/N de 20, seguido pelo EL na razão de 96,5, sendo que este último não diferiu significativamente

($p > 0,05$) de quando utilizado nitrato na razão C/N de 96,5. Pode-se ainda observar que o maior valor de biomassa foi encontrado no meio composto por AMM (C/N 20) como fonte de nitrogênio.

Os resultados obtidos indicam que a AMM, na razão C/N de 20, demonstra ser uma potencial fonte de nitrogênio para o crescimento da bactéria em estudo, pois apresentou um crescimento até mesmo superior ao meio de cultivo padrão, sendo o micro-organismo capaz de consumir toda a lactose presente no meio.

Ao avaliar o EPS (Tabela 8) obtido com as diferentes fontes de nitrogênio, pode-se verificar que a menor concentração de EPS ($0,52 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$) foi encontrada quando AMM foi utilizada na razão C/N de 96,5, diferindo significativamente ($p < 0,05$) da razão C/N de 20 utilizando a mesma fonte de nitrogênio ($0,86 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$). Ainda, entre a AMM e o nitrato pode-se verificar que a maior concentração de EPS foi obtida em meio composto por nitrato como fonte de carbono na razão C/N de 96,5 ($1,27 \pm 0,05 \text{ g L}^{-1}$), diferindo significativamente ($p < 0,05$) da outra razão C/N, com a mesma fonte de nitrogênio ($0,84 \pm 0,11 \text{ g L}^{-1}$).

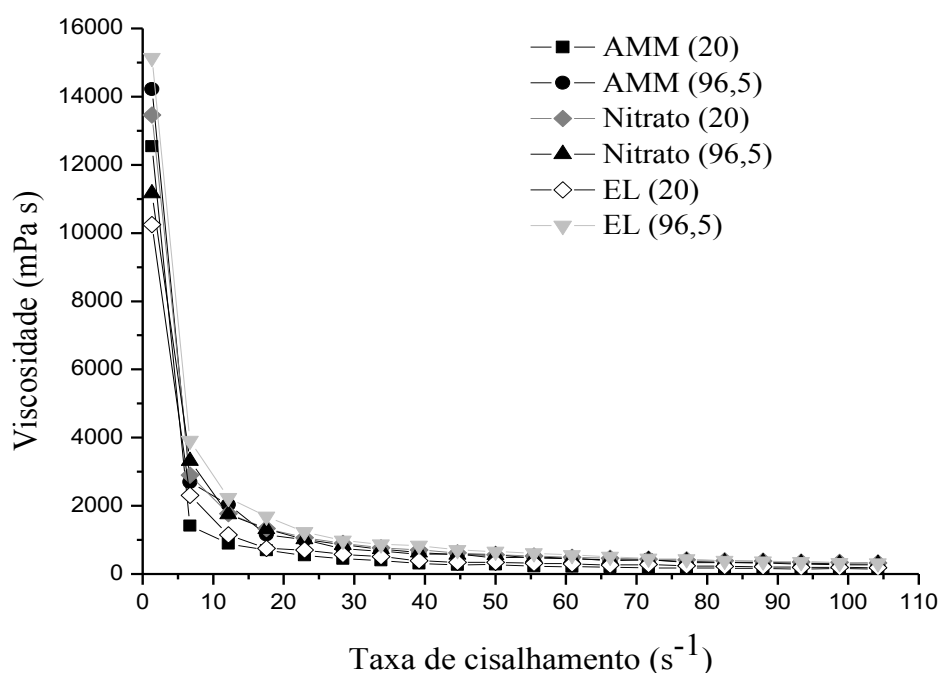
Cabe ressaltar que a concentração de EPS diminuiu significativamente em relação ao EL como fonte de nitrogênio, sendo então verificado que o EL é importante na síntese desses EPS, pois se por um lado o crescimento do micro-organismo e o consumo do substrato em meio composto por AMM foi satisfatório, por outro lado a concentração de EPS foi inferior em relação à fonte de nitrogênio padrão (EL), chegando esta a $4,03 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$ ao utilizar a razão C/N de 20.

3.6 VISCOSIDADE PARA DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Ao analisar a viscosidade das diferentes soluções de EPS (Figura 6), os valores de viscosidade foram bastante similares ao utilizar a AMM e nitrato quando comparado com o EL (item 3.4), sendo ainda observado que a menor viscosidade foi encontrada quando empregado EL na menor razão C/N (20), e o maior valor encontrado ao utilizar EL (C/N 96,5), seguido pela AMM na razão C/N de 96,5, pelo nitrato na razão C/N de 20 e pela AMM na razão C/N de 20.

A Tabela 9 apresenta os parâmetros reológicos obtidos para as soluções de EPS ($1 \% \text{ m v}^{-1}$) para as diferentes fontes de nitrogênio testadas, nas duas razões C/N estudadas. Nesta tabela pode-se verificar a confirmação do perfil pseudoplástico das soluções de EPS, pois todos apresentaram $n < 1$, sendo este comportamento característico de biopolímeros bacterianos (FARIA, 2009; ALMEIDA, 2009).

Figura 6 - Viscosidade para EPS (1 % m v⁻¹) utilizando AMM, nitrato ou EL para as diferentes razões C/N



AMM: água de maceração de milho; EL: extrato de levedura

Tabela 9 - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções de EPS (1 % m v⁻¹) produzidos pela bactéria *M. loti* Semia 816, com as diferentes fontes de nitrogênio

Razão C/N	Fonte de nitrogênio	Índice de consistência (K) (mPa s ⁿ)	Índice de comportamento de fluxo (n)	Coefficiente de determinação (R ²)
20	AMM	72,97	0,16	0,95
96,5	AMM	124,09	0,19	0,92
20	Nitrato	128,25	0,21	0,99
96,5	Nitrato	139,63	0,16	0,98
20	EL	129,28	0,08	0,94
96,5	EL	198,93	0,12	0,94

AMM: água de maceração de milho; EL: extrato de levedura

O índice de consistência (K) foi maior para o EPS em meio composto por EL na razão C/N de 96,5 e menor para o EPS em meio composto por AMM na razão de 20. Nas

demais condições avaliadas os resultados foram bastante semelhantes, sendo estes em média 130 mPa s.

A maior biomassa foi encontrada utilizando AMM na razão C/N de 20, havendo consumo total da fonte de carbono nesta razão, mas nesta mesma condição a concentração do EPS foi inferior de quando a fonte de nitrogênio padrão foi utilizada. Por esta razão, na continuidade do trabalho, foi avaliado EL e a AMM como fontes de nitrogênio, mantendo a razão C/N de 20, bem como o aumento da concentração do PS de 10 para 20 e 30 g L⁻¹, com o objetivo de aumentar a concentração do EPS.

3.7 AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DO PS UTILIZANDO AMM OU EL (C/N 20)

A Figura 7 apresenta o acompanhamento da biomassa, pH e AR, na razão C/N de 20, utilizando 10, 20 ou 30 g L⁻¹ de PS e AMM ou EL como fonte de nitrogênio.

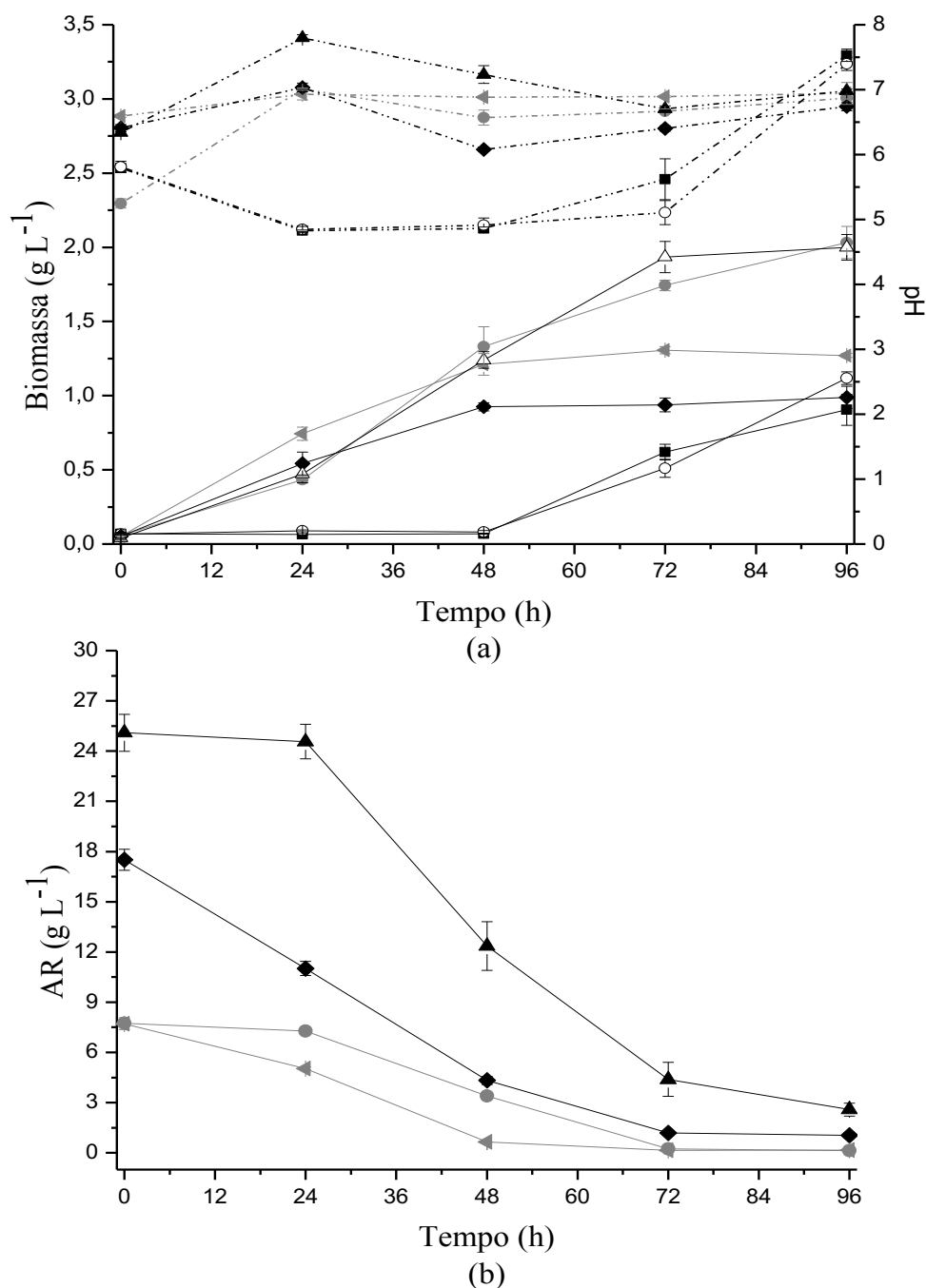
Ao analisar a biomassa (Figura 7a), pode-se verificar que a maior biomassa foi encontrada ao utilizar 30 g L⁻¹ de PS como fonte de carbono e EL como fonte de nitrogênio, sendo esta de $2,00 \pm 0,09$ g L⁻¹, sendo observado um aumento de 0,73 g L⁻¹ na biomassa quando o PS passou de 10 para 30 g L⁻¹.

