



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

**EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE
EXOPOLISSACARÍDEOS POR *Mesorhizobium* sp. A PARTIR DE PERMEADO DE
SORO DE QUEIJO**

SHERLEN KARINE DA CRUZ

PROF. DR. CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT

Orientador

PROFA. DRA. JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT

Coorientadora

RIO GRANDE – RS
2021

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

**EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE
EXOPOLISSACARÍDEOS POR *Mesorhizobium* sp. A PARTIR DE PERMEADO DE
SORO DE QUEIJO**

SHERLEN KARINE DA CRUZ

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Engenharia
Química.

CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
Orientador

JANAÍNA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT
Coorientadora

RIO GRANDE – RS
2021

Ficha Catalográfica

C957e Cruz, Sherlen Karine da.
Efeitos das condições de processo na produção de exopolissacarídeos por *Mesorhizobium* sp. a partir de permeado de soro de queijo / Sherlen Karine da Cruz. – 2021.
74 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Rio Grande/RS, 2021.

Orientador: Dr. Carlos André Veiga Burkert.

Coorientadora: Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert.

1. Bactérias diazotróficas 2. Exopolissacarídeos 3. Permeado de soro de queijo 4. Planejamento experimental 5. Otimização de processos I. Burkert, Carlos André Veiga II. Burkert, Janaína Fernandes de Medeiros III. Título.

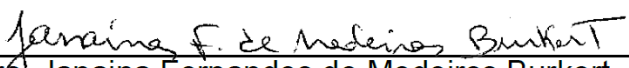
CDU 66.0:664

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Sherlen Karine da Cruz e aprovada em 12 de fevereiro de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG



Profa. Dra. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert – FURG



Profa. Dra. Celia Francisca Centeno da Rosa – UFPEL



Prof. Dr. Luiz Antônio de Almeida Pinto – FURG

Aos meus pais e irmãos, dedico mais esta conquista!

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar meus passos e conceder saúde, força e sabedoria durante toda minha caminhada.

Aos meus pais Luiz Carlos e Vera Lúcia, pelo intenso amor, incentivo apoio e dedicação, não medindo esforços para que meus sonhos sejam realizados.

Aos meus irmãos, Helen, Kelen e Jean, que sempre serviram como grandes exemplos, por todo carinho, suporte e incentivo.

Aos meus sobrinhos e à minha avó por todo afeto e compreensão nos momentos que estive ausente.

A todos meus amigos, pelo companheirismo, amizade e por estarem sempre me apoiando e proporcionando momentos alegres nas horas de dificuldade.

Ao meu orientador prof. Dr. Carlos André e à minha coorientadora prof. Dra Janaína, pelos ensinamentos, orientação, confiança e paciência, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao técnico Bruno e aos colegas de laboratório Belkis, Joice, Tabita e Jandler por todo suporte na realização das análises laboratoriais e conhecimento compartilhado.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização do curso de mestrado.

E por fim, a todos que me incentivaram ou colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares produzidos por microorganismos em resposta a condições ambientais extremas ou a um estresse durante o crescimento microbiano, possuindo diferentes propriedades físico-químicas e estruturais interessantes ao setor industrial. Bactérias diazotróficas vêm sendo estudadas por produzirem quantidades expressivas de EPS, sendo que a maioria dos processos utilizam substratos de custo elevado como manitol, glicose e sacarose. Assim, o emprego de subprodutos ou resíduos agroindustriais tem sido investigado como alternativa. O rendimento e as características dos EPS variam com as condições de cultivo, incluindo a composição do meio, temperatura, pH, agitação e aeração. Dessa forma, o presente estudo buscou otimizar a produção de EPS avaliando como as condições de cultivo da bactéria *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 afetam o processo, utilizando permeado de soro de queijo (PS) como fonte de carbono. Um planejamento experimental Plackett-Burman (PB) de 20 ensaios, com 4 pontos centrais, foi realizado para avaliar a influência de 12 variáveis na concentração de EPS e biomassa máxima: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, extrato de levedura (EL), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, PS, pH inicial do meio de produção, relação volume inicial de meio: volume de reator ($V_i:V_R$), agitação e temperatura. Analisando os resultados do planejamento experimental, observou-se que a produção de EPS variou de 0 até $9,28 \text{ g L}^{-1}$ e que 10 das 12 variáveis estudadas demonstraram efeitos significativos na resposta, sendo a concentração de PS a mais influente. O aumento das concentrações do K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e PS foi positivo. Efeitos contrários foram observados para KH_2PO_4 , EL, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, pH inicial do meio de produção, relação $V_i:V_R$, agitação e temperatura, enquanto as variáveis NaCl e $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ não influenciaram. Para a concentração de biomassa, que variou de 0,6 a $7,15 \text{ g L}^{-1}$, o incremento nas variáveis $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, PS e EL foram significativos e positivos, sendo este último o de maior influência e oposto ao encontrado para a concentração de EPS. O aumento da relação $V_i:V_R$ e temperatura influenciaram negativamente a produção de biomassa, e as demais variáveis independentes não influenciaram significativamente nesta resposta. Cultivos subsequentes foram realizados variando a concentração de EL (0,4, 2,2 e $4,0 \text{ g L}^{-1}$) e utilizando as demais variáveis nas melhores condições indicadas no planejamento experimental para aumentar a concentração de EPS. As condições testadas comprovaram os resultados encontrados no planejamento PB, sendo que o aumento da concentração de EL levou a um maior crescimento microbiano (1,25, 2,43 e $3,14 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente) e menor produção de EPS ($6,92$, $3,15$ e $0,75 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente), sendo essa produção de EPS 19,6% inferior ao alcançado no PB. Dessa forma, as condições de cultivo impactam diretamente a produção de EPS, sendo as concentrações de carboidratos e fonte de nitrogênio de grande influência no processo. Dentre todas condições avaliadas no presente estudo a mais eficaz foi aquela correspondente aos pontos centrais do planejamento PB, com o meio composto por $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de K_2HPO_4 , $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de KH_2PO_4 , $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl, $2,2 \text{ g L}^{-1}$ de EL, $0,12 \text{ g L}^{-1}$ de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $0,15 \text{ g L}^{-1}$ de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 25 g L^{-1} de PS, utilizando-se pH inicial 7,0, agitação de 150 rpm, relação $V_i:V_R$ 0,2:1 e temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, alcançando em média $8,61 \text{ g L}^{-1}$ de EPS em 96 h e $3,04 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa máxima em 72 h.

Palavras-chaves: Bactérias diazotróficas, exopolissacarídeos, permeado de soro de queijo, planejamento experimental e otimização de processos.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are extracellular polysaccharides produced by microorganisms in response to extreme environmental conditions or stress during microbial growth, having different physico-chemical and structural properties of interest to the industrial sector. Diazotrophic bacteria have been studied for producing significant amounts of EPS and most processes use high cost substrates such as mannitol, glucose and sucrose, so the use of by-products or agroindustrial waste has been investigated as an alternative. The yield and characteristics of EPS vary with cultivation conditions, including the composition of the medium and other parameters such as pH, temperature, aeration and agitation. Thus, the present study aimed at the optimization of the EPS production by evaluating how the culture conditions of the bacterium *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 affect the process, using whey permeate as a carbon source. A Plackett-Burman (PB) experimental design of 20 trials, with 4 central points, was performed to evaluate the influence of 12 variables on the EPS concentration and maximum biomass: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, yeast extract (YE), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, whey permeate (WP), initial pH of production medium, initial volume of medium: reactor volume ratio ($V_i:V_R$), agitation and temperature. Analyzing the results, it was observed that the EPS production varied from 0 to 9.28 g L^{-1} , with 10 of the 12 studied variables showing significant effects on the response, with the WP concentration being the most influent. The increase in the concentration of K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and WP was positive. Contrary effects were observed for KH_2PO_4 , YE, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, initial pH of the production medium, $V_i:V_R$ ratio, agitation and temperature, and the variables NaCl and $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ did not influence. For the biomass concentration, which varied from 0.6 to 7.15 g L^{-1} , the increase in the variables $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, WP and YE were significant and positive, the latter being the one with the greatest influence and opposite to that found for EPS concentration. The increase in the $V_i:V_R$ ratio and temperature negatively influenced biomass production and the other independent variables did not significantly influence this response. Subsequent cultures were performed by varying the YE concentration (0.4 , 2.2 and 4.0 g L^{-1}) and using the other variables in the best conditions indicated in the experimental design to increase the EPS concentration. The conditions tested proved the results found in the PB design, and the increase in the YE concentration led to an increase in microbial growth (1.25 , 2.43 and 3.14 g L^{-1} , respectively) and lower EPS production (6.92 , 3.15 and 0.75 g L^{-1} , respectively), this EPS production being 19.6% lower than that achieved in PB. Thus, the cultivation conditions directly impact the EPS production, since the concentrations of carbohydrates and nitrogen source have great influence in the process. Among all conditions evaluated in the present study, the most effective was that corresponding to the central points of PB design, with the medium composed of 0.1 g L^{-1} of K_2HPO_4 , 0.4 g L^{-1} of KH_2PO_4 , 0.2 g L^{-1} of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g L^{-1} of NaCl, 2.2 g L^{-1} of YE, 0.12 g L^{-1} of $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0.15 g L^{-1} of $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and 25 g L^{-1} of WP, using initial pH 7, agitation at 150 rpm, $V_i:V_R$ ratio of 0.2:1 and temperature of $30 \text{ }^\circ\text{C}$, reaching a mean value of 8.61 g L^{-1} in 96 h for EPS and 3.04 g L^{-1} in 72 h for maximum biomass.

Keywords: Diazotrophic bacteria, exopolysaccharides, experimental design, process optimization and whey permeate.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos e condições de cultivo na produção de EPSs rizobianos.....	26
Tabela 2 – Variáveis e níveis do planejamento Plackett-Burman.	39
Tabela 3 – Matriz do Planejamento Plackett-Burman com valores reais e codificados.....	40
Tabela 4 – Resultados do planejamento experimental de Plackett-Burman para as respostas biomassa máxima, EPS, produtividades e fator de conversão de biomassa em produto.	43
Tabela 5 – Efeitos estimados utilizando a concentração de EPS como variável dependente sem análise de curvatura.	49
Tabela 6 – Efeitos estimados utilizando a concentração de EPS como variável dependente com análise de curvatura.	50
Tabela 7 – Efeitos estimados utilizando a concentração de biomassa máxima como variável dependente sem análise de curvatura.....	53
Tabela 8 – Efeitos estimados utilizando a quantidade de biomassa máxima como variável dependente com análise de curvatura.	54
Tabela 9 – Condições dos cultivos 1, 2 e 3.	59
Tabela 10 – Médias \pm desvios-padrão (n=5) para biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$), EPS, produtividade de biomassa (P_X), produtividade de EPS (P_{EPS}) e fator de conversão de biomassa em EPS ($Y_{P/S}$).	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da biossíntese dos exopolissacarídeos.	22
Figura 2 – Acompanhamento do pH dos ensaios do planejamento de Plackett-Burman.....	46
Figura 3 – Acompanhamento da biomassa dos ensaios do planejamento Plackett-Burman...	47
Figura 4 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados na análise estatística dos ensaios do planejamento Plackett-Burman em relação à concentração de EPS.....	51
Figura 5 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados na análise estatística dos ensaios do planejamento Plackett-Burman em relação à concentração de biomassa máxima.....	55
Figura 6 – Acompanhamento do pH e biomassa dos cultivos (a) 1 (b) 2 e (c) 3.	62

NOMENCLATURA

DO - Densidade Ótica

FBN - Fixação Biológica de Nitrogênio

EL - Extrato de Levedura

EPS - Exopolissacarídeo

GC - Glicanas Cíclicas

HePS - Heteropolissacarídeos

HoPS - Homopolissacarídeos

LPS - Lipossacarídeos

PB - Plackett-Burman

P_{EPS} - Produtividade em EPS

PS - Permeado de soro de queijo

PSC - Polissacarídeos Capsulares

$P_{máx}$ - Concentração máxima de EPS

P_0 - Concentração inicial de EPS

P - Concentração de EPS ao final do cultivo

P_X - Produtividade em biomassa

t_c - Tempo de cultivo

$V_i:V_R$ - Relação volume inicial de meio:volume de reator

$X_{máx}$ - Concentração máxima de biomassa

X - Concentração de biomassa ao final do cultivo

X_0 - Concentração inicial de biomassa

YMA - Yeast Manitol Ágar

$Y_{P/X}$ – Fator de conversão de biomassa em produto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS.....	19
3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS).....	20
3.3 FATORES ENVOLVIDOS NO CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE EPS	24
3.3.1 Considerações Iniciais.....	24
3.3.2 Componentes do Meio.....	27
3.3.3 Condições de Cultivo.....	29
3.4 PERMEADO DE SORO DE QUEIJO.....	31
3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN (PB).....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 MATERIAL	37
4.1.1 Micro-organismo	37
4.1.2 Fonte de Carbono.....	37
4.2 MANUTENÇÃO E REATIVAÇÃO DA CULTURA.....	37
4.3 PREPARO DO INÓCULO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	37
4.4 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS.....	38
4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN (PB).....	38
4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	41
4.6.1 Determinação do pH	41
4.6.2 Determinação da Concentração de Biomassa.....	41
4.6.3 Recuperação e Quantificação do EPS	41
4.7 PARÂMETROS CINÉTICOS	41
4.7.1 Produtividade	41
4.7.2 Fator de Conversão	42
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS NA PRODUÇÃO DE EPS	43
5.1.1 Cinética dos Ensaio do Planejamento PB.....	45
5.1.2 Análise de Efeitos Principais	47

5.2 CULTIVOS PROPOSTOS A PARTIR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN.....	58
6 CONCLUSÃO.....	64
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE	75

1 INTRODUÇÃO

Muitos micro-organismos são capazes de sintetizar polissacarídeos em resposta a condições ambientais extremas ou a um estresse, sendo a produção favorecida pela presença em excesso de uma fonte de carbono como substrato (CASTELLANE et al., 2017; FREITAS et al., 2010). Esses polissacarídeos, também conhecidos como biopolímeros, podem ser classificados de acordo com sua localização celular em intracelulares ou extracelulares (HUSSAIN et al., 2017; NWODO; GREEN; OKOH, 2012; PAULO et al., 2011).

Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos extracelulares produzidos por bactérias, bolores e leveduras durante o crescimento microbiano e encontram-se ligados à superfície das células ou são secretados para o meio, formando cápsulas ou limo (MOSCOVICI, 2015; KUMAR; MODY; JHA, 2007; SEESURIYACHAN et al., 2012; SILVA et al., 2006). São polímeros que possuem diferentes propriedades químicas, físicas e estruturais e em meio aquoso são capazes de formar géis e soluções viscosas, sendo considerados como gomas hidrossolúveis (BOMFETI et al., 2011; SILVA et al., 2006).

Em virtude da capacidade de sintetizar EPS com diferentes propriedades, o interesse industrial em diversos setores tem aumentado nos últimos anos. Além de apresentarem características similares às gomas produzidas por fontes de origem vegetal, possuem vantagens como obtenção mais rápida, produção independente de fatores climáticos, reprodutibilidade de suas propriedades físico-químicas e possibilidade do uso de diferentes matérias-primas (OLIVEIRA, 2017; KUMAR; MODY; JHA, 2007). O estabelecimento das condições de cultivo, a sua estrutura química e a determinação de suas propriedades físico-químicas, como seu comportamento reológico, são características essenciais para auxiliar a definir possíveis aplicações como espessantes, gelificantes, agentes de suspensão, coloides protetores e estabilizantes nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas e, também, petrolífera, neste caso na tecnologia de perfuração de poços de petróleo (BARRETO et al., 2011; RIBEIRO, 2015; RIBEIRO; BURKERT, 2016).

Dentre os diversos micro-organismos capazes de sintetizar e secretar polissacarídeos, uma classe de bactérias conhecidas como diazotróficas vem sendo estudada por produzirem quantidades expressivas de EPS. As bactérias diazotróficas são responsáveis pela fixação biológica de nitrogênio, sendo capazes de converter o nitrogênio molecular atmosférico (N_2) em íon amônio (NH_4^+) ou aminoácidos através de um processo de oxirredução. Essas bactérias pertencem à família Rhizobiaceae e são constituídas pelos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*,

Mesorhizobium, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (BOMFETI et al., 2011; JANCZAREK et al., 2015; MONTEIRO et al., 2012).

Conforme a literatura, a maioria dos estudos relacionados aos processos de produção de EPS rizobianos utilizam como substrato carboidratos como manitol (CASTELLANE et al., 2017; STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012; SAYYED; JAMADAR; PATEL, 2011), glicose (CASTELLANE; LEMOS, 2007; RAZIKA et al., 2012; STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012) e sacarose (BARRETO et al., 2011; CASTELLANE; LEMOS, 2007; STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012). Porém, o custo destes substratos é elevado, impactando diretamente no custo de produção e, conseqüentemente, limitando o potencial de mercado destes biopolímeros. Dessa forma, o emprego de matérias-primas de baixo custo, como subprodutos ou resíduos agroindustriais, tem sido investigado como alternativa para reduzir os custos de produção e ainda minimizar problemas ambientais. Para o caso das bactérias diazotróficas, são citados estudos que empregam como substrato o glicerol residual (OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2018; RIBEIRO, 2015), hidrolisado de farelo de arroz (DEVI; VIJAYENDRA; SHAMALA, 2012), soro de queijo (ZHOU et al., 2014), água residuária da indústria de pescados (SELLAMI et al., 2015), melão de soja (OLIVEIRA, MICHELON, BURKERT, 2020) e permeado de soro de queijo (TRINDADE, 2018; GONZÁLEZ, 2019).

O permeado de soro de queijo é um subproduto da indústria de laticínios, resultante do processo de ultrafiltração do soro que separa as proteínas visando obter um concentrado proteico. Nesse processo, as proteínas do soro ficam retidas e pequenas moléculas como lactose, sais e vitaminas atravessam a membrana gerando um resíduo líquido, denominado permeado de soro de queijo. Esse subproduto é rico em nutrientes como cálcio, fósforo, potássio, sódio e principalmente carboidratos, majoritariamente lactose. Os carboidratos, considerados fonte de energia, encontram-se presentes em uma concentração na faixa de 68 a 85 % da composição total do permeado em pó. Além do elevado conteúdo de nutrientes, este possui um custo atrativo, favorecendo a ampliação de suas aplicações. O aproveitamento deste subproduto ainda reduz danos ambientais, pois possuem elevada taxa de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica de oxigênio (DBO) (RUSSO, 2016; TRINDADE, 2018; ZACARCHENCO et al., 2012).

O rendimento e as características físico-químicas de EPS produzidos por um determinado micro-organismo variam de acordo com as condições de cultivo. Portanto, a produção desses polissacarídeos pode ser diretamente influenciada pela fonte de carbono utilizada e sua concentração, temperatura, pH e a linhagem do micro-organismo, entre outros.

Entretanto, são escassas as investigações que abordem este aspecto na produção dos EPS rizobianos, justificando estudos que avaliem como as variáveis de processo afetam a produção.

Para avaliar os efeitos de diversas variáveis na resposta de um estudo e, posteriormente, otimizar os processos, adotam-se planejamentos experimentais os quais facilitam a condução dos experimentos futuros. Dentre os diversos modelos de planejamento experimental, o Plackett-Burman (PB) permite estudar o efeito de um grande número de variáveis independentes em uma resposta com o menor número possível de experimentos, mostrando tendências e conduzindo ao caminho ótimo para se obter melhores rendimentos (ALBUQUERQUE, 2014; PIGHINELLI, 2007). De acordo com Rodrigues e Iemma (2009), essa metodologia é conhecida como *Screening Design*, sendo uma ferramenta de grande utilidade para a avaliação prévia das variáveis de um processo e como etapa da estratégia sequencial para otimização do mesmo.

Neste contexto, complementando e continuando as pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal do Rio Grande, busca-se avaliar como as condições de processo da bactéria *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 afetam a produção de EPS, utilizando permeado de soro de queijo como fonte de carbono.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a produção de EPS pela bactéria diazotrófica *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 utilizando permeado de soro de queijo como fonte de carbono.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos de doze variáveis, por meio de um planejamento Plackett Burman, na obtenção de EPS por *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 em frascos agitados, estudando as concentrações dos componentes do meio de produção (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, extrato de levedura, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e permeado de soro de queijo), bem como pH inicial do meio de produção, relação volume inicial de meio:volume de reator, agitação e temperatura do processo;

- A partir da análise de efeitos, estabelecer as melhores condições de processo para produção de EPS de *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 em meio à base de permeado de soro de queijo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Também chamadas de bactérias fixadoras de nitrogênio, as bactérias diazotróficas são a principal via de incorporação de nitrogênio aos ecossistemas terrestres. Através de um processo de oxirredução elas convertem o nitrogênio molecular atmosférico (N_2) em formas mais reduzidas como íons amônio (NH_4^+), forma biologicamente assimilável pelos organismos, sendo este processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BOMFETI et al, 2011; MARCHIORO, 2005; SERRATO, 2008). A FBN é realizada por uma enzima que se encontra presente nas bactérias, denominada nitrogenase, em vida livre ou na rizosfera de plantas, estabelecendo relações simbióticas e associativas (DINIZ et al., 2012; SANTOS, 2010).

As bactérias que normalmente estabelecem uma relação de simbiose com plantas, especialmente com leguminosas, pertencem à família Rhizobiaceae, que é constituída pelos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium*, os quais são coletivamente chamados de Rizóbios (MARCHIORO, 2005; MONTEIRO et al., 2012). A simbiose consiste em uma relação íntima entre esses micro-organismos e a planta hospedeira, formando estruturas especiais nas raízes ou caule denominadas nódulos (MARCHIORO, 2005; SANTOS, 2010; SERRATO, 2008). A conversão do N_2 pelas bactérias ocorre dentro dos nódulos, e em resposta a esse processo de fixação as plantas fornecem carboidratos provenientes da fotossíntese como fonte de carbono e energia para essas bactérias (BOMFETI et al., 2011; GOSH; MAITI, 2016).

Durante o crescimento dessas bactérias, estas são capazes de sintetizar quantidades expressivas de polissacarídeos em resposta a condições ambientais extremas ou algum tipo de estresse, sendo esta síntese normalmente favorecida por uma fonte de carbono em excesso concomitantemente com a limitação de outro nutriente (CASTELLANE et al., 2017; FREITAS et al., 2010). As células rizobiais produzem diferentes tipos de polissacarídeos de superfície como glicanas cíclicas (GC) concentradas no espaço periplasmático do rizóbio, lipossacarídeos (LPS) ancorados na membrana externa bacteriana, polissacarídeos capsulares (CPS) que formam uma camada coesa aderida à superfície celular bacteriana e exopolissacarídeos (EPS), que apresentam pouca ou nenhuma associação celular (BOMFETI et al., 2011; GOSH; MAITI, 2016; MONTEIRO, 2011; OLIVEIRA, 2017). Esses biopolímeros consistem em unidades

repetidas contendo principalmente monossacarídeos e seus derivados (D-glicose, D-manose, D-galactose, L-ramnose, ácidos D-glicurônico e D-galacturônico) (GONZÁLEZ, 2019; GOSH; MAITI, 2016). Dentre esses polímeros microbianos, destacam-se os EPS, por apresentarem um processo de extração e purificação mais simples além de possibilitarem maior produtividade (RIBEIRO, 2015).

3.2 EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS)

Os EPS constituem uma classe de polissacarídeos produzidos por micro-organismos como bactérias, microalgas, alguns fungos filamentosos e leveduras. Eles se encontram ligados à superfície da célula na forma de cápsulas ou são secretados para o meio extracelular na forma de muco (MOSCOVICE, 2015; RIBEIRO, 2015; SEESURIYACHAN et al., 2012). Esses biopolímeros são também conhecidos como gomas hidrossolúveis e são constituídos por unidades repetitivas, lineares ou ramificadas, de monossacarídeos e seus derivados, podendo também incluir constituintes não carboidratados (GONZÁLEZ, 2019; PAULO et al., 2012).

