

Área: Tecnologia de Alimentos

EXOPOLISSACARÍDEOS DE *Mesorhizobium loti* Semia 816 A PARTIR DO PERMEADO DE SORO: PRODUÇÃO E VISCOSIDADE

Mariana Vilar Castro da Veiga de Mattos*, Renata Aguirre Trindade, Adriel Penha Munhoz, Fernanda Germano Alves Gautério, Carlos André Veiga Burkert

Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS

*E-mail: marianavcvmattos@gmail.com

RESUMO – Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias e apresentam grande aplicação em diferentes setores, como indústria alimentícia e farmacêutica, devido ao fato de conferirem alta viscosidade às soluções em que são incorporados. As aplicações destes biopolímeros na indústria de alimentos mais conhecidas são como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, gelificantes, entre outras. O objetivo do presente trabalho foi utilizar o permeado de soro em diferentes concentrações no cultivo de *Mesorhizobium loti* Semia 816, visando produzir EPS, bem como determinar sua viscosidade. A partir do estudo foi possível verificar que no cultivo com 30 g L⁻¹ de permeado de soro foi encontrado um valor mais elevado de concentração do EPS (9,46±0,80 g L⁻¹), não diferindo significativamente (p>0,05) de quando utilizada a concentração de 20 g L⁻¹ (8,21±0,29 g L⁻¹), mas diferindo significativamente (p<0,05) da concentração de 10 g L⁻¹ (4,03±0,04 g L⁻¹). Verificou-se também que as soluções de EPS apresentaram comportamento pseudoplástico típico, em que a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento. A solução de EPS produzido a partir do cultivo com 20 g L⁻¹ de permeado de soro apresentou a maior viscosidade inicial (11.471 cP), seguida pelo EPS obtido em meio com 10 g L⁻¹ (10.248 cP) e pelo EPS produzido pelo cultivo com 30 g L⁻¹ de fonte de carbono (9.177 cP).

Palavras-chave: Polissacarídeos; Bactérias diazotróficas; Biopolímeros; Pseudoplasticidade.

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares que podem ser produzidos por alguns fungos e bactérias e são encontrados em forma de limo, ou seja, excretados para o meio extracelular ou podem ser encontrados ligados à superfície das células (BARBOSA, et al., 2004). São também conhecidos como gomas, sendo produzidos por micro-organismos, apresentando a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (RIBEIRO; TEIXEIRA; BURKERT, 2014). Dentre as bactérias estudadas por produzirem quantidades consideráveis de EPS estão as bactérias diazotróficas da família *Rhizobaceae*, constituída pelos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*. Tais

bactérias utilizam o EPS para sua fixação nas raízes de plantas leguminosas em um processo que facilita a obtenção de nutrientes, fornece proteção contra o ambiente e defesas do hospedeiro (MONTEIRO et al., 2012).

Estes biopolímeros podem ser aplicados em diferentes setores industriais, tais como alimentício e farmacêutico, devido ao fato de alterarem as propriedades físicas do meio onde se encontram, seja por conferir alta viscosidade às soluções onde são adicionadas ou por criarem redes intermoleculares coesivas (ARANDA-SELVERIO et al., 2010). Os EPS produzidos por algumas bactérias e fungos possuem propriedades semelhantes às do ágar, outros possuem propriedades reológicas que são valiosas para o emprego industrial, tais como propriedades espessantes, gelificantes e emulsificantes, coagulantes, entre outras (BARBOSA et al., 2004). Alguns polissacarídeos microbianos, como xantana, dextrana e gelana, já são conhecidas pela sua aplicação comercial nas indústrias (ARANDA- SELVERIO et al., 2010).