Para as demais condições em estudo a biomassa ficou em torno de 1 g L⁻¹, sendo neste caso verificado que para AMM o aumento de 10 para 20 e 30 g L⁻¹ de PS resultou em uma diminuição da biomassa, passando de $2,03 \pm 0,11$ para $0,91 \pm 0,1$ e $1,12 \pm 0,04$ g L⁻¹, respectivamente.

Para o pH (Figura 7a) pode-se observar que houve um decréscimo do mesmo (aproximadamente 5,0) para os meios compostos por AMM, sendo após 72 h observado um aumento do mesmo para valores próximos de 7,5. Já quando o meio era composto por EL foi observado um comportamento característico observado nos demais ensaios (Figura 2b, Figura 3a, Figura 5a), ou seja, um aumento do pH no tempo de 24 h e após o mesmo ficou praticamente constante.

Ao analisar o consumo de lactose ficou evidente que, para os meios compostos por EL, nas duas concentrações de PS, em 72 h, a lactose foi praticamente toda consumida. Entretanto, não foi possível o acompanhamento da concentração de lactose ao longo do cultivo ao utilizar concentrações mais elevadas de AMM, em virtude de provável interferência de algum componente da AMM da determinação de AR. Desta forma, nos ensaios com AMM utilizando 20 e 30 g L⁻¹ de PS não foi possível calcular os parâmetros $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$.

Figura 7 - Acompanhamento da (a) biomassa (—), pH (---) e (b) AR, utilizando (○) 10 g L⁻¹ de PS com AMM; (■) 20 g L⁻¹ de PS com AMM; (◊) 30 g L⁻¹ de PS com AMM; (◄) 10 g L⁻¹ de PS com EL; (◆) 20 g L⁻¹ de PS com EL; e (▲) 30 g L⁻¹ de PS com EL



PS: permeado de soro; AMM: água de maceração de milho; EL: extrato de levedura; AR: açúcares redutores

A Tabela 10 apresenta a biomassa máxima, concentração de EPS, produtividade em EPS, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/X}$ para as diferentes concentrações de PS, na razão C/N de 20. Ao analisar a Tabela 10 pode-se observar que a maior produtividade foi encontrada quando utilizado 20 g L⁻¹ de PS com EL, diferindo significativamente ($p < 0,05$) das demais condições, sendo

menores valores encontrados quando a AMM foi a fonte de nitrogênio utilizada. Ao analisar a biomassa máxima pode-se perceber que os maiores resultados foram encontrados ao utilizar 10 g L⁻¹ de PS com AMM, não diferindo significativamente ($p>0,05$) de quando utilizado 30 g L⁻¹ de PS com EL. A maior produtividade foi encontrada quando utilizado EL como fonte de nitrogênio na razão C/N de 20, diferindo significativamente ($p<0,05$) das demais condições, sendo encontrado também para esta condição o maior fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{P/X}$) e também de substrato (lactose) em produto ($Y_{P/S}$).

Tabela 10 - Biomassa máxima, EPS, produtividade em EPS, $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/X}$ determinados em 96 h de cultivo nas diferentes razões C/N*

PS (g L ⁻¹)	Fonte de nitrogênio	$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	EPS (g L ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
10	AMM	2,03 (0,11) ^{a,A}	0,86 (0,04) ^{d,B}	0,009 (< 0,001) ^{e,B}
20	AMM	0,90 (0,10) ^{d,C}	0,91 (0,10) ^{d,B}	0,009 (0,001) ^{e,B}
30	AMM	1,12 (0,04) ^{c,B}	1,70 (0,15) ^{c,A}	0,018 (0,001) ^{c,A}
10	EL	1,31 (0,02) ^{b,B}	4,03 (0,04) ^{b,B}	0,042 (0,001) ^{b,B}
20	EL	0,99 (0,08) ^{d,C}	8,21 (0,29) ^{a,A}	0,098 (0,008) ^{a,A}
30	EL	2,00 (0,09) ^{a,A}	9,46 (0,80) ^{a,A}	0,012 (0,001) ^{d,C}
PS (g L ⁻¹)	Fonte de nitrogênio	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)
10	AMM	0,11 (< 0,01) ^{e,C}	0,26 (0,01) ^{c,B}	0,44 (0,03) ^{d,B}
20	AMM	ND	ND	1,11 (0,10)
30	AMM	ND	ND	1,62 (0,20)
10	EL	0,53 (0,05) ^{b,A}	0,16 (< 0,01) ^{d,A}	3,30 (0,07) ^{a,A}
20	EL	0,49 (0,02) ^{b,c,A,B}	0,06 (< 0,01)	8,82 (0,57)
30	EL	0,44 (0,04) ^{c,B}	0,09 (< 0,01)	4,84 (0,58)

*Média (desvio padrão), n = 3. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as condições testadas para um mesmo parâmetro ($p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa entre as concentrações de PS para um mesmo parâmetro e mesma fonte de nitrogênio ($p<0,05$). PS: permeado de soro; AMM: água de maceração de milho; EL: extrato de levedura; EPS: exopolissacarídeos; ND: não detectado; $X_{\text{máx}}$: biomassa máxima; $Y_{P/S}$: fator de conversão de substrato em produto; $Y_{X/S}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{P/X}$: fator de conversão de biomassa em produto

Pode-se observar que nas mesmas condições onde não foi observado crescimento acentuado da bactéria, nem o consumo do substrato, foram as condições que apresentaram

uma baixa concentração de EPS, sendo de $0,91 \pm 0,10$ e $1,70 \pm 0,5$ g L⁻¹ para as condições de 20 e 30 g L⁻¹ de PS, respectivamente, ao utilizar AMM como fonte de nitrogênio. Ao utilizar EL como fonte de nitrogênio, a concentração de EPS foi de $8,21 \pm 0,29$ g L⁻¹ com 20 g L⁻¹ de PS, não diferindo significativamente ($p < 0,05$) de quando utilizado EL como fonte de carbono, sendo esta de $9,46 \pm 0,80$ g L⁻¹.

Ribeiro (2015), ao aumentar a concentração da fonte de carbono (GR) em cerca de 10 vezes, de 12,2 para 122 g L⁻¹, utilizando a mesma bactéria, na razão C/N 36, observou que a concentração de EPS passou de $2,45 \pm 0,30$ para $3,83 \pm 0,40$ g L⁻¹, respectivamente, efeito semelhante ao encontrado no presente trabalho. Possivelmente uma alta concentração da fonte de carbono pode vir a inibir a bactéria, pois a relação entre o aumento da concentração da fonte de carbono e o aumento da concentração de EPS observado por Ribeiro (2015) não foi proporcional.

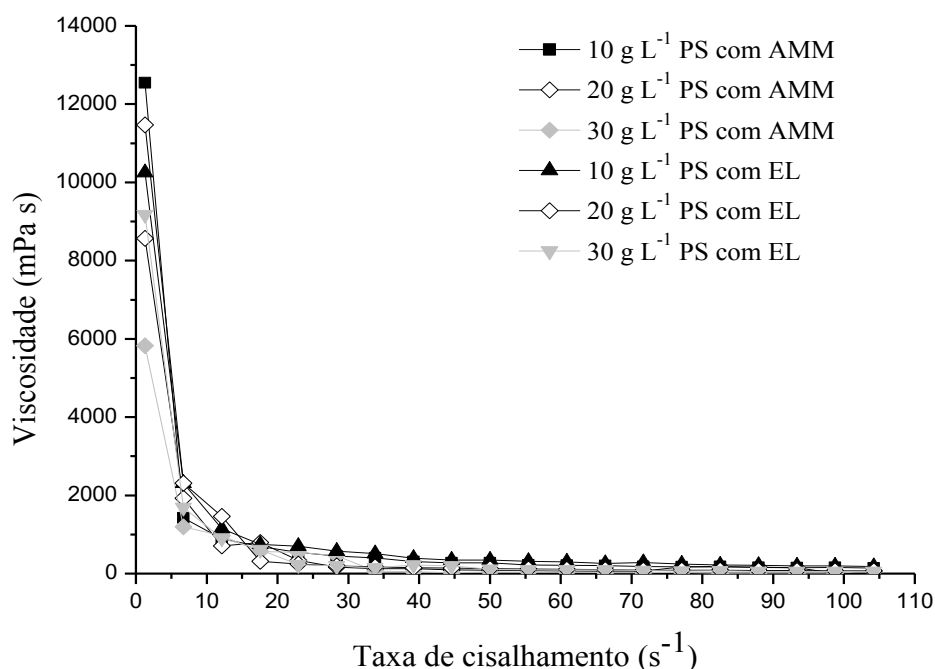
Os resultados obtidos neste trabalho ($8,21$ g L⁻¹ com 20 g L⁻¹ de PS) são expressivos, considerando o uso de um coproduto agroindustrial. Staudt, Wolfe e Shrout (2012) observaram na mesma razão C/N (20), para bactéria *Rhizobium tropici* CIAT 899, ao utilizar 10 g L⁻¹ de sacarose, uma concentração de $4,08$ g L⁻¹ de EPS, resultado este similar aos encontrados no presente trabalho, pois ao utilizar 10 g L⁻¹ de PS a concentração de EPS ficou em torno de 4 g L⁻¹.

Zhou et al. (2014), ao utilizar 100 g L⁻¹ de soro de leite e a bactéria *Rhizobium radiobacter* S10, encontraram $2,83$ g L⁻¹ de EPS. Já Castellane et al. (2015), com *Rhizobium tropici* Semia 4077, utilizando 30 g L⁻¹ de sacarose, encontraram $7,45$ g L⁻¹ de EPS, sendo este último semelhante ao encontrado no presente trabalho. Castellane, Lemos e Lemos (2014) encontraram para diferentes cepas de *Rhizobium*, utilizando 30 g L⁻¹ de sacarose, concentrações de EPS de 0,71 a 1,14 g L⁻¹.