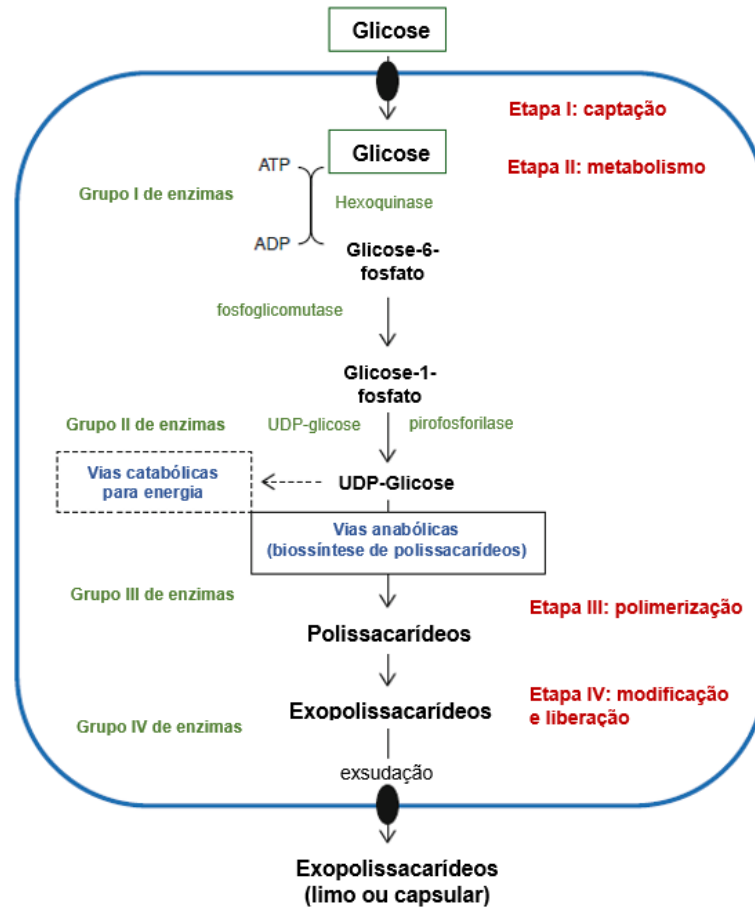
Os monossacarídeos mais comumente encontrados nessas macromoléculas são D-glicose, D-galactose, D-manose, ácido glicurônico, L-fucose e L-ramnose, bem como resíduos orgânicos e inorgânicos que as vezes podem estar presentes, destacando-se acetato, piruvato, succinato, sulfato, fosfato e glicerol (GONZÁLEZ, 2019; SANTOS, 2010; PAULO et al., 2012; PÉREZ-RAMOS et al., 2016). De acordo com sua composição química, os EPS podem ser classificados em dois grupos: homopolissacarídeos (HoPS) e heteropolissacarídeos (HePS). Os HoPS apresentam um único tipo de monômero, normalmente D-glicose ou D-frutose; e os HePS compreendem diferentes tipos de monômeros, variando desde dissacarídeos a octassacarídeos, podendo também conter moléculas sem açúcar (GONZÁLEZ, 2019; SANTOS 2010; PÉREZ-RAMOS et al., 2016).

A produção de EPS pelos micro-organismos está ligada a diversas funções biológicas específicas para os diferentes habitats onde se encontram presentes. A maioria dessas funções está relacionada a uma forma de proteção da célula contra fatores externos. Estão envolvidas funções tais como: atuação como fonte de carbono e energia; acoplamento e neutralização de toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; interação com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas; fagocitose; proteção contra desidratação,

dessecamento, ataques de bacteriófagos e protozoários, estresse biótico e tensões abióticas como temperatura, intensidade luminosa ou pH; e, em alguns casos, ajuda na adaptação a condições extremas (GONZÁLEZ, 2019; MISHRA; JHA, 2013; RIBEIRO, 2015; SEESURIYACHAN et al., 2012; PHILIPPINI, 2017). A literatura ainda menciona que esse material está muitas vezes relacionado à virulência do micro-organismo com o tecido hospedeiro, ou seja, ele favorece a colonização dos mesmos, permitindo a formação de agregados, a adesão e tolerância às superfícies (GONZÁLEZ, 2019; PHILIPPINI, 2017).

Na maioria das vezes os polissacarídeos extracelulares são produzidos quando os micro-organismos não estão em condições favoráveis à sua proliferação, sendo sintetizados intracelularmente durante todo o crescimento microbiano ou durante a fase estacionária, período em que o crescimento celular é muito lento ou constante (MISHRA; JHA, 2013; PAULO et al., 2012; RIBEIRO, 2015). Dessa forma a taxa de produção normalmente depende de efeitos externos como o desequilíbrio de nutrientes, sal, temperatura, pH, aeração, etc (MISHRA; JHA, 2013). São considerados compostos metabólitos secundários e seu processo de síntese demanda complexas rotas bioquímicas que podem ser divididas em 4 etapas com o auxílio de quatro grupos de enzimas como esquematizado na Figura 1, utilizando como exemplo de substrato a glicose (GONZÁLEZ, 2019; MISHRA; JHA, 2013; PAULO et al., 2012).

Figura 1 – Representação esquemática da biossíntese dos exopolissacarídeos.



Adaptado de Mishra e Jha (2013).

Na primeira etapa da síntese ocorre a captação do substrato, o qual é absorvido pela célula bacteriana. Na segunda etapa a fonte de carbono é metabolizada, ocorrendo primeiramente a fosforilação do açúcar, através de duas enzimas denominadas hexoquinase e fosfoglicomutase. Posteriormente, ainda na segunda etapa, o açúcar fosforilado pode ser utilizado como energia (catabolismo) ou para a formação do polissacarídeo (anabolismo). Assim, a enzima UDP-glicose-pirofosforilase converte o açúcar fosforilado em um intermediário que pode ser interconvertido com outros açúcares seguindo para as vias catabólicas ou entrando na terceira etapa da polimerização na qual os polissacarídeos são sintetizados por uma via anabólica através de um grupo de enzimas conhecidas como glicosiltransferases. Nesta terceira etapa, a glicosiltransferase liga unidades de açúcar individuais repetidas a um transportador lipídico formando um glicosídeo. Na última etapa os polissacarídeos podem ser modificados por diferentes atividades enzimáticas como acilação, acetilação, sulfatação e metilação e, então, são transportados para a superfície celular e

exsudados da célula com a ajuda de enzimas hidrofóbicas na forma de cápsulas ou limo (MISHRA; JHA, 2013; SUTHERLAND, 2001).

Como os polissacarídeos microbianos resultantes apresentam uma ampla variedade de combinações estruturais, eles dão origem a diferentes propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, apresentam diferentes possibilidades de aplicação (GONZÁLEZ, 2019; SANTOS, 2010). Suas propriedades são diretamente influenciadas por fatores importantes como sua composição química, conformação, agrupamentos, posição das ligações moleculares, massa molar, entre outros (RIBEIRO, 2015; SILVA et al., 2006). Essas diferenças estruturais são dependentes das espécies de micro-organismos sintetizadoras, da rota bioquímica envolvida e da fonte de carboidrato aproveitada (GONZÁLEZ, 2019; PHILIPPINI, 2017). Grande parte desses biopolímeros é multifuncional, exibindo uma combinação de propriedades específicas de considerável interesse biotecnológico que são essenciais para a definição de suas aplicações finais (GONZÁLEZ, 2019; RIBEIRO, 2015; PAULO et al., 2012).

Devido à variedade de propriedades físico-químicas dependentes das características químicas, físicas e estruturais de cada EPS, suas aplicações englobam diversos setores industriais. Dessa forma, a caracterização dos polímeros é necessária para direcionar sua utilização na indústria (MOSCOVICI, 2015; SILVA et al., 2006). Podem ser utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, de tintas, produtos agrícolas e para o desenvolvimento de melhorias para a saúde humana e a saúde animal (SANTOS, 2010; SILVA et al., 2006; PHILIPPINI, 2017). As características mais relevantes, comuns nesse produto, são a sua alta viscosidade em meio aquoso e seu comportamento pseudoplástico, sendo um material capaz de alterar a reologia de soluções e até mesmo formar géis em alguns casos, mesmo em baixas concentrações (GONZÁLEZ, 2019; RIBEIRO, 2015; SILVA et al., 2006). Por apresentarem essas características, no geral, os EPS são utilizados como espessantes, estabilizantes, viscosificantes, emulsificantes, gelificantes, entre outros (MISHRA; JHA, 2013; PÉREZ-RAMOS et al., 2016; RIBEIRO, 2015).

Os polissacarídeos de origem microbiana apresentam propriedades similares ou superiores aos polissacarídeos tradicionais originados de vegetais e algas marinhas existentes no mercado. Além disso, esse material é tecnologicamente funcional e sua produção tem se destacado nos últimos anos, pois apresentam muitas vantagens quando comparados aos polímeros usuais (GONZÁLEZ, 2019; MOSCOVICI, 2015; PAULO et al., 2012). Dentre as vantagens encontram-se: a possibilidade de uma produção controlada com parâmetros definidos

e reprodutíveis, estando menos susceptível à variabilidade em suas propriedades físico-químicas e mantendo o padrão de qualidade; não existe influência de alterações climáticas externas, contaminação marinha nas algas ou problemas de colheita dos vegetais; tempos mais curtos de obtenção; rendimentos elevados; maior pureza e consistência na composição; compatibilidade com uma variedade de sais em ampla faixa de pH e temperatura; estabilidade em elevadas concentrações iônicas; alta solubilidade em água; e também possui ação sinérgica com outros polissacarídeos (MOSCOVICI, 2015; RIBEIRO, 2015; SANTOS, 2010; SILVA et al., 2006; PAULO et al., 2012).

Neste contexto, os polímeros microbianos têm se destacado como compostos de grande importância no desenvolvimento de novos produtos, considerando que são obtidos de recursos naturais com fácil disponibilidade, possuem grande versatilidade de aplicações e ainda levam vantagens em relação aos polímeros derivados de plantas e algas (GONZÁLEZ, 2019; MOSCOVICI, 2015; PHILIPPINI, 2017).

3.3 FATORES ENVOLVIDOS NO CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE EPS

3.3.1 Considerações Iniciais

O processo de produção de EPS por micro-organismos envolve diversos fatores, não existindo condições gerais de cultivo ideais e adequadas para todas as espécies microbianas que implicam em altas taxas de produtividade e rendimento do polímero (FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Assim, algumas pesquisas relacionadas à síntese de EPS microbianos e seus possíveis usos industriais são focadas em otimizar o processo de acordo com cada espécie a ser estudada, tentando assim obter maiores quantidades de produto e as melhores características funcionais possíveis (GONZÁLEZ, 2019; PHILIPPINI, 2017).

Em concordância com as possibilidades genéticas do micro-organismo a ser estudado, os principais fatores que podem ser destacados por apresentarem grande influência no processo de produção incluem a composição do meio de cultivo, como por exemplo as fontes de carbono, nitrogênio, micronutrientes como sais minerais, aditivos e vitaminas; e parâmetros como temperatura, pH, volume, aeração, agitação e tempo de incubação (GONZÁLEZ, 2019; GRANDI, 2010; LIU et al., 2016; PHILIPPINI, 2017).

A maior uniformidade das propriedades físico-químicas dos EPS é consequência da especificidade do micro-organismo utilizado e do controle dos fatores envolvidos no cultivo. Dessa forma, as condições nutricionais e ambientais impactam diretamente na síntese, no rendimento, na composição e nas características do polímero como: massa molar, grupamentos associados, grau de ramificação, propriedade reológicas, entre outras. Sendo assim, o estudo e a manipulação dessas condições poderiam acarretar aumentos significativos na produção dos biopolímeros (BARRETO et al., 2011; GONZÁLEZ, 2019; GRANDI, 2010; RIBEIRO, 2015). A importância em otimizar esses bioprocessos que ainda estão em desenvolvimento é sustentada pelas significativas propriedades funcionais dos EPS que não são encontradas em outros polímeros (FREITAS; TORRES; REIS, 2017).

Dessa forma, a Tabela 1 apresenta alguns estudos relacionados à produção desses EPS, na qual é possível perceber a aplicação de diferentes micro-organismos, fontes de carbono e condições dos cultivos microbianos.

Tabela 1 – Micro-organismos e condições de cultivo na produção de EPSs rizobianos.

Micro-organismo	Fonte de carbono	Concentração da fonte de carbono	pH	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Concentração de EPS (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)	Referência
Rizóbios isolados de nódulos de <i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	Manitol	-	-	28	150	0,14	0,05	FERNANDES JÚNIOR (2010)
<i>Mesorhizobium</i> sp. SEMIA 816	Glicerol residual	12,2 g L ⁻¹	7	30	200	4,91	-	OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT (2018)
<i>Rhizobium radiobacter</i> S10	Soro de leite	10% (m/m)		30	200	2,83	-	ZHOU et al. (2014)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5	Manitol	20 g L ⁻¹	-	30	200	0,34	-	SERRATO et al. (2013)
<i>Rhizobium haultense</i> SEMIA 6450	Melaço de soja	10 g L ⁻¹	7	30	200	4,47	1,68	OLIVEIRA; MICHELON; BURKERT (2020)
<i>Rhizobium tropici</i> MUTZC3	Sacarose e óleo diesel	3% sacarose, 0,1% óleo diesel (v/v)	6,9	30	150	5,52	0,87	CASTELLANE et al. (2017)
<i>Sinorhizobium meliloti</i> MTCC 100	Sacarose e farelo de arroz hidrolisado	40% farelo de arroz (v/v)	7	30	200	2,67	5,40	DEVI; VIJAYENDRA; SHAMALA (2012)
<i>Mesorhizobium huakuii</i> SEMIA 6454	Permeado de soro de queijo	10 g L ⁻¹	7	30	200	6,15	1,35	GONZÁLEZ (2019)

3.3.2 Componentes do Meio

A composição do meio de cultivo para os micro-organismos é de extrema importância para se alcançar a máxima produção de EPS. Diversos meios de cultivo estão descritos na literatura, mas no geral a composição qualitativa é muito semelhante e cada suplemento possui uma função específica na produção dos polissacarídeos (BARRETO et al., 2011; PHILIPPINI, 2017). Basicamente, esses meios possuem: uma fonte de carbono utilizada para a produção dos polissacarídeos e também atuando como reserva energética; fontes de sais minerais e de nitrogênio em concentrações adequadas para o crescimento do micro-organismo; oligoelementos que apresentam papel importante como cofatores enzimáticos nas vias de produção, entre outros componentes (BARRETO et al., 2011; GRANDI, 2010; LIU et al., 2016; RIBEIRO, 2015).