De acordo com SERRATO (2008) a fonte de carbono é um dos fatores que influenciam a produção de EPS, bem como o teor de nitrogênio e fósforo disponível, aeração, temperatura e pH da cultura. O permeado de soro é um coproduto agroindustrial que vem sendo estudado devido à sua grande quantidade de nutrientes, que consistem principalmente de lactose, minerais e traços de compostos nitrogenados (HASSEMER et al., 2015). O permeado de soro é obtido quando o soro de queijo é ultrafiltrado para concentrar as proteínas, que ficam retidas e, então, lactose, sais e vitaminas atravessam a membrana para o permeado (ZACARCHENCO et al., 2012). Desta forma, este trabalho tem como objetivo utilizar o permeado de soro em diferentes concentrações no cultivo de *Mesorhizobium loti* Semia 816, visando produzir EPS, bem como determinar sua viscosidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O permeado de soro em pó foi cedido pelo Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas - CETEC - UNIVATES, localizada em Lajeado-RS, produzido pela empresa *Arla Food Ingredients*, localizada na Dinamarca, contendo aproximadamente 85 % ($m\ m^{-1}$) de lactose.

A bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816 foi obtida do Banco de Culturas da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, sendo reativada a 30°C em meio *Yeast Manitol* (YMA), contendo ($g\ L^{-1}$): 10 manitol, 0,1 K_2HPO_4 , 0,4 KH_2PO_4 , 0,2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 NaCl, 0,4 extrato de levedura e 15 ágar, incubando-se em temperatura controlada (30 °C) por 48 h (DUTA et al., 2004).

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

Os cultivos foram realizados em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL de meio, inoculados com suspensão da bactéria a 30°C e 200 rpm. Foi utilizado o caldo YMA com modificações: pH ajustado em 7,0, substituindo o manitol pelo permeado do soro, nas concentrações de 10, 20 e 30 $g\ L^{-1}$, com ajuste da concentração do extrato de levedura para 1,9; 3,8 e 5,7 $g\ L^{-1}$, respectivamente, a fim de resultar na razão C/N 20.

Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo, sendo estas centrifugadas (centrífuga Eppendorf 5804R, Alemanha) para as determinações analíticas no sobrenadante (açúcar redutor, EPS) e sedimento (biomassa).

A biomassa foi monitorada por medida da absorvância a 600 nm no sedimento ressuspensionado em água, sendo centrifugada por 15 min a 10.000 x g (TRINDADE, MUNHOZ; BURKERT, 2015). A concentração de

açúcar redutor foi determinada pelo método do ácido 3,5 ácido dinitrossalicílico (MILLER, 1959), com medida de absorvância a 540 nm e conversão para g L^{-1} a partir de uma curva padrão de lactose.

O EPS foi recuperado ao final do cultivo (96 h), centrifugando-se 10 mL do caldo por 20 min a 10.000 x g, seguido de precipitação do sobrenadante por adição de etanol (1:3 v v⁻¹), após a segunda centrifugação, o EPS foi seco em estufa a 50°C e quantificado por gravimetria. Para a determinação da viscosidade, após precipitação o EPS foi dissolvido, dialisado, liofilizado e solubilizado (1% m v⁻¹) em água Milli-Q, sendo determinada a viscosidade aparente (cP) em função da taxa de cisalhamento (s⁻¹) utilizando reômetro digital (Brookfield, EUA).