A Figura 8 apresenta o acompanhamento da viscosidade das soluções de EPS (1 % m v⁻¹) produzidos por *M. loti* Semia 816, em meio composto por 10, 20 ou 30 g L⁻¹ de PS, contendo AMM ou EL como fonte de nitrogênio, mantendo a razão C/N em 20.

Pode-se observar que a maior viscosidade foi encontrada quando utilizado 10 g L⁻¹ de PS como fonte carbono e AMM como fonte de nitrogênio, seguido por 20 g L⁻¹ de PS com AMM e por 10 g L⁻¹ de PS com EL. A menor viscosidade foi encontrada ao utilizar 30 g L⁻¹ de PS com AMM, o que indica que o EL, além de ser importante na produção do EPS, também é importante para as propriedades reológicas.

Figura 8 - Viscosidade para EPS ($1 \% \text{ m v}^{-1}$), utilizando AMM ou EL para as diferentes concentrações de PS, na razão C/N 20



PS: permeado de soro; AMM: água de maceração de milho; EL: extrato de levedura

No presente trabalho, o aumento na concentração do PS, ao utilizar EL como fonte de nitrogênio, levou a um aumento significativo na concentração do EPS, passando de $4,03 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$, quando utilizado 10 g L^{-1} de PS, para $8,21 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$ quando utilizado 20 g L^{-1} de PS, sendo este de 103 %, sendo ainda observado um aumento na viscosidade do EPS ($1 \% \text{ m v}^{-1}$).

A Tabela 11 apresenta os parâmetros reológicos obtidos para as soluções de EPS ($1 \% \text{ m v}^{-1}$), para as diferentes concentrações de PS, em meio contendo AMM ou EL como fonte de carbono, na razão C/N de 20.

Ao analisar a Tabela 11 pode-se verificar a confirmação do perfil pseudoplástico das soluções de EPS, com $n < 1$ (FARIA, 2009; ALMEIDA, 2009). O índice de consistência (K) foi bastante superior para o EPS em meio composto por EL, sendo observado um valor inferior ao utilizar AMM.

O conhecimento do comportamento reológico das soluções de polissacarídeos é de extrema importância, pois a maioria das aplicações dos biopolímeros na indústria de alimentos está associada à capacidade que eles, quando em solução, possuem de mudar as propriedades físicas, formando soluções de alta viscosidade, criando redes intermoleculares

coesivas. Além disso, as propriedades reológicas são muito importantes na análise das condições de escoamento em processos como pasteurização, evaporação e secagem (NISHINARI, 1995; TONELI et al., 2016).

Tabela 11 - Parâmetros reológicos obtidos pela análise das soluções de EPS (1 % m v⁻¹) produzidos pela bactéria *M. loti* Semia 816, nas diferentes condições de cultivo

PS (g L ⁻¹)	Fonte de nitrogênio	Índice de consistência (K) (mPa s ⁿ)	Índice de comportamento de fluxo (n)	Coefficiente determinação (R ²)
10	AMM	72,97	0,16	0,95
20	AMM	59,04	0,08	0,93
30	AMM	44,10	0,09	0,95
10	EL	129,28	0,08	0,94
20	EL	146,30	0,12	0,98
30	EL	129,23	0,14	0,97

PS: permeado de soro; AMM: água de maceração de milho; EL: extrato de levedura

De acordo com Navarro (1997), a temperatura, concentração, estrutura do soluto, pH e taxa de deformação afetam a pseudoplasticidade do polímero em solução. O EPS produzido na condição do meio de cultivo composto por 20 g L⁻¹ de PS com EL e razão C/N de 20 apresentou a maior viscosidade e, ainda, a concentração do EPS não diferiu significativamente ($p < 0,05$) de quando utilizado 30 g L⁻¹ de PS com EL, além de apresentar uma maior viscosidade.

4 CONCLUSÕES

M. loti Semia 816 foi capaz de produzir EPS em quantidades apreciáveis a partir de PS, sendo que o ajuste do pH inicial em 7,0 e a diminuição da razão C/N de 96,5 para 20 influenciaram positivamente na produção.

Ao substituir o EL (fonte de nitrogênio) pela AMM e nitrato nas razões C/N de 20 e 96,5 a concentração do EPS foi inferior à obtida com EL, entretanto a produção de biomassa e o consumo do substrato ao utilizar AMM na razão C/N de 20 foi bastante satisfatório.

Ao aumentar a concentração do PS de 10 para 20 e 30 g L⁻¹, utilizando EL e AMM, mantendo a razão C/N de 20, verificou-se que as maiores concentrações do EPS foram obtidas ao utilizar 30 g L⁻¹ de PS (9,46 ± 0,80 g L⁻¹ de EPS) e 20 g L⁻¹ de PS (8,21 ± 0,29 g L⁻¹ de EPS), não diferindo significativamente entre si (p<0,05), sendo neste último encontrado também a maior viscosidade comparando as duas condições.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. S. **Avaliação e caracterização da goma xantana sintetizada a partir de resíduos aquícolas e de glicerol como fonte de carbono**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2010.
- AOAC, **Official Methods of Analysis**. 17 ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.
- ARANDA- SELVERIO, G.; PENNA, A. L. B.; CAMPOS-SÀ, 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, p. 895-899, 2010.
- ARLA FOODS INGREDIENTS - **The whey and protein**. 2015. Disponível em: <https://www.arlafoodsingredients.com/the-whey-and-protein-blog/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2016.
- BAJAJ, I. B.; SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S.; PANDEY, A. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 150-156, 2006.
- BARBOSA, A. M.; da CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; da SILVA, M. de L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- BRANDÃO, L.V.; ASSIS, D.J.; LÓPEZ, J.A.; ESPIRIDIANO, M.C.A.; ECHEVARRIA, E.M.; DRUZIAN, J.I. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 737 – 746, 2013.
- CANUTO, A.P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.; 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.

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.

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.

CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515-522, 2015.

CAVALCANTI, M. T.; BORA, P. S.; FLORÊNCIO, I. M.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H. Avaliação da estabilidade térmica das proteínas das amêndoas da faveleira (*Cnidoscylus phyllacanthus* (Mart) Pax. Et K. Hoffm). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 37-43, 2010.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

DEVI, S. E.; VIJAYENDRA, S. V. N.; SHAMALA, T. R. Exploration of rice bran, an agroindustry residue, for the production of intra and extra-cellular polymers by *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 80-84, 2012.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUTA, F. P.; DA COSTA, A. C. A.; LOPES, L. M. A.; BARROS, A.; SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. Effect of process parameters on production of a biopolymer by *Rhizobium* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 114, p. 639-652, 2004.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; 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.

FARIA, S. **Otimização da produção e caracterização de goma xantana empregando caldo de cana**. 2009. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS, S. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1465-1471, 2010.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; PAIS, J.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 297-305, 2010.

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.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. R.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MESOMO, M. C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada, Erechim, 2007.

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

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERIO, G.; EXPOSTI, D. T. D.; da SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 705-708, 2012.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004. 512 p.

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 178 four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.81, p. 291-298, 2015.

NASCIMENTO, R. A. L.; ALVES, M. H. M. E.; FREITAS, J. H. E. S.; MANHKE, L. C.; LUNA, M. A. C.; SANTANA, K. V.; NASCIMENTO, A. E.; SILVA, C. A. A. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **E-xacta**, v. 8, n. 1, p. 15-29, 2015.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp smia-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

NAVARRO, R.F. **Fundamentos de reologia de biopolímeros**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 1997. 300 p.

NISHINARI, K. Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: _____ **Food polysaccharides and their applications**. v.16. New York: Marcel Dekker, 1995.cap. 16. p. 541-588.

OLIVEIRA, J. M. **Caracterização do exopolissacarídeo produzido por *Mesorhizobium loti* Semia 816 a partir de glicerol residual**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

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. **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.

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

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.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 181-204, 2005.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Raw glicerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide-production bacteria. **Journal of Applied Biotechnology**, n. 2, v. 3, p. 61-73, 2015.

VICTORELLI, R. **Produção de L-ácido láctico a partir de células bacterianas imobilizadas**. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.

WALLNER-KERSANACH, M. RIBEIRO, A. R. L.;MACHADO, E. C. 2010. Análise Instrumental - Analisador Elementar CHNS/O. In: BAUMGARTEN, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M. & NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de análises em oceanografia química**. Editora da FURG, p. 145-166.

ZACARCHENCO, P. B.; VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M.; GALFINA, D. A.; TRENTA, F. K. H. S.; ALVES, A. T. S. Permeado de soro. **Guia de referência do setor lácteo 2012**, p. 48-52, 2012.

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

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

A padronização no preparo do inóculo das cepas de *Lactobacillus* estudadas foi conseguida ao estabelecer-se uma densidade ótica (DO) de 1,0, garantindo-se que os diferentes micro-organismos encontravam-se na fase exponencial de crescimento, permitindo desta forma a reprodutibilidade dos cultivos, podendo o preparo do inóculo ser conduzido em cultivo estático, com menor gasto energético.

O PS mostrou-se como uma promissora fonte de carbono no cultivo de *Lactobacillus*, pois quantidades expressivas de AL foram produzidas para todas as cepas estudadas em relação à fonte de carbono padrão (glicose), sendo *Lactobacillus plantarum* INCQS 00007 a bactéria que mais se destacou.

As variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,10$) no delineamento experimental PB com *L. plantarum* INCQS 00007 foram PS (positivo), EC (positivo) e a temperatura (negativo), sendo a maior concentração de AL ($29,04 \text{ g L}^{-1}$) encontrada quando utilizado 40 g L^{-1} de PS, 20 g L^{-1} de EC, 20 g L^{-1} de peptona, 5 g L^{-1} de acetato de sódio, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de Tween 80, $0,05 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de manganês, sem agitação e com temperatura de 32°C .

Nos cultivos com ajuste do pH, ao estudar-se o aumento da concentração da fonte de carbono, utilizando batelada simples e também batelada alimentada, o maior $Y_{P/S}$ ($0,95 \text{ g g}^{-1}$) foi obtido ao utilizar-se 60 g L^{-1} de PS na batelada simples, o que correspondeu a $50,30 \pm 0,89 \text{ g L}^{-1}$ de AL, representando uma alta conversão do PS em AL. O aumento da concentração de PS resultou em decréscimo do $Y_{P/S}$, possivelmente associado à inibição pelo substrato.

Mesorhizobium loti Semia 816 foi capaz de produzir EPS em meio composto por PS como fonte de carbono, sendo que o ajuste de pH inicial, a razão C/N e a fonte de nitrogênio influenciaram o crescimento celular, o consumo de substrato e a produção de EPS.