Em geral, a fonte de carbono é a fonte de nutrientes e energia mais importante para o crescimento microbiano, sendo determinante no cultivo. Estudos como o de Kumar, Mody e Jha (2007) e Kim et al. (2005) afirmam que diferentes fontes de carbono podem apresentar diferentes efeitos de repressão catabólica no metabolismo secundário celular e, conseqüentemente, no tamanho, rendimento de produção e composição de açúcares do EPS, porém dependendo também da espécie de micro-organismo estudado. As concentrações de carbono utilizadas na elaboração dos meios de cultura encontram-se na faixa entre 1,5 a 12% m/v, sendo que a maioria dos estudos utiliza concentrações entre 3 e 6% m/v. Na literatura, as fontes de carbono normalmente utilizadas para a produção de EPS microbianos são: glicose, sacarose e manitol (GONZÁLEZ, 2019; LIU et al., 2016; PHILIPPINI, 2017).

Além desses açúcares comuns, existe uma busca intensa por substratos que reduzam os custos de produção, considerando que os custos com o meio de cultivo equivalem a 30% do custo total dos cultivos microbianos. Dessa forma, está crescendo uma tendência de se investigar a produção desses produtos de interesse comercial utilizando como substratos resíduos e subprodutos provenientes da agricultura e de algumas indústrias como a alimentícia. Assim, além do aspecto econômico, tem-se o aspecto ecológico, evitando o acúmulo de resíduos no meio ambiente (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; RIBEIRO, 2015).

Nos estudos relacionados à produção de EPS bacterianos, vários resíduos e subprodutos têm se destacado. Oliveira (2017), utilizando a bactéria diazotrófica *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816, e Ribeiro (2015), com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e

Bradyrhizobium, estudaram a produção de EPS utilizando meios à base de glicerol residual. Zhou et al. (2014) produziram EPS com *Rhizobium radiobacter* S10 e soro de queijo. Devi, Vijayendra e Shamala (2012) exploraram o farelo de arroz no crescimento de *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100 para a produção de polímeros intra e extracelulares. Trindade (2018), com *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816, e González (2019), com diferentes bactérias da família Rhizobiaceae, utilizaram permeado de soro de queijo como fonte de carbono para produzir EPS.

A fonte de nitrogênio utilizada nos meios de cultura também influencia diretamente na produção de EPS. Essa fonte apoia o crescimento celular, servindo para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos, também afetando a regulação da produção de enzimas. Podem ser de origem orgânica como L-asparagina, glutamato, peptona, ureia e o extrato de levedura, que é a fonte de nitrogênio mais usual nos cultivos microbianos; ou podem ser também de origem inorgânica como o nitrato de amônio, nitrato de potássio, nitrato de sódio, sulfato de amônio e fosfato de amônio. Estudos ainda observam que, comparando fontes de nitrogênio orgânico com fontes inorgânicas, a produção de EPS geralmente resulta em quantidades relativamente maiores para as fontes orgânicas (BARBOSA et al., 2004; KUMAR; MODY; JHA, 2007; LIU et al., 2016; PHILIPPINI, 2017). Em relação à disponibilidade de nitrogênio nos meios de cultura, estudos indicam que concentrações mais limitadas tendem a estimular a produção de EPS, enquanto que altas concentrações inibem sua produção e favorecem o crescimento celular (BARBOSA et al., 2004; FREITAS; TORRES; REIS, 2017; GONZÁLEZ, 2019; PHILIPPINI, 2017).

A relação entre a fonte de nitrogênio e a de carbono, chamada de razão C/N, é também um parâmetro importante no processo de síntese desses biopolímeros. A disponibilidade de carbono concomitante com a limitação de nitrogênio geralmente estimula a produção de EPS pelo micro-organismo. Isso se explica pelo fato de que, na maioria das vezes, ao apresentar uma limitação de um nutriente essencial que não seja o carbono ou outra fonte de energia, a quantidade extra de carbono será utilizada pelo micro-organismo para a produção de polissacarídeos. A presença de nitrogênio extra no meio de cultura favorece o crescimento celular e a grande quantidade de biomassa não leva necessariamente a uma produção ideal desses biopolímeros, resultando assim em baixa produção (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; GONZÁLEZ, 2019; RIBEIRO, 2015).

Além do carbono e nitrogênio, a suplementação do meio de cultura com elementos em pequenas quantidades como fósforo, potássio e cátions metálicos, é eficaz para estimular o crescimento microbiano e a produção de EPS. Esses micronutrientes participam ativamente na

composição de enzimas, nucleotídeos, proteínas e vitaminas. O fósforo tem participação relevante no metabolismo secundário e também regula a captação de lipídios e carboidratos pelas células. Íons metálicos como Ca^{2+} e Mg^{2+} podem acelerar a excreção de EPS aumentando a permeabilidade da membrana celular, participando também do processo de biossíntese dos polissacarídeos atuando como cofatores para enzimas necessárias no metabolismo de carboidratos e em processos de transporte. Dentre os principais sais minerais utilizados na suplementação microbiana para a produção de EPS destacam-se fosfatos de potássio monobásico e dibásico (KH_2PO_4 e K_2HPO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de cálcio (CaCl_2) (BARBOSA et al., 2004; FREITAS; TORRES; REIS, 2017; GONZÁLEZ, 2019; LIU et al., 2016; PHILIPPINI, 2017).

3.3.3 Condições de Cultivo

Os micro-organismos são influenciados também por mudanças no meio ambiente que inibem ou estimulam a atividade enzimática, induzem ou reprimem a síntese de proteínas, afetam a morfologia celular, entre outros aspectos dos micro-organismos. Dessa forma, para que se garanta um desempenho reprodutível e estável do bioprocesso, é necessário monitorar e controlar algumas condições de cultivo como a temperatura, o pH do meio, a aeração, a velocidade de agitação e o tempo de incubação (GONZÁLEZ, 2019; LIU et al., 2016; FREITAS; TORRES; REIS, 2017).

Para a sobrevivência dos micro-organismos e produção de polissacarídeos, um dos fatores limitantes é a temperatura. Esse parâmetro apresenta alta significância na disseminação desses seres, pois pode ser responsável por alterações em seu crescimento vegetativo, patogenicidade, reprodução e aspectos fisiológicos (PHILIPPINI, 2017; RIBEIRO, 2015). Na questão de produção do polímero, a temperatura interfere na atividade dos complexos enzimáticos presentes, gerando a indução ou inibição da biossíntese (GONZÁLEZ, 2019; LIU et al., 2016). De acordo com Liu et al. (2016), a temperatura de incubação ideal para bactérias varia de 24 a 30°C, dependendo da espécie a ser estudada, e normalmente cultiva-se rizóbios em temperaturas na faixa dos 30 °C.

O pH do meio de cultura é outro fator que pode afetar a membrana celular, a morfologia e a estrutura celular, a absorção de nutrientes e a biossíntese de EPS (GONZÁLEZ, 2019; KIM

et al., 2005). Estudos relatam que a produção de EPSs bacterianos na maioria dos casos é favorecida em meios com pH neutro ou ligeiramente ácido (LIU et al., 2016; RIBEIRO, 2015; PHILIPPINI, 2017).

A mistura e aeração do meio também são bem relevantes, pois determinam a disponibilidade de nutrientes e oxigênio. Nos cultivos em frascos, a aeração é influenciada por diversos fatores, dentre eles estão a área de superfície e a profundidade do meio, bem como a velocidade de agitação (LIU et al., 2016; FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Na maior parte dos casos, a produção de EPS por micro-organismos ocorre em condições aeróbicas. Segundo Freitas, Torres e Reis (2017), a aeração vigorosa leva à alta produção de EPS por alguns micro-organismos, enquanto para outros a produção é favorecida por baixos níveis de oxigênio dissolvido. Assim, é necessário levar em conta as dimensões dos frascos, o volume do meio de cultivo e a velocidade com que os frascos serão agitados (GONZÁLEZ, 2019; LIU et al., 2016).

Em relação à agitação do cultivo, que é a mistura constante dos componentes do meio, altas velocidades podem acarretar em danos às células e alterar algumas propriedades físico-químicas dos polímeros sintetizados. Em contrapartida, uma agitação fraca pode prejudicar a mistura adequada e, por consequência, comprometer a transferência de nutrientes e oxigênio através da cultura. Sendo assim, alcançar um equilíbrio da velocidade de agitação é fundamental para assegurar a mistura adequada e não prejudicar a produção dos biopolímeros (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; GONZÁLEZ, 2019; LIU et al., 2016).

O tempo de incubação também é muito importante na produção de EPS e varia de acordo com o tipo de micro-organismo. De acordo com a literatura, o tempo favorável para a produção por bactérias é de 60 a 72 h, mas existem alguns estudos nos quais esse tempo varia, podendo chegar até 144 h. Nota-se que essa produção geralmente está relacionada com o crescimento do micro-organismo, estando associada ao metabolismo secundário. Assim, a produção atinge níveis máximos quando o crescimento microbiano se encontra no último estágio da fase exponencial e no estágio inicial da fase estacionária. Posteriormente a produção diminui, pois o micro-organismo entra em sua fase de morte (GONZÁLEZ, 2019; LIU et al., 2016; PHILIPPINI, 2017).

3.4 PERMEADO DE SORO DE QUEIJO

O permeado de soro de queijo é um resíduo da indústria de laticínios obtido após a remoção de proteínas e outros sólidos lácteos do soro doce produzido durante a fabricação de queijo. O processo que visa a separação dos componentes do soro de queijo para concentrar as proteínas é a ultrafiltração (ALMEIDA et al., 2015; GONZÁLEZ, 2019). Nesse processo, o fluido passa sob pressão por uma membrana semipermeável resultando de um lado o concentrado, ou isolado proteico, que apresenta maior massa molar, ficando retido na membrana, e do outro lado uma grande quantidade de resíduo rico em nutrientes de menor massa molar que passa pela membrana denominado permeado de soro de queijo (ASSUNÇÃO, 2014; RUSSO, 2016; STOLIAR, 2009).

Este subproduto agroindustrial é constituído basicamente de água, lactose, sais minerais, algumas vitaminas, proteínas remanescentes, uma pequena quantidade de gordura, além de concentrações de macro e micro elementos (EL-KHAIR, 2009; RUSSO, 2016). Após ser submetido a um processo de desidratação para obtenção do permeado de soro de queijo em pó, este apresenta uma composição com teor de lactose na faixa de 68 a 85%, proteínas em torno de 3 a 8%, um conteúdo de gordura menor que 2% e sais minerais entre 8 a 20% de sua composição (ASSUNÇÃO, 2014; STOLIAR, 2009; TRIGUEROS et al., 2016). Dentre os minerais presentes, o subproduto é rico em nutrientes importantes como o cálcio, fósforo, potássio e sódio (RUSSO, 2016; STOLIAR, 2009; ZACARCHENCO, 2012).

Devido ao fato de apresentar alto valor nutricional, o permeado de soro de queijo apresenta potencial de aplicação na indústria, na formulação de diversos produtos lácteos e não lácteos (GONZÁLEZ, 2019; ZACARCHENCO, 2012). Pode, assim, ser utilizado para diversos fins como a produção de lactose, galactose, produtos de panificação, alimentação de animais, entre outros (RUSSO, 2016; SANDRI et al., 2014; TRINDADE, 2018). Outra alternativa promissora, devido à sua alta concentração de lactose, é sua utilização como fonte de carbono na obtenção de vários bioprodutos de maior valor agregado em processos biotecnológicos (ASSUNÇÃO, 2014, TRIGUEROS et al., 2016). Na literatura existe alguns estudos que utilizaram o permeado de soro de queijo como fonte de carbono, por exemplo na produção de etanol por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3 (SILVEIRA, 2004), produção de ácido láctico com *Lactobacillus helveticus* imobilizado (SCHEPERS; THIBAUT; LACROIX, 2006), produção de hidrogênio (FERNÁNDES et al., 2014), produção de butanol (QURESHI; FRIEDL;

MADDOX, 2014), cultivo de biomassa de leveduras (ASSUNÇÃO, 2014) e produção de EPS por *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M (MACEDO et al., 2002).