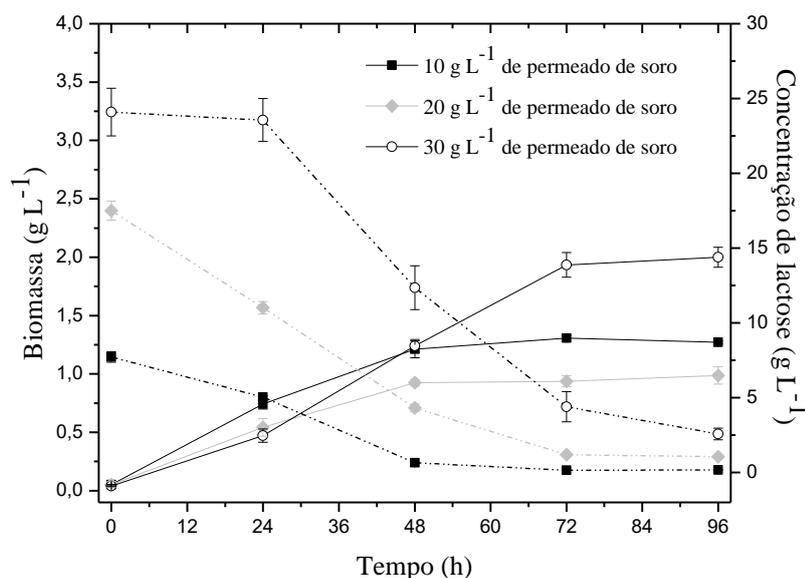
Os valores médios e desvios padrão foram calculados através do *software Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA)* (MONTGOMERY, 2004), sendo que para a construção dos gráficos utilizou-se o *software OriginPro 8 (OriginLab,EUA)*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o acompanhamento da biomassa e concentração de lactose, utilizando 10, 20 e 30 g L^{-1} de permeado de soro, mantendo a razão C/N de 20 pelo ajuste da fonte de nitrogênio. Ao analisar a figura é possível verificar que se obteve uma maior concentração de biomassa quando utilizado 30 g L^{-1} de permeado de soro, chegando a $2,0 \pm 0,09 \text{ g L}^{-1}$ (96h), seguido pelo cultivo com 10 g L^{-1} de permeado de soro ($1,27 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$ também em 96 h) e 20 g L^{-1} ($0,99 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$).

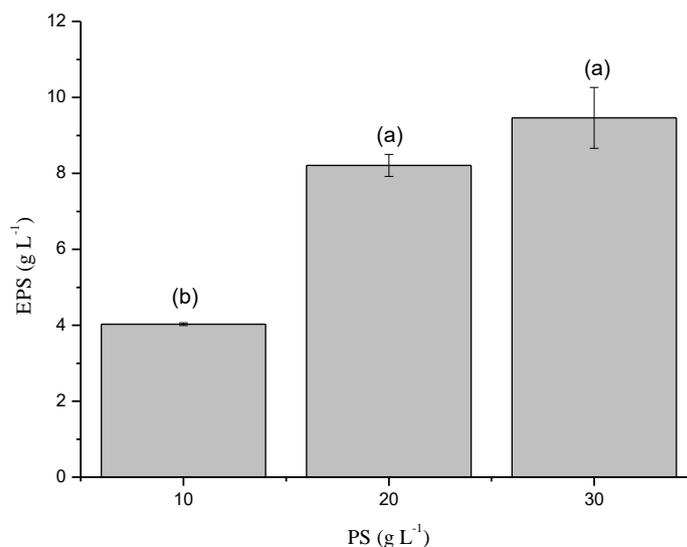
Já a concentração de lactose em 96 h de cultivo foi menor no cultivo com 10 g L^{-1} da fonte de carbono, chegando a $0,17 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$. O cultivo que apresentou uma maior concentração de lactose em mesmo período de tempo de análise foi com 30 g L^{-1} ($2,58 \pm 0,39 \text{ g L}^{-1}$) seguido pelo cultivo com 20 g L^{-1} ($1,05 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$).

Figura 1 - Acompanhamento da biomassa (linha contínua) e concentração da lactose (linha pontilhada) utilizando permeado de soro na razão C/N de 20