A concentração de PS teve impacto positivo na produção de EPS, sendo que se verificou que a maior concentração de EPS, usando uma razão C/N de 20 e EL como fonte de nitrogênio, foi obtida ao utilizar 20 g L^{-1} de PS ($8,21 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$), não diferindo significativamente ($p > 0,05$) de 30 g L^{-1} ($9,46 \pm 0,80 \text{ g L}^{-1}$), mas apresentando um maior valor de $Y_{P/S}$ superior ($0,50 \pm 0,02 \text{ g g}^{-1}$). Todas as soluções aquosas a 1% (m v^{-1}) dos EPS obtidos nas diferentes condições de cultivo apresentaram comportamento pseudoplástico.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliar o efeito do preparo do inóculo nos cultivos microbianos;
- ✓ Investigar outras fontes de nitrogênio na produção de AL por *L. plantarum*;
- ✓ Purificar o AL produzido pela bactéria *L. plantarum*;
- ✓ Avaliar a viscosidade do EPS de *M. loti* Semia 816 em diferentes temperaturas;
- ✓ Avaliar a viscosidade do EPS de *M. loti* Semia 816 em diferentes concentrações salinas;
- ✓ Avaliar possíveis aplicações do EPS de *M. loti* Semia 816, como a capacidade emulsificante e a formação de géis.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: focus on polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 733-740, 2012.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 6, p. 877-902, 2013.

ABMILHO - **Associação brasileira das indústrias de milho**, 2018. Disponível em: <http://www.abimilho.com.br/estatisticas/producao-mundial>. Acesso em: 15 de abril de 2018.

AGUIRRE-EZKAURIATZA, E. J.; AGUILAR-YÁÑEZ, J. M.; RAMÍREZ-MEDRANO, A.; ALVAREZ, M. M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2837-2844, 2010.

AKHTAR, M., LENTZ, M.J., BLANCHETTE, R.A., KIRK, T.K., 1997. Corn steep liquor lowers the amount of inoculum for biopulping. **TAPPI Journal**. 80, 161-164.

ALMEIDA, M. S. **Avaliação e caracterização da goma xantana sintetizada a partir de resíduos aquícolas e de glicerol como fonte de carbono**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2010.

AMARAL, P. F. F.; FERREIRA, T. F.; FONTES, G. C.; COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: new biotechnological routes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179-186, 2009.

AOAC, **Official Methods of Analysis**, 17th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.

ARANDA- SELVERIO, G.; PENNA, A. L. B.; CAMPOS-SÀ, 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, p. 895-899, 2010.

ARLA FOODS INGREDIENTS - **The whey and protein**. 2015. Disponível em: <https://www.arlafoodsingredients.com/the-whey-and-protein-blog/>. Acesso em: 24 de janeiro de 2016.

AUAD, L. I. **Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes***. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

BAJAJ, I. B.; SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S.; PANDEY, A. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 150-156, 2006.

- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M; SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 29-42, 2004.
- BARRETO, M. C. S; FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; SILVA, M. L. R. B.; LIMA FILHO, J. L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 2-4, p. 221-227, 2011.
- BARTOWSKY, E.; COSTELLO, P. J.; CHAMBERS, P. J. Emerging trends in the application of malolactic fermentation. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, n. 21, p. 663-669, 2015.
- BENNINGA, H. **A history of lactic acid making**, Kluwer Academic Publishers, 1990. 478 p.
- BERNARDO, M. P.; COELHO, L. F.; SASS, D. C.; CONTIERO, J. L.-(+)-Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* B103 from dairy industry waste. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 640-646, 2016.
- BOGAERT, J. C. Production and novel applications of natural L(+) lactic acid: food, pharmaceuticals and biodegradable polymers. **Cerevisia**, n. 22, p. 46– 50, 1997.
- BRANDÃO, L.V.; ASSIS, D.J.; LÓPEZ, J.A.; ESPIRIDIÃO, M.C.A.; ECHEVARRIA, E.M.; DRUZIAN, J.I. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 737 – 746, 2013.
- CANUTO, A.P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. 2006. 105 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- CAPELLARI, J. B. **Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville, 2010.
- CARDINAL, E.V., HEDRICK, L.R. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. **Journal of Biological Chemistry**, v. 172, p.609-612, 1947.
- CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.
- CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, I. D.; 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.
- CASTELLANE, T. C.L; LEMOS, E. G. M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.

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.

CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515–522, 2015.

CAVALCANTI, M. T.; BORA, P. S.; FLORÊNCIO, I. M.; FLORENTINO, E. R.; SILVA, F. L. H. Avaliação da estabilidade térmica das proteínas das amêndoas da faveleira (*Cnidoscylus phyllacanthus* (Mart) Pax. Et K. Hoffm). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 37-43, 2010.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenóides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. 138 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

COELHO, L. F.; LIMA, C. J. B.; RODOVALHO, C. M.; BERNARDO, M. P.; CONTIERO, J. L. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n 1, p. 27-36, 2011.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotenssoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 34-38, 2008.

CURRY, B.; CROW, V. *Lactobacillus casei* group. In: _____. **Encyclopedia of dairy sciences**. London: Academic Press, cap. 3, 2003, p. 1488–1493.

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S. H.; FRANK, J. R. Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. **Microbiology Reviews**, v. 16, p. 221-231, 1995.

DEVI, E. S.; VIJAYENDRA, S. V. N.; SHAMALA, T. R. Exploration of rice bran, an agro-industry residue, for the production of intra-and extra-cellular polymers by *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 80-84, 2012.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

DUBOIS, N.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DUSSELIÉ, M.; WOUWE, P. V.; DEWAELE, A.; MAKSHINA, E.; SELS, B. F. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis. **Energy and Environmental Science**, v. 6, p. 1415-1442, 2013.

DUTA, F. P.; DA COSTA, A. C. A.; LOPES, L. M. A.; BARROS, A.; SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. Effect of process parameters on production of a biopolymer by *Rhizobium* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 114, p. 639-652, 2004.

DUTA, F. P.; FRANÇA, F. P.; 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.

FARIA, S. **Otimização da produção e caracterização de goma xantana empregando caldo de cana**. 2009. 162 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ALMEIDA, J. P. S.; PASSOS, S. R.; OLIVEIRA, P. J.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G. R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeos sintetizados por rizóbios isolados de guandu. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1465-1471, 2010.

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, p. 671-675, 2001.

FITZPATRICK, J. J.; O'KEEFFE, U. Influence of whey protein hydrolysate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 183-186, 2001.

FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. **Reatores biológicos - fundamentos e aplicações**. v. 1, Lisboa, Porto: Editora Lidel, 2007. 488 p.

FREITAS, F.; ALVES, V.D.; PAIS, J.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 297-305, 2010.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre leveduras e bactérias lácticas na fermentação alcoólica**. 2009. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2009.

GUILHERME, A. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 738-747, 2009.

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.

HAN, Y.; LIU, E.; LIU, L.; ZHANG, B.; WANG, Y.; GUI, M.; WU, R.; LI, P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 230-237, 2015.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In _____. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Ed. Edgar Blücher Ltda, 2001. cap. 6. p. 93-121.

- HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors effecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000.
- HUGO, A. A.; BRUNO, F.; GOLOWCZYC, M. A. Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a medium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. **Food Science and Technology**, v. 69, p. 185-190, 2016.
- HUJANEN, M.; LINKO, S.; LINKO, Y. Y.; LEISOLA, M. Optimization of media and cultivation conditions for L(+) (S)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 126-130, 2001.
- HUJANEN, M.; LINKO, Y. Y. Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 307-313, 1996.
- HUYS, G.; VANCANNEYT, M.; D'HAENE, K.; VANKERCKHOVEN, V.; GOOSSENS, H.; SWINGS, J. Accuracy of the species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 803-810, 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE E QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS) – Fundação Oswaldo Cruz. **Instruções para reidratação das culturas**. Manguinhos, Rio de Janeiro, 2015.
- JAYAMUTHUNAGAI, J.; SRISOWMEYA, G.; CHAKRAVARTHY, M.; GAUTAM, P. D-Tagatose production by permeabilized and immobilized *Lactobacillus plantarum* using whey permeate. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 250-55, 2017.
- KASHKET, E. R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 46, p. 233-244, 1987.
- KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Biosciences**, v. 1, n. 3, p. 1-13, 2011.
- KWAN, T. H.; HU, Y.; LIN, C. S. K. Valorization of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 129-136, 2016.
- LAHAYE, E. **Role structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien**. 2006. 182 f. Tese (Doutorado em Biologia) - Université de Bretagne Sud, França, 2006.
- LAUS, M. C.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; KIJNE, J. W. Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, p. 533-538, 2005.
- LAVARI, L.; IANNIELLO, R.; PAEZ, 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. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 322-330, 2015.

LIMA, C. J. B.; COELHO, L. F.; CONTIERO, J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 175-181, 2010.

LIU, B.; YANG, M.; QI, B.; CHEN, X.; SU, Z.; WAN, Y. Optimizing L-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As 1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. **Biochemical Engineering Journal**, v. 52, p. 212-219, 2010.

LI, Y.; CUI, F. Microbial lactic acid production from renewable resources. **Sustainable Biotechnology**, p. 211-228, 2010.

LIMA, C. J. B.; COELHO, L. F.; CONTIERO, J. The use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 175-181, 2010.

LOPES, J. *Lactobacillus plantarum*. 2015. Disponível em: <http://knoow.net/ciencterravida/lactobacillus-plantarum/>. Acesso em: 16 de outubro de 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. R.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACHADO-JUNIOR, F. R. S.; MICHELON, M.; DALCANTON, F.; FURLONG, E. B.; BURKERT, J. F. M.; BURKERT, C. A. V. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. **International Food Research Journal**, v. 22, n.3, p. 1253-1260, 2015.

MADDIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. 14^a ed. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1032 p.

MAN, J. D., ROGOSA, M., SHARPE, M. E., A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p. 130-135, 1960.

MAPA - **Determinação de lipídios em leite e produtos lácteos pelo método butirômetro** - Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS, 2014.

MESOMO, M. C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada, Erechim, 2007.

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

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERINO, G.; EXPOSTI, D. T. D.; SILVA, M. L. C.; LEMOS, E. G. M.; CAMPANHARO, J. C.; SILVEIRA, J. L. M. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, v. 35, p. 705-708, 2012.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4^a Ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004. 512 p.