Outro fator muito importante que aumenta o interesse de se utilizar esse subproduto da indústria láctea, além de se ter um custo bastante aceitável de R\$ 2,20/kg, é que em razão do seu alto conteúdo de nutrientes possui elevada taxa de demanda química de oxigênio (DQO) e demanda biológica de oxigênio (DBO) (ASSUNÇÃO, 2014; RUSSO, 2016; ZEMPULSKI, 2013). Dessa forma, seu descarte inadequado pode causar sérios danos ambientais, portanto, deve receber um tratamento adequado e eficaz, que implica em custos adicionais (EL-KHAIR, 2009; GUIMARÃES; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2010; ZEMPULSKI, 2013).

Assim, além do permeado de soro de queijo ser uma fonte de importantes nutrientes com um custo atrativo, o seu aproveitamento possibilita: agregar ainda mais valor aos subprodutos da cadeia produtiva do leite, evitar o aumento de custos nas estações de tratamento de efluentes e ainda minimizar impactos ambientais (RUSSO, 2016; TRINDADE, 2018; ZACARCHENCO, 2012).

3.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN (PB)

Uma maneira de se alcançar melhores rendimentos como resposta de um estudo é realizar a otimização do processo definindo faixas de operação adequadas. Isso é possível por meio de um prévio planejamento experimental que irá direcionar a condução dos futuros experimentos. Esse planejamento tornará possível o alcance de uma observação mais detalhada dos fenômenos, identificando tendências para definir o melhor caminho (ALBUQUERQUE, 2014; PIGHINELLI, 2007). Embora a otimização seja uma importante ferramenta muito utilizada em diversos processos industriais e laboratoriais, poucos trabalhos relacionados à síntese de EPS bacterianos utilizam essa ferramenta. Como o processo de produção de EPS envolve diversas variáveis que afetam no seu rendimento, muitas condições podem ser estudadas com o objetivo de chegar em resultados mais satisfatórios.

Em um planejamento experimental realizam-se mudanças propositalmente nas diferentes variáveis de entrada de um processo para que se observe e identifique as mudanças correspondentes na resposta de saída. Geralmente esses planejamentos são empregados de forma que no primeiro momento realiza-se um experimento formado por um sistema complexo

no qual possui muitas variáveis controláveis. Esse experimento caracteriza-se por ser exploratório e projetado para determinar quais são as variáveis mais importantes, ou seja, as variáveis que realmente influenciam o processo. Após esse planejamento experimental exploratório são realizados experimentos subsequentes para refinar as informações obtidas e determinar os ajustes necessários às variáveis a fim de otimizar o processo (ALBUQUERQUE, 2014; MONTGOMERY, 2004).

Em função das vantagens que oferecem, os planejamentos experimentais são ferramentas de grande valor na projeção de pesquisas. Em muitas situações, a relação completa de todas as variáveis que afetam significativamente a resposta não é facilmente perceptível e para que não se corra o risco de excluir fatores que podem vir a ser importantes, o maior número de variáveis deve ser analisado. Porém, no caso de existir muitas variáveis a serem estudadas, um planejamento fatorial completo torna-se muito inviável devido ao elevado número de ensaios. Tal situação deve-se ao fato de que o planejamento experimental é baseado na seleção de níveis para cada variável independente de entrada e na execução de ensaios para todas as combinações possíveis. Então, o número mínimo de ensaios necessários para a realização do planejamento aumenta rapidamente com o número de fatores investigados (ALBUQUERQUE, 2014; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; PIGHINELLI, 2007).

No entanto, a informação desejada muitas vezes pode ser encontrada a partir de um número de ensaios bem menor que o correspondente ao do planejamento fatorial completo. O número de interações de ordem aumenta drasticamente com o número de fatores, mas na maioria dos casos essas interações têm valores de efeitos muito baixos que não apresentam importância prática, ou seja, não são significativos estatisticamente. Além de muitas interações não serem significativas, algumas variáveis também podem não apresentar efeitos que afetem na resposta, os chamados efeitos principais. Então, como uma alternativa para resolver o problema do grande número de ensaios, é possível realizar planejamentos fracionários nos quais utilizam apenas uma fração do número de ensaios do planejamento completo (ALBUQUERQUE, 2014; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Empregando planejamentos fracionários como o planejamento Plackett-Burman (PB), é possível testar o maior número de efeitos das respectivas variáveis com o menor número possível de experimentos. A metodologia proposta por Plackett e Burman é uma ferramenta que com um pequeno número de ensaios permite determinar a influência de vários fatores. Ela evita o uso de um extenso esquema fatorial que, apesar de fornecer informação mais completa,

envolve uma complexidade inviável de tempo e custo. Esse tipo de planejamento é conhecido como um experimento de filtragem ou *Screening Design* e permite a escolha das variáveis significativas na resposta que se pretende estudar. Seu método utiliza dois níveis em todas as variáveis e ajuda a definir a região onde se encontra o ótimo experimental (ALBUQUERQUE, 2014; RODRIGUES; IEMMA, 2009; TERRAZAS, 2012).

Os planejamentos PB fazem parte da classe de planejamentos fatoriais fracionados no qual estão disponíveis matrizes em que o número de ensaios n corresponde a múltiplos de 4 fatores ($n = 12, 16, 20, 24, 36, \dots$ ensaios). Esses delineamentos foram sugeridos pelos cientistas Robin Plackett e Peter Burman e caracterizam-se por todas as colunas de suas matrizes serem mutuamente ortogonais. Cada coluna possui a mesma quantidade de sinais positivos (nível +1) e negativos (nível -1) e cada par de colunas possui todas as combinações possíveis entre os níveis. A ortogonalidade das colunas confere uma simetria que possibilita que os efeitos principais de cada variável sejam analisados individualmente, ou seja, estimativas independentes que apresentam covariância nula e variância mínima. Admite-se que os efeitos de interações sejam desprezíveis e, conseqüentemente, o cálculo dessas interações é dispensado sem comprometer a qualidade dos resultados (ALBUQUERQUE, 2014; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; TERRAZAS, 2012).

Quanto ao uso prático do planejamento PB, Rodrigues e Iemma (2009) enfatizam duas importantes recomendações nas quais seu não cumprimento pode comprometer as informações obtidas. A primeira é que se deve escolher um delineamento com um número mínimo de quatro ensaios a mais que o número de variáveis a serem estudadas no processo. Dessa maneira, os graus de liberdade restantes podem ser utilizados na estimativa dos valores calculados para os efeitos principais. A segunda recomendação é que independentemente do delineamento escolhido, é imprescindível realizar pelo menos três ensaios na condição do ponto central (nível 0). Como os ensaios não se repetem, é importante a repetição nos pontos centrais para se ter graus de liberdade no cálculo do erro padrão e, assim, para a estimativa do erro puro, o qual torna possível avaliar a reprodutibilidade do processo. Outra questão importante, para que as conclusões sejam confiáveis, é que a realização de ensaios nos pontos centrais permite verificar a existência ou não de uma região de curvatura quando as respostas nos níveis +1 e -1 forem aproximadamente iguais (RODRIGUES; IEMMA, 2009; TERRAZAS, 2012).

Joshi, Patel e Gupte (2013) utilizaram o delineamento Plackett-Burman, juntamente com outros métodos, em um estudo que tinha como objetivo otimizar os parâmetros de processo

para a produção de EPS de *Schizophyllum commune* AGMJ-1. A partir de um planejamento PB de 12 ensaios com dois níveis de concentração para cada variável, os autores analisaram um total de seis variáveis, incluindo xilose, extrato de levedura, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KH_2PO_4 , KCl e tamanho do inóculo, nas respostas produção de EPS e crescimento de biomassa. Com esse planejamento verificaram que a xilose, o extrato de levedura e KCl foram variáveis estatisticamente significativas para a produção. A xilose e o extrato de levedura demonstraram influência positiva tanto na produção de EPS como no crescimento de biomassa, já o KCl apresentou influência negativa para a produção de EPS.

Liu et al. (2003) aplicaram o planejamento de PB de 12 ensaios com sete variáveis na otimização da biossíntese da nisina por *Lactococcus lactis* em meio à base de soro de queijo. Nesse estudo, as variáveis escolhidas foram extrato de levedura, polipeptona, KH_2PO_4 , $MgSO_4$, surfactante (*tween* 80), pH e temperatura. Foram adotados dois níveis (-1 e +1) para cada variável e como resposta do planejamento utilizaram a concentração de nisina após 12 h de cultivo. Após a análise estatística, verificaram que os componentes extrato de levedura, KH_2PO_4 e $MgSO_4$ demonstraram efeitos positivos significativos no processo. A seguir, os três fatores significativos foram otimizados com um delineamento composto central.

O meio de cultivo de *Tuber melanosporum* foi otimizado por Liu e Tang (2010) por um método usando o planejamento PB de oito ensaios associado a um delineamento composto pequeno Draper-Lin e a uma função por conveniência. O planejamento PB com seis variáveis (sacarose, extrato de levedura, peptona, Mg^{2+} , K^+ e vitamina B₁) foi utilizado para identificar os componentes chaves do meio de cultivo para o crescimento celular e a produção de polissacarídeos intra e extracelulares. Assim, identificaram como componentes essenciais do meio a sacarose, o extrato de levedura, a peptona e o Mg^{2+} . Posteriormente, aplicando as outras duas metodologias, avaliaram as relações entre as respostas e os principais componentes identificados, otimizaram as respostas simultaneamente e estabeleceram a concentração ideal. Sob as condições ideais identificadas, a biomassa máxima, a produção de polissacarídeos extracelulares e intracelulares, comparada com o meio básico, aumentou em 54,4%, 71,7% e 124,2%, respectivamente.

A produção de glicana por *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146 em frascos foi maximizada por Majumder, Singh e Goyal (2009) empregando uma estratégia de otimização sequencial baseada em delineamentos experimentais estatísticos. Primeiramente, foi realizado um planejamento PB de dois níveis com 12 ensaios para estudar a influência de 11 variáveis na

produção. As variáveis estudadas foram sacarose, peptona, extrato de levedura, extrato de carne, K_2HPO_4 , *tween* 80, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, $CaCl_2$ e $NaCl$. Dentre essas variáveis, determinaram que as mais significativas positivamente para melhorar esse processo foram a sacarose, a peptona e o extrato de levedura, enquanto o $CaCl_2$ influenciou negativamente, sendo descartado nos experimentos posteriores. Então, empregaram um delineamento fatorial de Box-Behnken em três níveis para maximizar a produção e desenvolveram um modelo matemático para mostrar os efeitos de cada componente do meio e suas interações combinatórias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Micro-organismo

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a bactéria *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 como micro-organismo produtor de EPS, proveniente da Coleção SEMIA de Rizóbios do Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação (SEAPI) do Estado do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil).

4.1.2 Fonte de Carbono

Foi utilizado permeado de soro de queijo (PS) em pó como fonte de carbono, fornecido pela empresa Arla Food Ingredients (Dinamarca), contendo cerca de 85% (m/v) de lactose.

4.2 MANUTENÇÃO E REATIVACÃO DA CULTURA

A cepa bacteriana foi mantida refrigerada a aproximadamente 8 °C e a cultura foi reativada com repiques sucessivos em tubos de ensaio inclinados com meio YMA (*Yeast Manitol Agar*), também conhecido como meio ELMA (Extrato de Levedura, Manitol, Ágar), com a seguinte composição, em g L⁻¹: 10 de manitol; 0,1 de K₂HPO₄; 0,4 de KH₂PO₄; 0,2 de MgSO₄.7H₂O; 0,1 de NaCl; 0,4 de extrato de levedura (EL); e 15 de ágar. Após o repique, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica (Quimis QE316M2, Brasil) a 30 °C por 48 h (DUTA et al., 2004).