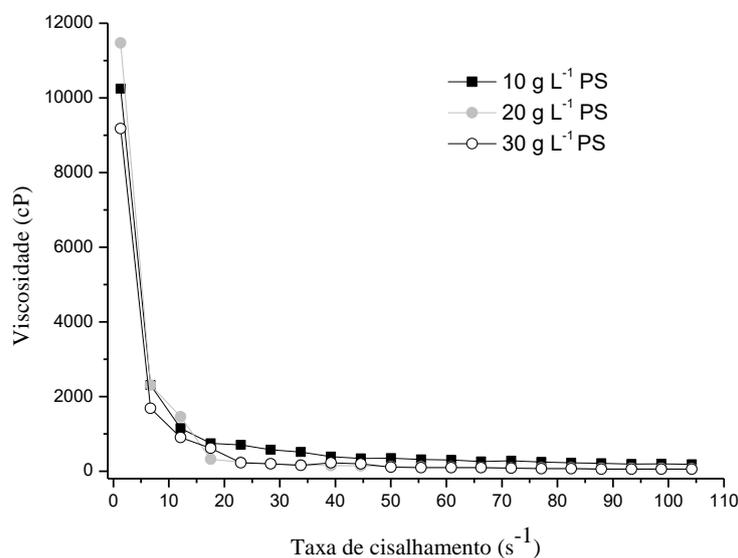
A Figura 2 apresenta os valores das concentrações de EPS nas diferentes concentrações de permeado de soro utilizado nos cultivos. Ao analisar os resultados, se pode perceber que o cultivo com menor concentração de permeado de soro (10 g L^{-1}) apresentou o menor valor de concentração de EPS ($4,03 \pm 0,04 \text{ g L}^{-1}$), seguido pelo cultivo com 20 g L^{-1} de permeado, que resultou em $8,21 \pm 0,29 \text{ g L}^{-1}$ de concentração de EPS, não diferindo significativamente ($p > 0,05$) de quando utilizado 30 g L^{-1} de permeado de soro ($9,46 \pm 0,80 \text{ g L}^{-1}$).

Figura 2- Concentração de EPS nos cultivos com diferentes concentrações da fonte de carbono.



Ao analisar a Figura 3 verificou-se que as soluções de EPS apresentaram comportamento pseudoplástico típico, em que a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento. A solução preparada com o EPS produzido a partir do cultivo com 20 g L^{-1} apresentou uma maior viscosidade inicial (11.471 cP), seguida pelo EPS obtido em meio contendo 10 g L^{-1} de permeado de soro (10.248 cP) e pelo EPS produzido pelo cultivo com 30 g L^{-1} de fonte de carbono (9.177 cP).

Figura 3- Viscosidade x taxa de cisalhamento para soluções de EPS 1 % (m v^{-1}).



4 CONCLUSÃO

Ao analisar os resultados obtidos no estudo, foi possível verificar que a bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816 foi capaz de crescer e produzir quantidades apreciáveis de EPS em meio contendo o permeado de soro, sendo que a concentração deste teve efeito sobre a produção. Entre as condições testadas, o uso de 20 g L⁻¹ de permeado de soro resultou na obtenção de 8,21±0,29 g L⁻¹ de EPS, valor este que não diferiu de 30 g L⁻¹ (9,46±0,80 g L⁻¹), sendo que nesta concentração atingiu-se a maior viscosidade inicial (11.471 cP). Verificou-se também que as soluções de EPS apresentaram comportamento pseudoplástico típico, em que a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem FAPERGS, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

6 REFERÊNCIAS

- ARANDA-SELVERIO, G., PENNA, A. L. B., CAMPOS-SÁS, L. F., JUNIOR, O. S., VASCONCELOS, A. F. D., SILVA, M. L. C., LEMOS, E. G. M., CAMPANHARO, J. C., SILVEIRA, J. L. M. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 895-899, 2010.
- BARBOSA, A. M., CUNHA, P. D. T., PIGATTO, M. M., SILVA, M. L. C. Produção e aplicações de exopolissacarídeos fúngicos. **Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29-42, 2004.
- 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.
- HASSEMER, G.; DALLAGNOL, G.; FACCIN, D. J. L.; RECH, R. Avaliação do permeado de soro como meio de cultivo de *Bacillus megaterium*. **5º Simpósio de Segurança Alimentar Alimentação e Saúde**, Bento Gonçalves, 2015.
- 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**, n. 4, v. 35, p. 705-708, 2012.
- MONTGOMERY, D.C. **Introdução ao controle estatístico de qualidade**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004
- RIBEIRO, V. A., TEIXEIRA, M., BURKERT, C. A. V. **Cultivo de bactérias utilizando glicerina residual para obtenção de exopolissacarídeos**. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, 2014.

SERRATO, R.V. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficasendofíticas.** 2008. 143 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFPR, Curitiba. 2008.

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

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.

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.