- MONTEIRO, N. K. **Caracterização química dos polissacarídeos produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp.** 2011. 98f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.
- 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 178 four isolates of rhizobia. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 291–298, 2015.
- MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 437-444, 2008.
- NASCIMENTO, R. A. L.; ALVES, M. H. M. E.; FREITAS, J. H. E. S.; MANHKE, L. C.; LUNA, M. A. C.; SANTANA, K. V.; NASCIMENTO, A. E.; SILVA, C. A. A. Aproveitamento da água de maceração de milho para produção de compostos bioativos por *Aspergillus niger* (UCP/WFCC 1261). **E-xacta**, v. 8, n. 1, p. 15-29, 2015.
- NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp smia-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.
- NAVARRO, R.F. **Fundamentos de reologia de biopolímeros**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, 1997. 300 p.
- NISHINARI, K. Polysaccharide rheology and in-mouth perception. In: _____. **Food polysaccharides and their applications**. v.16. New York: Marcel Dekker, 1995. cap. 16. p. 541-588.
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* C7 L1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 82-85, 2001.
- OLIVEIRA, A. R.; BUZATO, J. B.; HAULY, M. C. O. Produção contínua de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* a partir de melaço de cana-de-açúcar suplementado. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 1, p. 53-60, 2005.
- OLIVEIRA, J. M. **Caracterização do exopolissacarídeo produzido por *Mesorhizobium loti* Semia 816 a partir de glicerol residual**. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.
- OLIVEIRA, R. F.; SOUSDALEFF, M.; LIMA, M. V. S.; LIMA, H. O. S. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, p. 34-40, 2009.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; KNILL, J. F.; KOSSEVA, M. Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 219-226, 2010.

PARK, K-Y.; KIM, B. K. Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. In: _____ **Lactic acid bacteria - microbiological and functional aspects**. v. 4. Boca Raton, Estados Unidos: Taylor and Francis Group, 2012. cap. 10. p. 187-212.

PATRICK, O. M. Lactic acid bacteria in health and disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-42, 2012.

PAULI, T.; FITZPATRICK, J. J. Malt combining nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1-6, 2002.

PELCZAR Jr. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 518 p.

PIO, T. F.; FRAGA, L. P.; MACEDO, G. A.; Inoculum padronization for the production of cutinase by *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 74-77, 2008.

PNPB, Biodiesel: **Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>. Acesso em 12 de janeiro de 2018.

PRADA-PALOMO, Y.; ROMERO-VANEGAS, M.; DIAZ-RUÍZ, P.; MOLINA-VELASCO, D.; GUZMÁN-LUNA, C. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. from biodiesel derived raw glycerol. **Ciencia, Tecnología y Futuro**, v. 5, n. 1, p. 57-66, 2012.

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, p. 215–221, 2015.

RAZIKA, G.; AMIRA, B.; YACINE, B.; AMMAR, B. Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sultae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 30, p. 5940-5946, 2012.

REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 22-34, 2008.

RIBEIRO, V. A.; BURKERT, C. A. V. B. 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. **Produção e caracterização de exopolissacarídeos a partir de bactéria 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.

RIVALDI, J. D.; SILVA, M. L. C. S.; DUARTE, L. C.; FERREIRA, A. E. N.; CORDEIRO, C.; FELIPE, M. G. A.; FREIRE, A. P.; MANCILHA, I. M. Metabolism of biodiesel derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 1735-1743, 2013.

RUIZ, S. P.; MARTINEZ, C. O.; NOCE, A. S.; SAMPAIO, A. R.; BAESSO, M. L.; MATIOLI, G. Biosynthesis of succinoglycan by *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 15-28, 2015.

RUSSO, J. F. S. **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: 15 de março de 2018.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 554 p.

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

SILVA, G.P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30–39, 2009.

SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 515-531, 2008.

SOBRINHO, H. B.de S. **Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biossurfactante por *Candida sphaerica***. 2007. 98f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) - Universidade Federal do Recife, Recife, PE, 2007.

SOORO Ingredientes Confiáveis. **Permeado de soro de leite em pó**. Disponível em: <http://www.sooro.com.br/produtos/permeado-em-po/>. Acesso em: 13 de janeiro de 2018.

SOORO Ingredientes Confiáveis. **Produtos**. 2017. Disponível em: <http://www.sooro.com.br/produtos/permeado-em-po/>. Acesso em: 02 de janeiro de 2017.

SPIER, F.; BUFFON, J. G.; BURKERT, C. A. V. Bioconversion of raw glycerol generated from the synthesis of biodiesel by different oleaginous yeasts: lipid content and fatty acid profile of biomass. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 415-422, 2015.

STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, J.L.; PAINTER, P.R. **General microbiology**, 5th ed. London, England: Macmillan Education, 1986. 689 p.

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.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, v. 23, p. 80-142, 1982.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram-negative. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 181-204, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**; 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

TRINDADE, R. A.; MUNHOZ, A. P.; BURKERT, C. A. V. Raw glicerol as an alternative carbon source for cultivation of exopolysaccharide-production bacteria. **Journal of Applied Biotechnology**, n. 2, v. 3, p. 61-73, 2015.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. C.; CARVALHO, A. M.; LOBO-BURLE, M.; HUNGRIA, M. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: CERRADO: CORREÇÃO DO SOLO E ADUBAÇÃO, 2 ed., 2004, Planaltina, DF. **Anais...** Planaltina: EMBRAPA, CERRADOS, 2004, p. 97-127.

VIJAYAKUMAR, J.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Recent trends in the production, purification and applications of lactic acid. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, p. 245-264, 2008.

VICTORELLI, R. **Produção de L-ácido láctico a partir de células bacterianas imobilizadas**. 2011. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, SP, 2011.

WANG, Y.; CHEN, C.; CAI, D.; WANG, Z.; QIN, P.; TAN, T. The optimization of lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 1098-1105, 2016.

WEE, Y. J.; KIM, J. N.; RYU, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 63-172, 2006.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The general of lactic acid bacteria**. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995. 397 p.

YU, L.; LEI, T.; REN, X.; PEI, X.; FENG, Y. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 496-502, 2008.

WALLNER-KERSANACH, M. RIBEIRO, A. R. L.; MACHADO, E. C. 2010. Análise Instrumental - Analisador Elementar CHNS/O. In: Baumgarten, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M. & NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de análises em oceanografia química**. Editora da FURG, p. 145-166.

ZACARCHENCO, P. B; VAN DENDER, A. G. F.; SPADOTI, L. M; GALFINA, D. A.; TRENTO, F. K. H. S; ALVES, A. T. S. Permeado de soro. **Guia de referência do setor lácteo 2012**, p. 48-52, 2012.

ZHANG, Y.; VADLANI, P. Lactic acid production from biomass-derived sugars via co-fermentation of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 6, p. 694-699, 2015.

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.

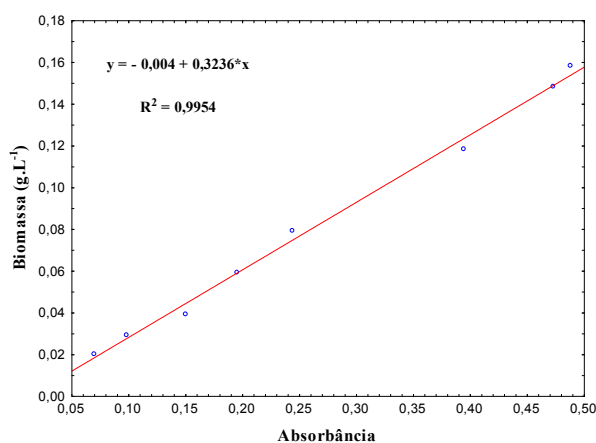
ZHOU, S.; SHANMUGAM, K. T.; YOMANO, L. P.; GRABAR, T. B.; INGRAM, L. O. Fermentation of 12% (w/v) glucose to 1.2 M lactate by *Escherichia coli* strain SZ194 using mineral salts medium. **Biotechnology Letters**, v. 28, p. 663-670, 2006.

ZOCCAL, R. **Queijos: produção e importação**, 2016. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>. Acesso em: 28 de setembro de 2017.

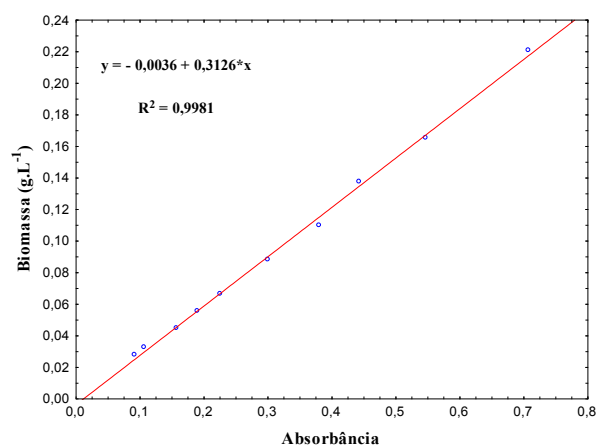
APÊNDICE

Apêndice A - Curva padrão para as bactérias estudadas

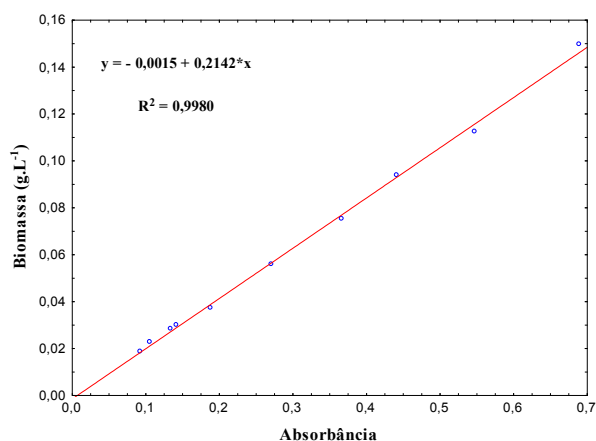
Figura 1A - Curva padrão de biomassa das bactérias (a) *L. rhamnosus* INCQS 00223, (b) *L. fermentum* INCQS 00224, (c) *L. helveticus* INCQS 00227, (d) *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, (e) *L. acidophilus* INCQS 00076, (f) *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035, (g) *L. leichmannii* INCQS 00008 e (h) *L. plantarum* INCQS 00007



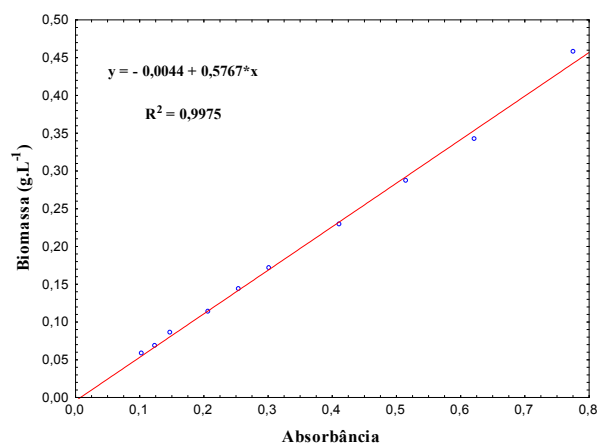
(a)