4.3 PREPARO DO INÓCULO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para o preparo de cada inóculo foi utilizado um tubo contendo a cultura microbiana reativada, a qual foi raspada com 10 mL de água peptonada 0,1% (m/v) e o conteúdo foi transferido para um frasco *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 90 mL do meio YMA sem adição de ágar, com a seguinte composição, em g L⁻¹: 10 de manitol; 0,1 de K₂HPO₄; 0,4 de KH₂PO₄; 0,2 de MgSO₄.7H₂O; 0,1 de NaCl; e 0,4 de EL. O pH do meio foi ajustado para 7 e o inóculo

foi mantido em incubadora rotatória (Tecnal TE-420, Brasil) a 30 °C e 200 rpm. O crescimento celular foi acompanhado medindo-se a densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 600 nm até atingir 0,8 (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012).

4.4 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL, com volume de meio definido de acordo com o planejamento Plackett-Burmann (PB). Os meios utilizados foram definidos tomando como base o meio proposto por Trindade (2018), contendo concentrações também definidas de acordo com o planejamento PB, sendo os componentes utilizados: K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, EL, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e PS. O pH foi ajustado inicialmente na condição determinada pelo PB e o inóculo foi adicionado em uma proporção de 10% v/v. Os frascos foram incubados nas condições de temperatura e agitação determinados pelo planejamento PB durante um período total de 96 h. Amostras de 4 mL foram retiradas em intervalos de 24 h até o término do processo e foram então centrifugadas a $13.000 \times g$ a 4 °C por um tempo total de 30 min. Após os primeiros 15 min de centrifugação retirou-se o sobrenadante para a medida do pH (item 4.6.1). No sedimento resultante foram adicionados mais 4 mL de água destilada para a lavagem da biomassa, dispendo novamente na centrífuga nas mesmas condições por mais 15 min. O sedimento então foi utilizado para determinação da biomassa (item 4.6.2). Ao final do cultivo, todo o conteúdo remanescente do frasco foi utilizado para a recuperação do EPS (item 4.6.3).

4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PLACKETT-BURMAN (PB)

Com a finalidade de avaliar os efeitos das variáveis na produção de EPS sintetizados pela bactéria diazotrófica *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816, utilizando permeado de soro de queijo como substrato, um planejamento experimental Plackett-Burman (PB) foi elaborado. Tomou-se como base o meio proposto por Trindade (2018), variando-se as concentrações dos componentes, a temperatura e a agitação de cultivo, o pH inicial e a relação volume inicial de meio:volume do reator ($V_i:V_R$), totalizando 12 variáveis independentes nos valores indicados na Tabela 2.

Considerando as recomendações indicadas por Rodrigues e Iemma (2009), a matriz do delineamento utilizada foi a de 16 ensaios, ou seja, 4 ensaios a mais que o número de variáveis; e também foram realizadas 4 repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios. A matriz desse

delineamento com seus valores reais e codificados encontra-se na Tabela 3 e a execução dos experimentos foi conduzida agrupando os ensaios de maneira que fossem realizados simultaneamente aqueles com a mesma condição de temperatura e agitação.

Tabela 2 – Variáveis e níveis do planejamento Plackett-Burman.

EL: extrato de levedura; PS: Permeado de soro de queijo; $V_i:V_R$:Relação volume inicial do meio:volume do reator.

*As relações 0,15:1; 0,2:1 e 0,25:1 correspondem respectivamente aos volumes, em mL, 75:500; 100:500 e 125:500.

Variável	Nível -1	Nível 0	Nível +1
K_2HPO_4	0 g L ⁻¹	0,1 g L ⁻¹	0,2 g L ⁻¹
KH_2PO_4	0 g L ⁻¹	0,4 g L ⁻¹	0,8 g L ⁻¹
$MgSO_4.7H_2O$	0 g L ⁻¹	0,2 g L ⁻¹	0,4 g L ⁻¹
NaCl	0 g L ⁻¹	0,1 g L ⁻¹	0,2 g L ⁻¹
EL	0,4 g L ⁻¹	2,2 g L ⁻¹	4,0 g L ⁻¹
$MnCl_2.4H_2O$	0 g L ⁻¹	0,12 g L ⁻¹	0,24 g L ⁻¹
$CaCl_2.2H_2O$	0 g L ⁻¹	0,15 g L ⁻¹	0,3 g L ⁻¹
PS	10 g L ⁻¹	25 g L ⁻¹	40 g L ⁻¹
pH inicial	6,5	7,0	7,5
Agitação	100 rpm	150 rpm	200 rpm
$V_i:V_R$	0,15:1*	0,2:1*	0,25:1*
Temperatura	25 °C	30 °C	35 °C

Tabela 3 – Matriz do Planejamento Plackett-Burman com valores reais e codificados.

Ensaio	K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	NaCl (g L ⁻¹)	EL (g L ⁻¹)	MnCl ₂ .4H ₂ O (g L ⁻¹)	CaCl ₂ .2H ₂ O (g L ⁻¹)	PS (g L ⁻¹)	pH	Agitação (rpm)	V _i :V _R	Temperatura (°C)
1	+1 (0,2)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (4,0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (40)	+1 (7,5)	-1 (100)	+1 (0,25:1)	-1 (25)
2	+1 (0,2)	+1 (0,8)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0,4)	+1 (0,24)	-1 (0)	-1 (10)	+1 (7,5)	+1 (200)	-1 (0,15:1)	+1 (35)
3	+1 (0,2)	+1 (0,8)	+1 (0,4)	-1 (0)	-1 (0,4)	-1 (0)	+1 (0,3)	-1 (10)	-1 (6,5)	+1 (200)	+1 (0,25:1)	-1 (25)
4	+1 (0,2)	+1 (0,8)	+1 (0,4)	+1 (0,2)	-1 (0,4)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (40)	-1 (6,5)	-1 (100)	+1 (0,25:1)	+1 (35)
5	-1 (0)	+1 (0,8)	+1 (0,4)	+1 (0,2)	+1 (4,0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (10)	+1 (7,5)	-1 (100)	-1 (0,15:1)	+1 (35)
6	+1 (0,2)	-1 (0)	+1 (0,4)	+1 (0,2)	+1 (4,0)	+1 (0,24)	-1 (0)	-1 (10)	-1 (6,5)	+1 (200)	-1 (0,15:1)	-1 (25)
7	-1 (0)	+1 (0,8)	-1 (0)	+1 (0,2)	+1 (4,0)	+1 (0,24)	+1 (0,3)	-1 (10)	-1 (6,5)	-1 (100)	+1 (0,25:1)	-1 (25)
8	+1 (0,2)	-1 (0)	+1 (0,4)	-1 (0)	+1 (4,0)	+1 (0,24)	+1 (0,3)	+1 (40)	-1 (6,5)	-1 (100)	-1 (0,15:1)	+1 (35)
9	+1 (0,2)	+1 (0,8)	-1 (0)	+1 (0,2)	-1 (0,4)	+1 (0,24)	+1 (0,3)	+1 (40)	+1 (7,5)	-1 (100)	-1 (0,15:1)	-1 (25)
10	-1 (0)	+1 (0,8)	+1 (0,4)	-1 (0)	+1 (4,0)	-1 (0)	+1 (0,3)	+1 (40)	+1 (7,5)	+1 (200)	-1 (0,15:1)	-1 (25)
11	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,4)	+1 (0,2)	-1 (0,4)	+1 (0,24)	-1 (0)	+1 (40)	+1 (7,5)	+1 (200)	+1 (0,25:1)	-1 (25)
12	+1 (0,2)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,2)	+1 (4,0)	-1 (0)	+1 (0,3)	-1 (10)	+1 (7,5)	+1 (200)	+1 (0,25:1)	+1 (35)
13	-1 (0)	+1 (0,8)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (4,0)	+1 (0,24)	-1 (0)	+1 (40)	-1 (6,5)	+1 (200)	+1 (0,25:1)	+1 (35)
14	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,4)	-1 (0)	-1 (0,4)	+1 (0,24)	+1 (0,3)	-1 (10)	+1 (7,5)	-1 (100)	+1 (0,25:1)	+1 (35)
15	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,2)	-1 (0,4)	-1 (0)	+1 (0,3)	+1 (40)	-1 (6,5)	+1 (200)	-1 (0,15:1)	+1 (35)
16	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0,4)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (10)	-1 (6,5)	-1 (100)	-1 (0,15:1)	-1 (25)
17	0 (0,1)	0 (0,4)	0 (0,2)	0 (0,1)	0 (2,2)	0 (0,12)	0 (0,15)	0 (25)	0 (7,0)	0 (150)	0 (0,2:1)	0 (30)
18	0 (0,1)	0 (0,4)	0 (0,2)	0 (0,1)	0 (2,2)	0 (0,12)	0 (0,15)	0 (25)	0 (7,0)	0 (150)	0 (0,2:1)	0 (30)
19	0 (0,1)	0 (0,4)	0 (0,2)	0 (0,1)	0 (2,2)	0 (0,12)	0 (0,15)	0 (25)	0 (7,0)	0 (150)	0 (0,2:1)	0 (30)
20	0 (0,1)	0 (0,4)	0 (0,2)	0 (0,1)	0 (2,2)	0 (0,12)	0 (0,15)	0 (25)	0 (7,0)	0 (150)	0 (0,2:1)	0 (30)

EL: Extrato de Levedura; PS: Permeado de soro de queijo; V_i:V_R: Relação volume inicial do meio:volume do reator.

4.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.6.1 Determinação do pH

O pH do sobrenadante resultante da centrifugação da amostra foi determinado utilizando um medidor de pH (Marte MB-10, Brasil) previamente calibrado, de acordo com AOAC (2000).

4.6.2 Determinação da Concentração de Biomassa

O sedimento da amostra após 15 min de centrifugação foi lavado com água, novamente centrifugado a $13.000 \times g$ por 15 min a 4°C , ressuspenso em volume apropriado e, então, foi realizada a leitura de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro visível (Bioespectro SP-22, China). A concentração de biomassa foi calculada convertendo o valor de absorbância em g L^{-1} a partir de uma curva de calibração previamente construída para o micro-organismo (Apêndice A) (STAUDT; WOLFE; SHROUT, 2012).

4.6.3 Recuperação e Quantificação do EPS

Para a recuperação do EPS produzido, o sobrenadante da amostra após a centrifugação foi vertido em álcool etílico 96 % na proporção de 1:3 (v/v) e a solução foi armazenada sob refrigeração a 4°C durante 24 h para garantir a completa precipitação do EPS.

A quantificação do EPS foi realizada gravimetricamente, onde o precipitado foi colocado em placas de Petri, previamente pesadas, e seco em estufa a 45°C até atingir massa constante (MONTEIRO et al., 2012).

4.7 PARÂMETROS CINÉTICOS

4.7.1 Produtividade

Os parâmetros produtividade em biomassa (P_X) e produtividade em EPS (P_{EPS}), em $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$, foram calculados ao final dos cultivos utilizando as Equações 2 e 3, respectivamente, de acordo com Hiss (2001).

$$P_X = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{t_c} \quad (2)$$

$$P_{EPS} = \frac{P_{m\acute{a}x} - P_0}{t_c} \quad (3)$$

onde $X_{m\acute{a}x}$ e X_0 são as concentrações de biomassa (g L^{-1}) máxima e inicial, respectivamente, $P_{m\acute{a}x}$ e P_0 são as concentrações de EPS (g L^{-1}) máxima e inicial, respectivamente, e t_c é o tempo de cultivo (h) onde foram obtidas as concentrações máximas de biomassa ou EPS.

4.7.2 Fator de Conversão

Foi calculado o fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{P/X}$) a partir da Equação 4 de acordo com Hiss (2001).

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X_0 - X} \quad (4)$$

onde X é a concentração de biomassa ao final do cultivo (g L^{-1}), X_0 é a concentração de biomassa inicial (g L^{-1}), P é a concentração de EPS ao final do cultivo (g L^{-1}) e P_0 a concentração de EPS inicial (g L^{-1}).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tratados com o auxílio do software Statistica 5.0 (StatSoft, Inc., EUA) a um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$), recomendado para o delineamento experimental PB. Para a comparação dos cultivos estabelecidos a partir da análise do PB, foi realizada análise de variância a 95% de confiança ($p < 0,05$), seguido pelo teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS NA PRODUÇÃO DE EPS

A Tabela 4 apresenta as respostas obtidas nos ensaios do planejamento Plackett-Burman (PB), sendo elas a concentração de biomassa máxima, concentração de EPS em 96 h de cultivo, produtividade em biomassa (P_X) e EPS (P_{EPS}) e o fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{P/X}$).

Tabela 4 – Resultados do planejamento experimental de Plackett-Burman para as respostas biomassa máxima, EPS, produtividades e fator de conversão de biomassa em produto.