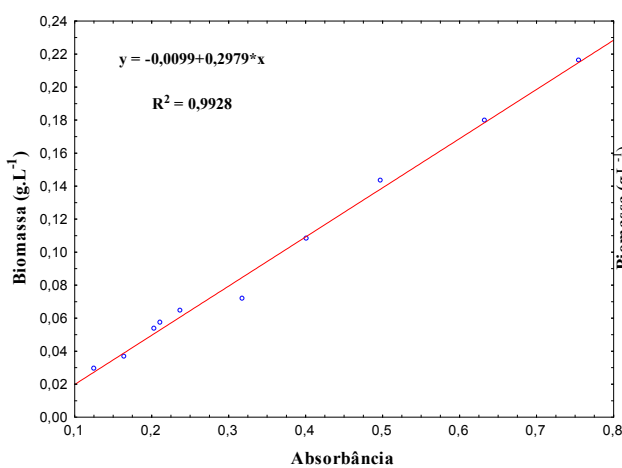
(b)



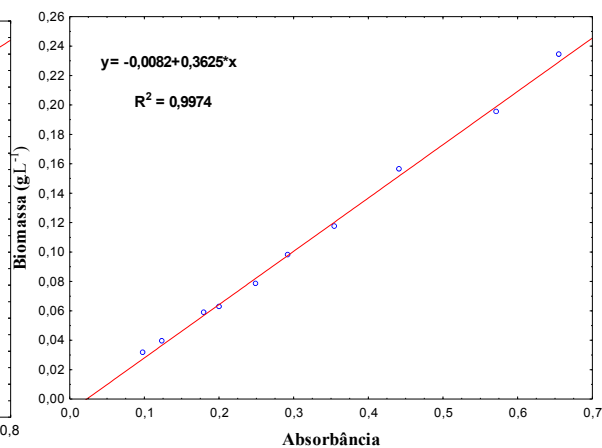
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 1A - Curva padrão de biomassa das bactérias (a) *L. rhamnosus* INCQS 00223, (b) *L. fermentum* INCQS 00224, (c) *L. helveticus* INCQS 00227, (d) *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, (e) *L. acidophilus* INCQS 00076, (f) *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035, (g) *L. leichmannii* INCQS 00008 e (h) *L. plantarum* INCQS 00007, continuação

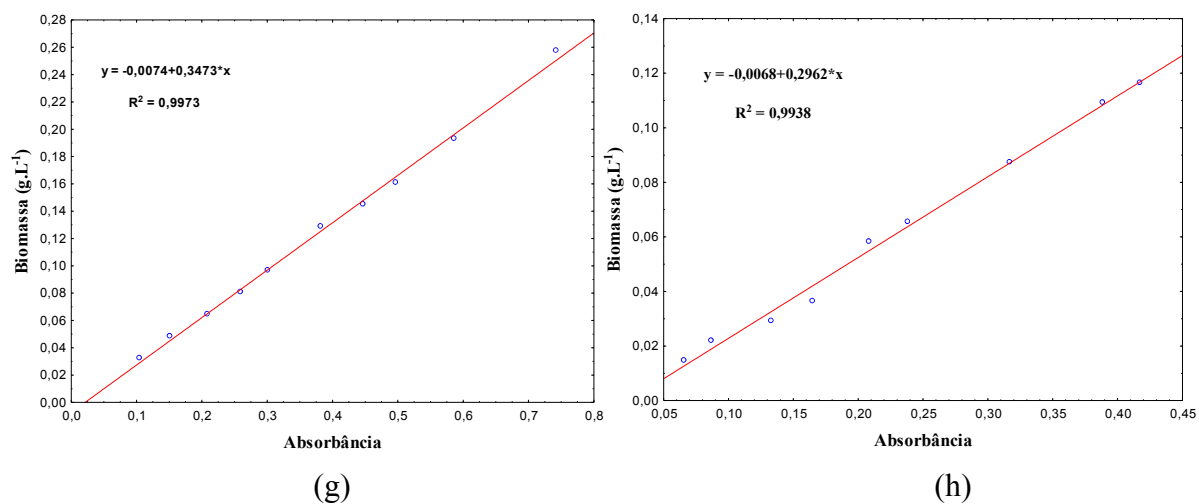
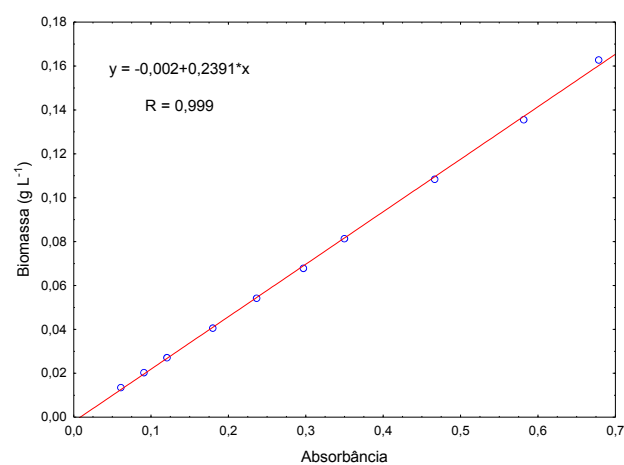


Figura 2A - Curva padrão de biomassa da bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816



Apêndice B - Acompanhamento da DO

Figura 1B - Acompanhamento da DO com (■) e sem agitação (◇) ao longo do tempo para (a) *L. rhamnosus* INCQS 00223, (b) *L. fermentum* INCQS 00224, (c) *L. helveticus* INCQS 00227, (d) *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, (e) *L. acidophilus* INCQS 00076, (f) *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035, (g) *L. leichmannii* INCQS 00008 e (h) *L. plantarum* INCQS 00007

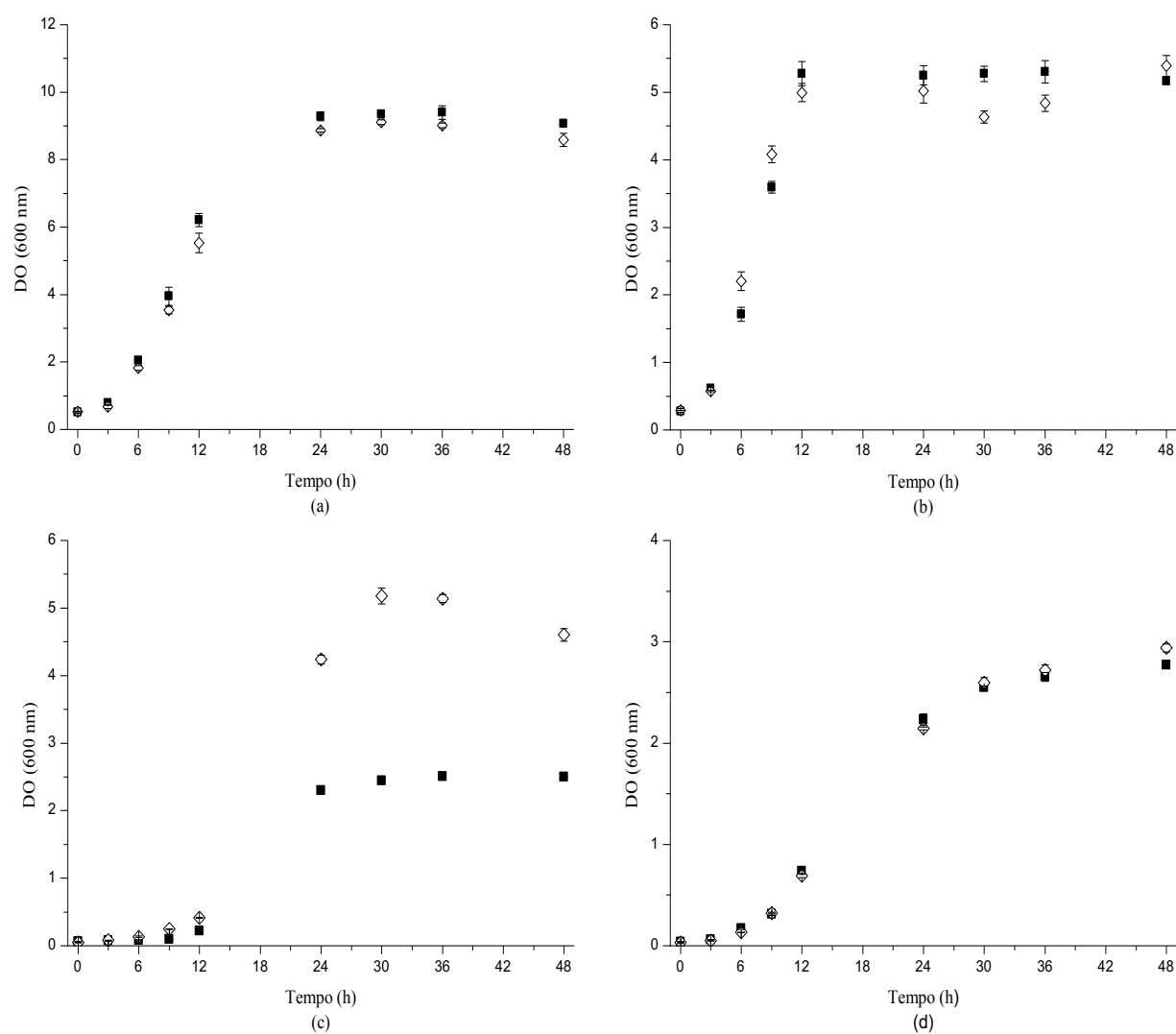


Figura 1B - Acompanhamento da DO com (■) e sem agitação (◇) ao longo do tempo para (a) *L. rhamnosus* INCQS 00223, (b) *L. fermentum* INCQS 00224, (c) *L. helveticus* INCQS 00227, (d) *L. paracasei* subsp. *paracasei* INCQS 00222, (e) *L. acidophilus* INCQS 00076, (f) *L. delbrueckii* subsp. *lactis* INCQS 00035, (g) *L. leichmannii* INCQS 00008 e (h) *L. plantarum* INCQS 00007, continuação

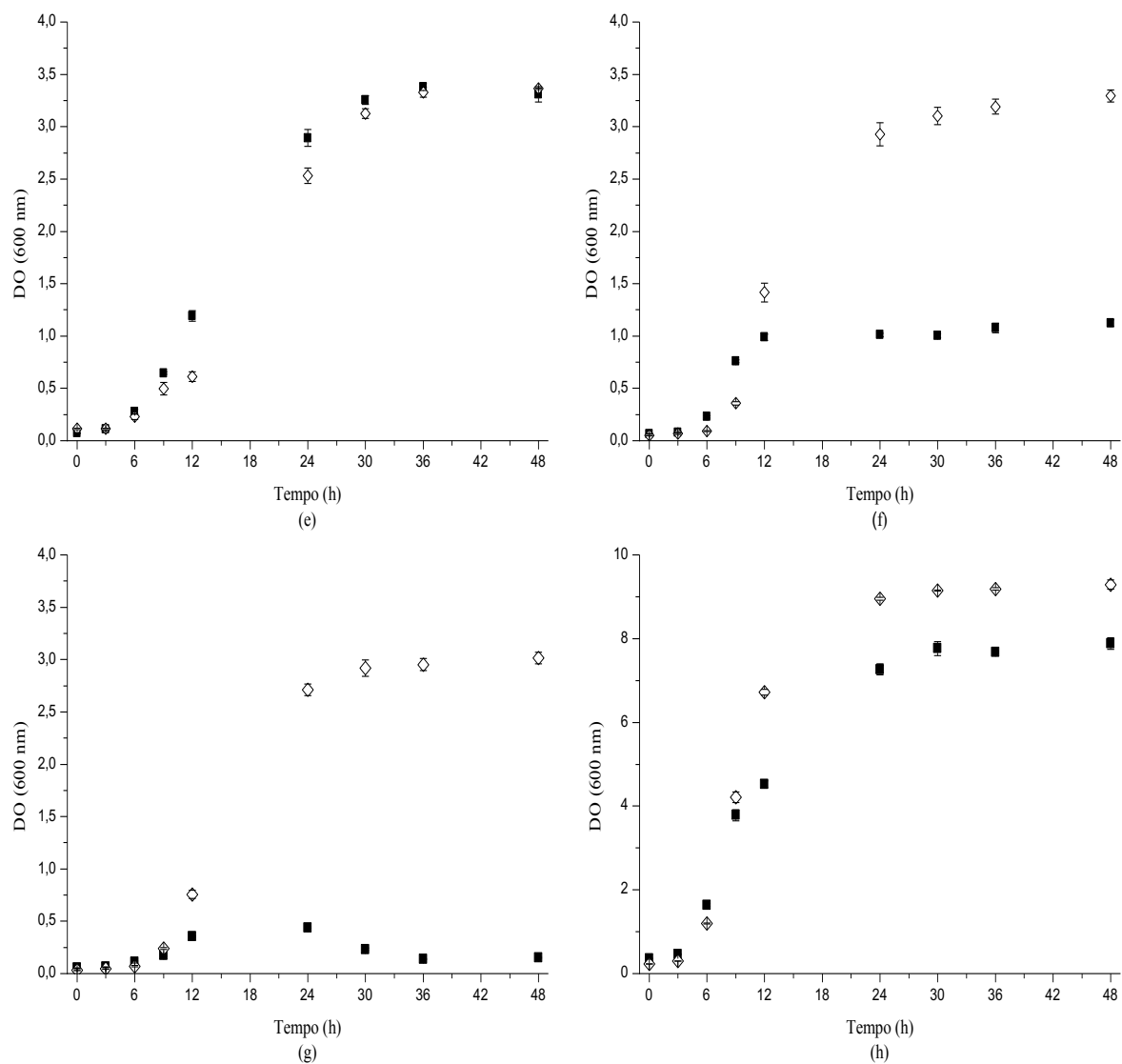
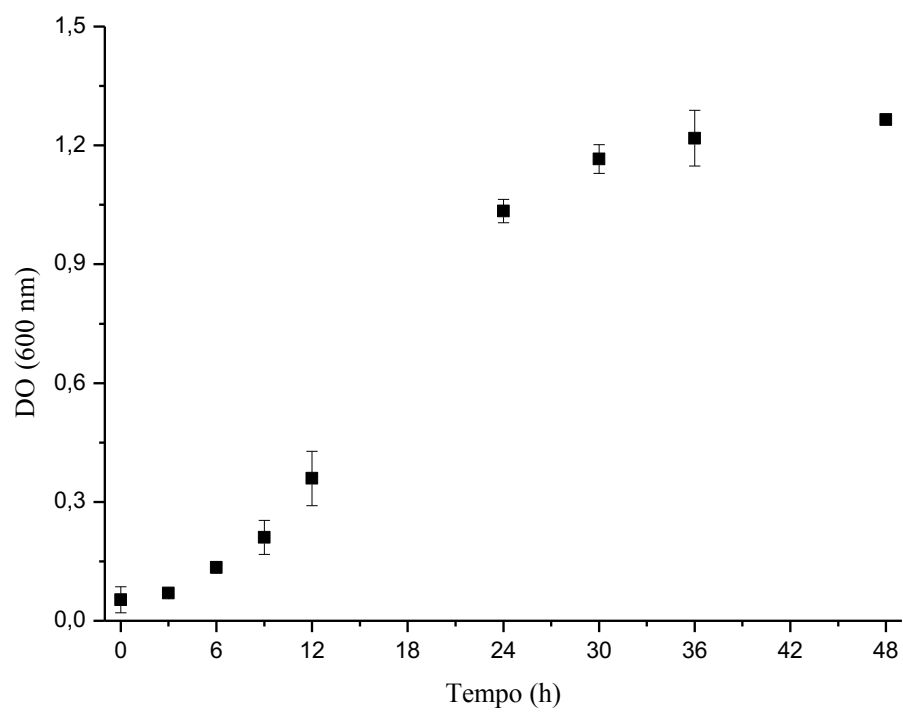
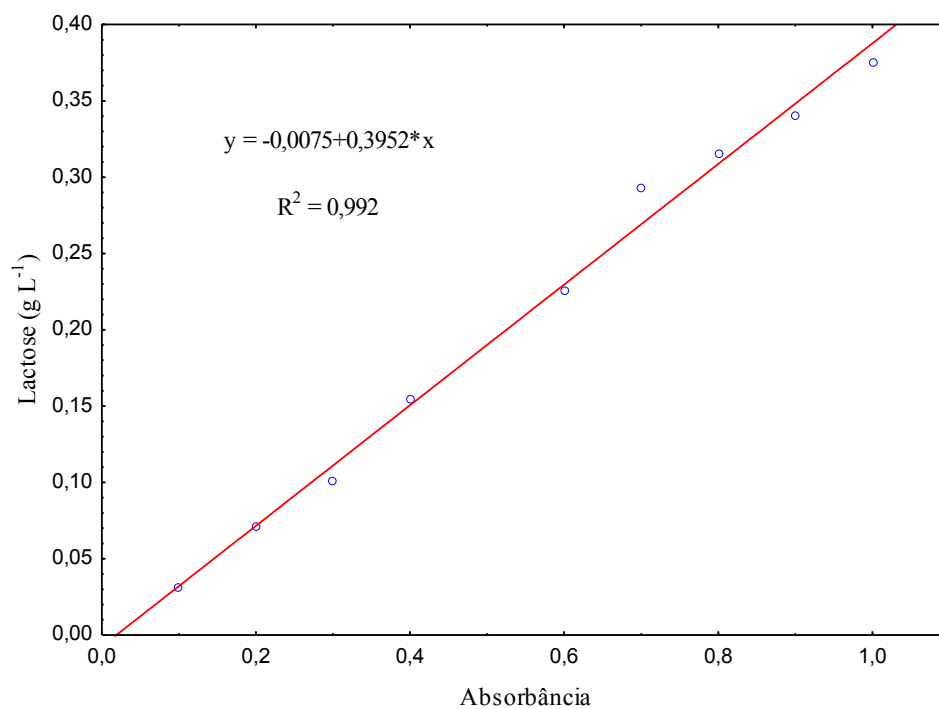


Figura 2B - Acompanhamento da DO para *Mesorhizobium loti* Semia 816



Apêndice C - Curva padrão de lactose**Figura 1C - Curva padrão de lactose pelo método 3,5 DNS**

Apêndice D - Valores utilizados na análise de efeitos

Figura 1D- Matriz do delineamento experimental PB com valores codificados e suas respectivas respostas

Ensaio	Variáveis												AL (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)	AR (g L ⁻¹)	C/N
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂				
1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	16,51	0,83	12,96	47,2
2	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	8,02	0,72	28,57	17,2
3	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	21,35	3,17	9,50	7,6
4	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	19,19	1,57	12,99	5,3
5	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	8,18	0,55	13,55	4,5
6	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	29,04	2,82	6,85	6,1
7	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	19,07	2,33	0,88	5,4
8	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	13,72	1,14	16,97	9,4
9	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	21,27	1,90	11,63	6,5
10	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	22,08	2,88	1,13	5,7
11	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	16,95	2,69	0,99	4,4
12	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	+1	13,20	1,74	18,37	8,1
13	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	14,40	1,05	5,50	10,6
14	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	8,86	0,88	8,65	6,6
15	-1,	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	5,57	0,47	6,27	5,1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	11,65	0,77	5,62	70,5
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,81	2,12	4,43	6,7
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,07	2,19	4,11	6,7
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,32	2,08	4,69	6,7
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26,01	1,88	5,21	6,7

X₁ permeado de soro (g L⁻¹); X₂ extrato de levedura (g L⁻¹); X₃ extrato de carne (g L⁻¹); X₄ peptona (g L⁻¹); X₅ acetato de sódio (g L⁻¹); X₆ Tween 80 (g L⁻¹); X₇ fosfato de potássio (g L⁻¹); X₈ citrato de amônio (g L⁻¹); X₉ sulfato de magnésio (g L⁻¹); X₁₀ sulfato de manganês (g L⁻¹); X₁₁ agitação (rpm) e X₁₂ temperatura (°C); AL: ácido láctico; AR: açúcares redutores

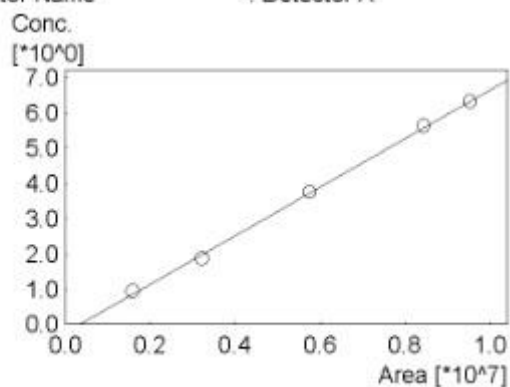
Apêndice E - Determinação de AL por CLAE