Ensaio	Biomassa máxima (g L ⁻¹)	EPS* (g L ⁻¹)	P_X (g L ⁻¹ h ⁻¹)	P_{EPS} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)
1	2,88 (72h)	4,45	0,03	0,05	1,81
2	0,60 (72h)	0	0,01	0,00	0,00
3	1,18 (96h)	1,98	0,01	0,02	1,76
4	1,67 (96h)	5,71	0,02	0,06	3,56
5	2,02 (96h)	1,12	0,02	0,01	0,58
6	7,15 (72h)	1,98	0,07	0,02	0,33
7	2,37 (96h)	0,96	0,02	0,01	0,42
8	4,73 (72h)	6,24	0,05	0,06	1,47
9	1,93 (96h)	6,35	0,02	0,07	3,47
10	5,03 (96h)	1,65	0,05	0,02	0,33
11	2,21 (96h)	2,29	0,02	0,02	1,06
12	1,58 (72h)	0,06	0,02	0,00	0,04
13	1,97 (24h)	0	0,02	0,00	0,00
14	0,83 (96h)	1,42	0,01	0,01	1,88
15	2,26 (96h)	2,43	0,02	0,03	1,10
16	0,78 (72h)	2,33	0,01	0,02	4,04
17	3,13 (72h)	8,52	0,03	0,09	3,52
18	3,24 (72h)	8,03	0,03	0,08	3,10
19	3,16 (72h)	8,63	0,03	0,09	3,11
20	2,64 (72h)	9,28	0,03	0,10	4,83

P_X : produtividade em biomassa; P_{EPS} : produtividade em EPS; $Y_{P/X}$: fator de conversão de biomassa em produto.

*Todas as concentrações de EPS são correspondentes a 96 h de cultivo.

Analisando a Tabela 4, a produção de EPS variou em uma faixa de 0 (ensaios 2 e 13) a 9,28 g L⁻¹ (ensaio 20) e a biomassa de 0,6 (ensaio 2) a 7,15 g L⁻¹ (ensaio 6). Sendo o aumento da produção de EPS o principal objetivo deste estudo, os ensaios referentes aos pontos centrais, do 17 ao 20, foram os que produziram a maior quantidade do biopolímero. A média da produção de EPS nos pontos centrais equivale a 8,61 g L⁻¹, resultado muito próximo ao encontrado por

Trindade (2018), que também utilizando PS como fonte de carbono, ao estudar o incremento da concentração do substrato na produção de EPS por *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816, obteve um valor de 8,21 g L⁻¹ do biopolímero com concentração de PS igual a 20 g L⁻¹.

Além dos pontos centrais, destacaram-se na concentração de biopolímero os ensaios 4, 8 e 9, apresentando respectivamente valores de 5,71; 6,24 e 6,35 g L⁻¹ de EPS. É interessante ressaltar que os ensaios 4, 8 e 9 possuem em comum as maiores concentrações de PS (40 g L⁻¹) e K₂HPO₄ (0,2 g L⁻¹) estudadas no delineamento, equivalente ao nível +1, além da menor velocidade de agitação estudada (100 rpm), equivalente ao nível -1. Em contrapartida, os ensaios que apresentaram os menores valores relacionados à produção de EPS foram os ensaios 2, 12 e 13, em que não foi detectada a produção de EPS nos ensaios 2 e 13, e apenas 0,06 g L⁻¹ de biopolímero foi produzido no ensaio 12.

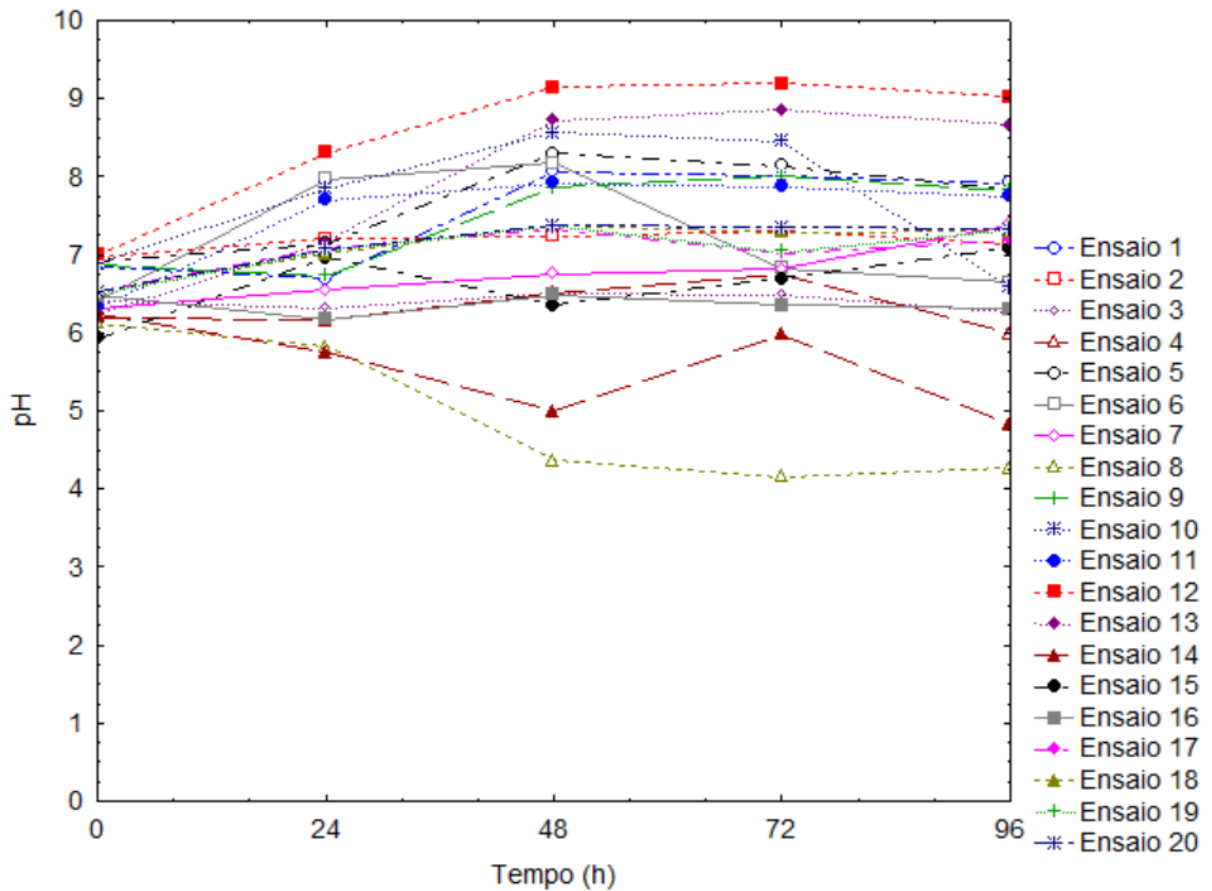
Em relação à resposta biomassa máxima, os ensaios nos quais o crescimento microbiano foi maior foram os ensaios 6 e 10, respectivamente. Observando a quantidade de EPS produzida nesses dois ensaios, nota-se que a produção foi baixa, podendo-se concluir que a alta quantidade de biomassa não propicia necessariamente a maior produção de biopolímero. Resultado que concorda com o fator de conversão de biomassa em produto desses ensaios, que com exceção dos ensaios 2, 12 e 13, que não produziram praticamente EPS, foram as respostas mais baixas, ambas 0,33 g g⁻¹. De acordo com o estudo de Mesomo (2007), o EPS é produzido normalmente na fase estacionária do crescimento celular, sendo considerado um metabolismo secundário e não possuindo relação direta com o crescimento celular.

Pode-se concluir que os resultados da Tabela 4 estão em concordância com os de Devi, Vijayendra e Shamala (2012) e González (2019). Devi, Vijayendra e Shamala (2012), ao avaliar a produção de EPS por *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100, utilizando um meio contendo sacarose e 20% de farelo de arroz hidrolisado como fontes de carbono, obtiveram um valor de biomassa alto, de 5,92 g L⁻¹ e, em consequência, a produção de EPS alcançada foi de apenas 2,01 g L⁻¹. Já González (2019) produziu 6,15 g L⁻¹ de EPS com uma quantidade de biomassa baixa, de 1,35 g L⁻¹, utilizando a bactéria *Mesorhizobium huakuii* SEMIA 6454 e PS como fonte de carbono.

5.1.1 Cinética dos Ensaios do Planejamento PB

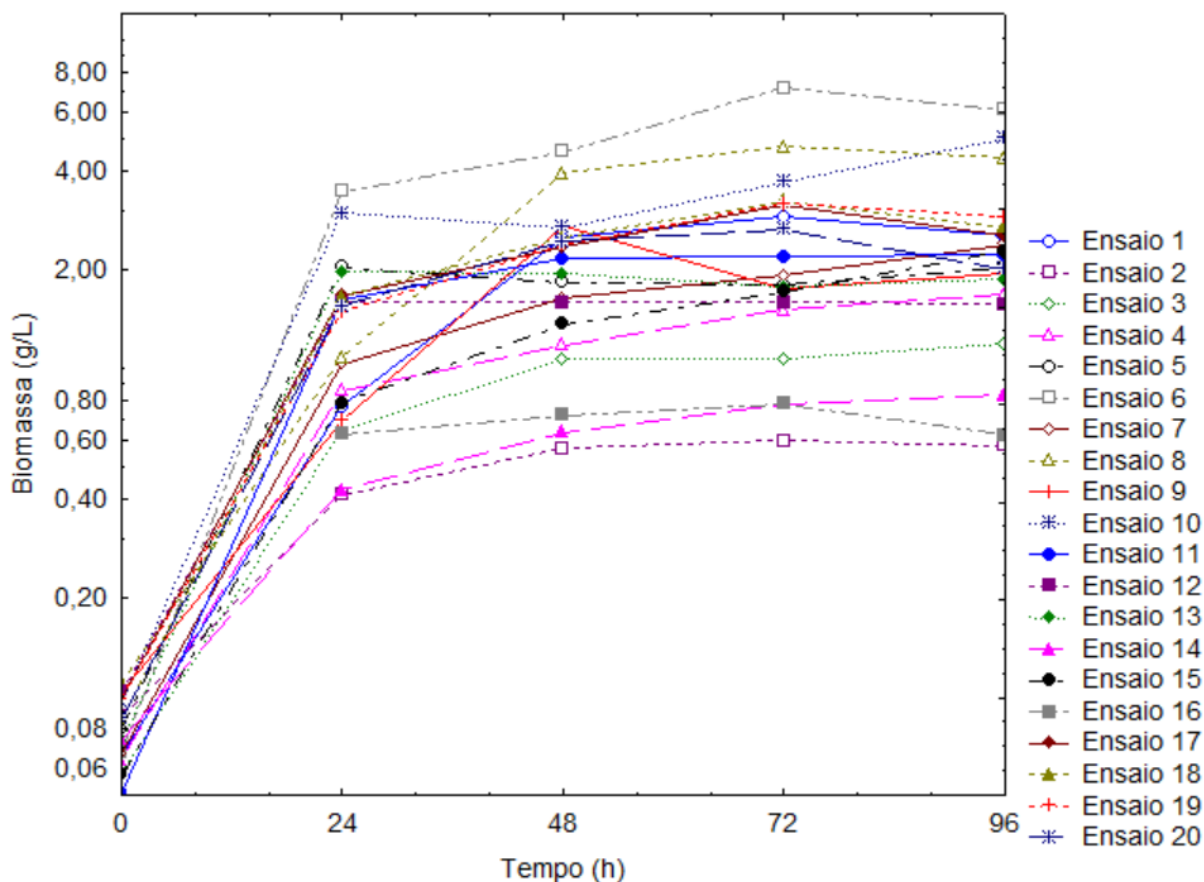
A Figura 2 apresenta o acompanhamento do pH, ao longo das 96 h de cultivo, de cada ensaio realizado no delineamento. As variações mais acentuadas observadas foram as do ensaio 12, no qual houve alcalinização, elevando o pH para 9; e as do ensaio 8, em que houve acidificação, passando de um pH inicial de 6,5 para um pH final de aproximadamente 4. Ribeiro (2015), avaliando diferentes bactérias com potencial para a produção de EPS com glicerol residual como fonte de carbono, encontrou um comportamento semelhante ao ensaio 8 para a bactéria *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816, que apresentou uma reação ácida, passando do pH 7 para 4,93. Em uma análise da cinética dos ensaios fica evidenciado diversos comportamentos bem similares. Na maioria dos ensaios a tendência foi de alcalinização dos meios de cultivo, sendo que o comportamento que mais se repetiu foi o observado nos ensaios 2, 5, 10, 11, 12, 13, 18 e 20, no qual ocorreu um aumento do pH até as 48 e 72 h, se estabilizando a seguir. Nos ensaios 1, 3, 4, 9, 15 e 16 ocorreu uma leve acidificação nas primeiras 24 h e depois o pH aumentou até se estabilizar após as 72 h. O pH dos ensaios 6, 17 e 18, após se elevar nas primeiras 48 h de cultivo, caiu acentuadamente, acidificando ao atingir as 72 h e novamente apresentou um leve aumento até completar as 96 h de cultivo. A curva de pH dos ensaios 8 e 14 mostrou declínio até as 48 h, sendo que no ensaio 8 se estabilizou após esse período e no ensaio 14 subiu nas 72 h para cair novamente no final do cultivo. O ensaio 7 foi o único no qual a variação do pH, embora pequena, manteve a mesma tendência, ou seja, o meio se alcalinizou durante todo cultivo.