Figura 1E- Curva padrão de lactose

==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

<Calibration Curve>

ID# : 1
 Name : Acido Lactico
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=6.89143e-007 \cdot x-0.239071$
 $Rr1=0.9995401$ $Rr2=0.9990804$
 MeanRF:6.28704e-007 RFSD:4.18323e-008 RFRSD:6.65374
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 WeightedRegression : None
 Detector Name : Detector A

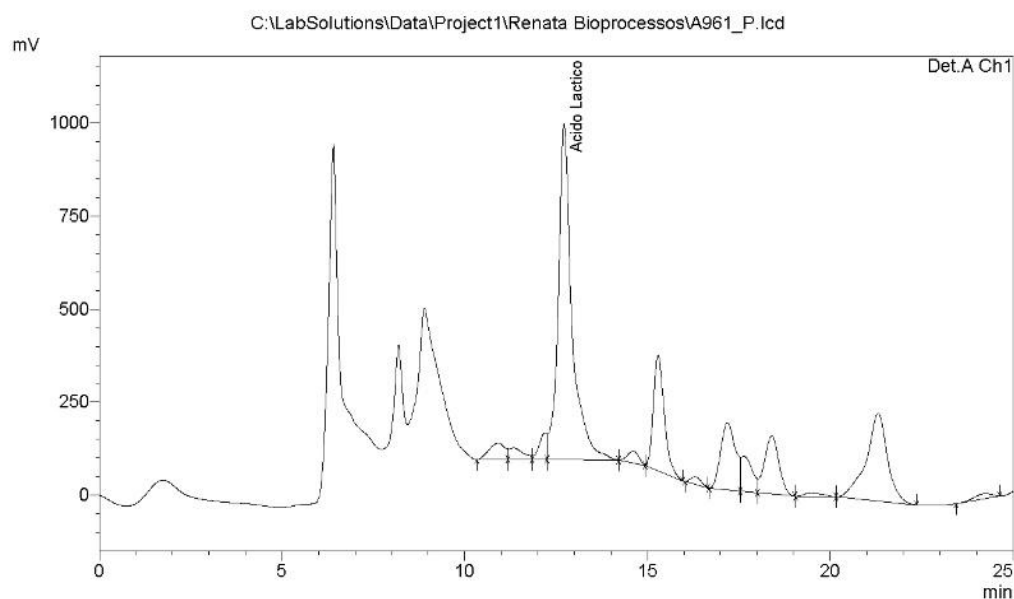


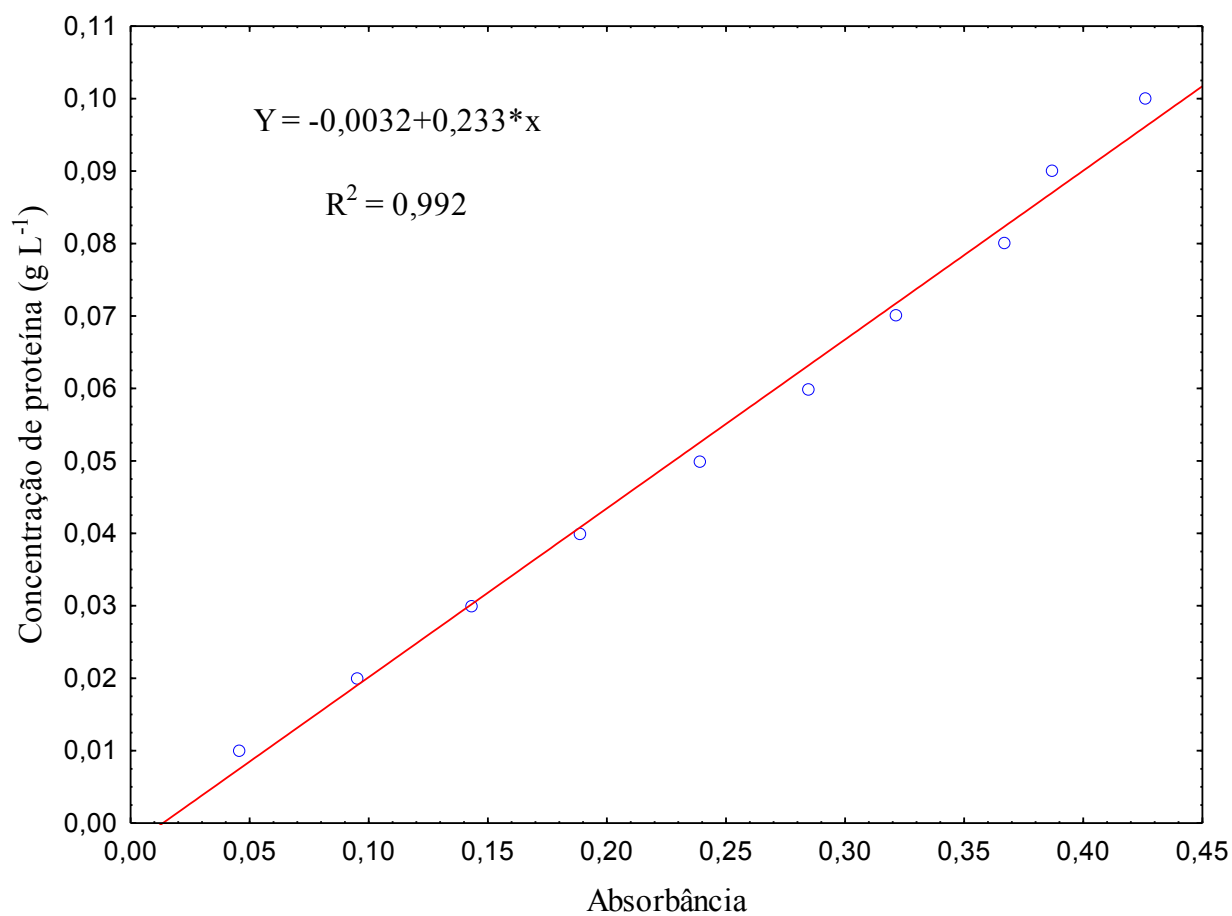
#	Conc (Ratio)	Area	Area
1	0.930	1534014.8	1534015
		1662171.5	1662172
2	1.870	3249771.4	3249771
		3174585.8	3174586
3	3.750	5713051.6	5713052
		5813737.3	5813737
4	5.630	8426195.0	8426195
		8452495.0	8452495
5	6.300	9482317.5	9482317
		9592610.7	9592611

Figura 2E- Cromatograma típico de amostra de cultivo

==== Shimadzu LCsolution LC Data Image ====

<Chromatogram>



Apêndice F - Curva padrão de proteína**Figura 1F - Curva padrão de proteína pelo método de Lowry**

ANEXO

Anexo A - Laudo do Glicerol Residual



Laudo Analítico

Produto:

Número do Lote:

Data de Carregamento:

9-GLICERINA BRUTA

890000001475

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação (1)		Métodos
			Min	Máx	
Umidade	% (m)	11.290	-	13.000	AOCS Ca 2e-84
Glicerol	% (m)	81.920	80.000	-	Official Mon.XXI
Cinza	% (m)	5.380	-	8.000	Official Mon.XXI
Cloretos	% (m)	6.180	-	7.000	Método de Mohr
pH		5.390	4.500	9.000	-
MONG	% (m)	1.410	-	2.000	Cálculo

Naime Gaiotti

LARISSA GARIBOTTI
CRQ 05302605 - 5ª Região / CREA 10.471D

Anexo B - Laudo do Permeado de Soro

Product Specification of Whey Permeate			
CHEMICAL SPECIFICATIONS		MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS	
Protein (Nx6.38) as is	max. 3 %	Total plate count	max. 10,000/g
Lactose monohydrate	min. 85 %	Enterobacteriaceae	max. 10/g
Ash	max. 7%	Staphylococcus aureus coagulase +	absent in 1 g
Moisture	max. 3.5 %	Yeast/Mould	max. 100/g
Bulk density	level 0.7 g/cm ³	Salmonella	absent in 125 g
PHYSICAL SPECIFICATIONS		PACKAGING	
pH (10% solution)	5.8 – 6.5	25 kg paper bags	1000 kg big bags
Scorched particles	Disc A		
Bulk density	level 0.7-0.8 g/cm ³		
Colour	pale yellow	SHELF LIFE	
Flavour/odour	bland, slightly salty	Minimum 12 months if stored in closed bags under cool and dry conditions.	
		Quality is our most important parameter	
		- Full commitment to the environment and our responsibility - Natural whey ingredients - Uniform high product quality – every time - Traceability of every product - Complete security of supply: The capacity, logistics, and documentation you need - State-of-the-art, HACCP and ISO certified production sites - Dedicated R&D lab and pilot plant	

Anexo C - Laudo da Água de Maceração de Milho

MILHOCINA®

Solução concentrada obtida da maceração das grãos de milho, contendo em sua composição química polissacarídeos solúveis, aminoácidos e sais minerais.

Especificações:

Físico-Químicas:

Viscosidade (mPa.s)
pH

Min. Max.

25-35 24-30
3,7 4,8

Principais aplicações:

Mão de obra na fabricação de produtos

Funcionalidade:

- Fonte dos principais aminoácidos e nutrientes necessários ao desenvolvimento do organismo.

Armazenagem:

Armazenar em local fresco, seco e ventilado.

Embalagem - Vida útil:

Até 12 meses

Até 12 meses 24 kg - 15 dias

Tambor de aço (até 240 kg) - 15 dias

Tambor de plástico (até 240 kg) - 15 dias

Informações Regulatórias:

Registro nº 123456789
Registro nº 123456789

Ingredion

Ingredion é uma empresa de capital aberto listada na Bolsa de Valores de São Paulo (B3) sob o ticker IGRD3. A Ingredion é uma empresa de capital aberto listada na Bolsa de Valores de São Paulo (B3) sob o ticker IGRD3. A Ingredion é uma empresa de capital aberto listada na Bolsa de Valores de São Paulo (B3) sob o ticker IGRD3.

Ingredion é uma empresa de capital aberto listada na Bolsa de Valores de São Paulo (B3) sob o ticker IGRD3.

Ingredion é uma empresa de capital aberto listada na Bolsa de Valores de São Paulo (B3) sob o ticker IGRD3.

Ingredion é uma empresa de capital aberto listada na Bolsa de Valores de São Paulo (B3) sob o ticker IGRD3.

Ingredion é uma empresa de capital aberto listada na Bolsa de Valores de São Paulo (B3) sob o ticker IGRD3.