Figura 2 – Acompanhamento do pH dos ensaios do planejamento de Plackett-Burman.



O acompanhamento da biomassa dos ensaios do planejamento PB é apresentado na Figura 3, em escala semi-logarítmica ao longo do tempo de cultivo. Observa-se que em geral os ensaios demonstraram um incremento da biomassa até as 72 h, e posteriormente houve estabilização, atingindo a fase estacionária. Verificou-se também um crescimento bem mais acelerado nas primeiras 24 h para todos os ensaios. Como já verificado na Tabela 3, a análise das curvas de crescimento confirma que os ensaios 6, 10 e 8 foram os que apresentaram maior biomassa e os ensaios 2, 14 e 16 menor biomassa. É interessante ressaltar o fato de que os três ensaios com maior crescimento microbiano apresentavam em comum as concentrações de extrato de levedura (EL) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mais altas em seu meio, de 4 g L^{-1} e $0,4 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, e a menor relação $V_i:V_R$ equivalente (0,15). Isso indica que a maior disponibilidade de nitrogênio e a maior aeração, indicada pela menor relação $V_i:V_R$, podem favorecer o crescimento. Já os três ensaios com menor crescimento apresentavam condições correspondentes ao nível mais baixo de EL ($0,4 \text{ g L}^{-1}$) e de PS (10 g L^{-1}).

Figura 3 – Acompanhamento da biomassa dos ensaios do planejamento Plackett-Burman.



5.1.2 Análise de Efeitos Principais

As respostas concentração de EPS e concentração de biomassa obtidas nos ensaios do planejamento PB foram tratadas no *software Statistica 5.0 (StatSoft Inc., EUA)* com o objetivo de verificar o efeito principal de cada variável estudada. Com as respostas obtidas foram construídas tabelas apresentando os efeitos de cada variável nas respostas, juntamente com seu erro padrão, valor *t* e nível de significância (*p*-valor). Nessas tabelas, as variáveis significativas para um nível de confiança de 90% ($p < 0,1$) estão representadas em negrito.

O valor do efeito indica o quanto uma mudança na variável independente em estudo, do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), provoca alterações significativas na variável dependente. Assim, fatores com elevado valor de efeito produzem as mudanças mais significativas em uma resposta, sendo então considerados como os mais importantes (ALBUQUERQUE, 2014).

A coluna do p -valor indica qual a probabilidade de uma variável independente não produzir efeito sobre as variáveis respostas. Dessa forma, baixos valores de p significam que existe alta probabilidade de que alterações na variável independente produzirão mudanças significativas na variável dependente (ALBUQUERQUE, 2014). Em um planejamento PB as mudanças significativas são consideradas a um nível de confiança de 90%, o que determina que alterações nos fatores estudados só serão significativas na resposta se seu valor de p for menor que 0,1 ($p < 0,1$).

5.1.2.1 Análise dos Efeitos na Concentração de EPS

Analisando a Tabela 5, que apresenta os efeitos estimados das variáveis independentes avaliando a concentração de EPS como resposta, observa-se que nenhuma das 12 variáveis estudadas demonstrou ser significativa. De acordo com Rodrigues e Iemma (2009), quando os valores dos pontos centrais são inferiores ou superiores aos das outras condições dos ensaios, o erro padrão fica muito alto, significando que os resultados não se ajustam a um modelo de 1ª ordem e indicando possível existência de uma curvatura. Como observado anteriormente na Tabela 4, nos pontos centrais foram alcançados valores superiores aos demais ensaios e conforme é apresentado na Tabela 5, o erro padrão foi alto (2,1), ou seja, se comportando como o descrito por Rodrigues e Iemma (2009). Então, quando isso acontece, ao tratar os dados estatisticamente para analisar os efeitos principais, deve-se realizar uma checagem da curvatura.

Tabela 5 – Efeitos estimados utilizando a concentração de EPS como variável dependente sem análise de curvatura.

Fator	Efeito	Erro padrão	<i>t</i> (7)	<i>p</i> -valor
Média	3,67	0,94	3,91	0,0058
K ₂ HPO ₄	1,82	2,10	0,87	0,4141
KH ₂ PO ₄	-0,43	2,10	-0,20	0,8439
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,73	2,10	0,35	0,7394
NaCl	0,35	2,10	0,17	0,8709
EL	-0,76	2,10	-0,36	0,7292
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,06	2,10	-0,03	0,9775
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,40	2,10	0,19	0,8538
PS	2,41	2,10	1,15	0,2887
pH	-0,54	2,10	-0,26	0,8056
Agitação	-2,27	2,10	-1,08	0,3144
V _i :V _R	-0,65	2,10	-0,31	0,7644
Temperatura	-0,63	2,10	-0,30	0,7740

EL: Extrato de Levedura; PS: Permeado de soro de queijo; V_i:V_R: Relação volume inicial do meio:volume do reator.

A Tabela 6 foi construída seguindo a mesma análise utilizada para a Tabela 5, dos efeitos estimados sobre a concentração de EPS como variável dependente, mas sendo aplicada uma checagem de curvatura nos dados. Observando os novos valores da tabela, embora os efeitos continuem os mesmos, percebe-se mudanças comparado aos valores da tabela anterior e que a curvatura é estatisticamente muito significativa com $p < 0,1$, com efeito de 12,36. Em consequência da curvatura, o erro padrão das variáveis independentes diminuiu de 2,1 para 0,2, o valor *t* aumentou, o *p*-valor diminuiu e a maioria dos fatores passou a ser significativa. Conforme afirmam Rodrigues e Iemma (2009), as variáveis estatisticamente significativas deixam de ficar mascaradas pelo erro padrão que estava alto por conta dos pontos centrais, revelando assim o impacto das variáveis independentes sobre a resposta. Isso confirma a existência de uma curvatura e que os resultados não se ajustam a um modelo de 1ª ordem.

Tabela 6 – Efeitos estimados utilizando a concentração de EPS como variável dependente com análise de curvatura.

Fator	Efeito	Erro padrão	<i>t</i> (6)	<i>p</i> -valor
Média	2,44	0,10	23,95	<0,0001
Curvatura	12,36	0,45	27,18	<0,0001
K ₂ HPO ₄	1,82	0,20	8,95	0,0001
KH ₂ PO ₄	-0,43	0,20	-2,11	0,0796
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,73	0,20	3,57	0,0118
NaCl	0,35	0,20	1,74	0,1327
EL	-0,76	0,20	-3,72	0,0099
MnCl ₂ .4H ₂ O	-0,06	0,20	-0,30	0,7735
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,40	0,20	1,97	0,0960
PS	2,41	0,20	11,84	<0,0001
pH	-0,54	0,20	-2,64	0,0387
Agitação	-2,27	0,20	-11,18	<0,0001
V _i :V _R	-0,65	0,20	-3,21	0,0183
Temperatura	-0,63	0,20	-3,08	0,0217

EL: Extrato de Levedura; PS: Permeado de soro de queijo; V_i:V_R: Relação volume inicial do meio:volume do reator.

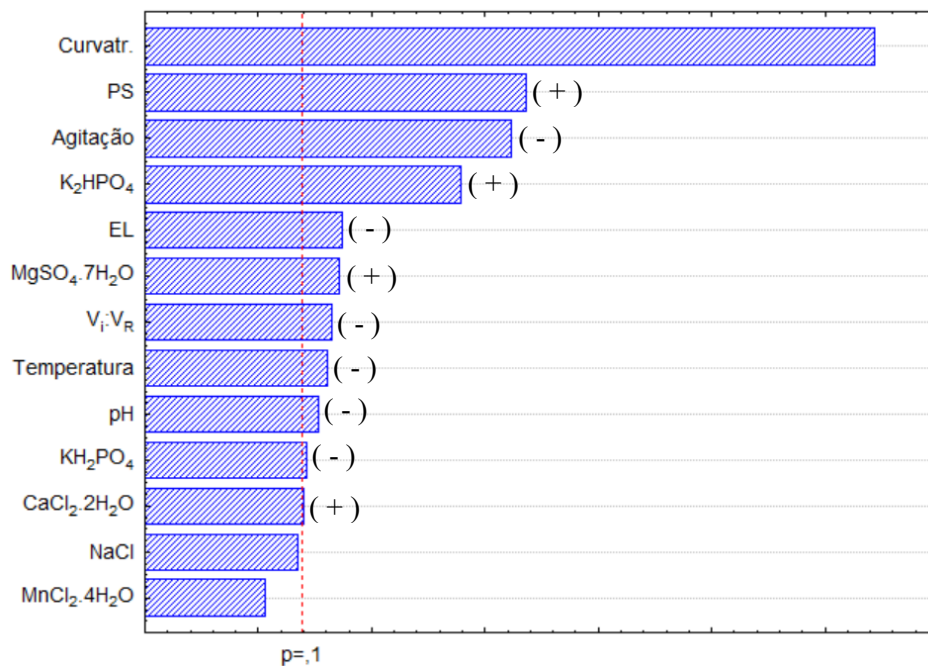
A partir dos dados demonstrados na Tabela 6, conclui-se que das variáveis independentes estudadas, ao passar do nível inferior (-1) para o nível superior (+1), as únicas que demonstraram não ser significativas foram as concentrações de cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de manganês tetrahidratado (MnCl₂.4H₂O), com *p*-valor de 0,1327 e 0,7735, respectivamente. Desta forma, essas variáveis que demonstraram não ser significativas podem ser fixadas no nível -1 (0 g L⁻¹), ou seja, esses dois componentes não precisam ser adicionados ao meio de cultivo, o que implica em redução do custo do mesmo.

As variáveis fosfato monopotássico (KH₂PO₄), EL, pH, agitação, V_i:V_R e temperatura apresentaram efeitos negativos. Sendo assim, o incremento do nível -1 para o +1 implica em redução significativa da concentração de EPS, assim estas variáveis devem ser usadas nos valores do menor nível testado: 0 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,4 g L⁻¹ de EL; pH 6,5; agitação de 100 rpm; V_i:V_R de 0,15:1 e temperatura de 25 °C. Os demais fatores, fosfato de dipotássio (K₂HPO₄), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), cloreto de cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O) e PS, que demonstraram efeitos positivos na passagem do menor nível para o maior nível, devem ser fixados no nível +1, correspondendo aos valores 0,2 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,4 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,3 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 40 g L⁻¹ de PS.

Com o diagrama de Pareto demonstrado na Figura 4 é possível observar com mais clareza a significância do efeito de cada variável independente. O diagrama consiste em barras

com um comprimento proporcional ao valor absoluto dos efeitos estimados, dividido pelo erro padrão e estão indicadas em ordem de grandeza com os maiores efeitos na parte superior. Dessa forma, é possível observar com mais clareza quais são as variáveis que mais influenciam na resposta. Neste estudo, o diagrama inclui uma linha vertical no valor p crítico 0,1 para as significâncias. Em relação aos principais efeitos nota-se que o PS, fonte de carboidrato, é a variável que produziu maior influência sobre a resposta de EPS, tendo em módulo o maior efeito (2,41) dentre todas as outras variáveis avaliadas. Seguindo o PS, as outras variáveis com maiores efeitos foram a agitação (2,27) e o K_2HPO_4 (1,82).

Figura 4 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados na análise estatística dos ensaios do planejamento Plackett-Burman em relação à concentração de EPS.



A grande influência da concentração de PS no meio de cultivo para a produção do biopolímero pode ser explicada devido aos carboidratos serem considerados a principal reserva de nutrientes e energia para o crescimento microbiano e produção de polissacarídeos. A fonte de carbono afeta diretamente na repressão catabólica do metabolismo secundário, assim levando à produção de polissacarídeos pelas vias anabólicas. Liu et al. (2016) ainda afirmam que o aumento da concentração inicial da fonte de carbono no meio geralmente leva ao aumento da produção de EPS.

O estudo de Joshi, Patel e Gupte (2013), que é relacionado à produção de EPS microbiano utilizando um delineamento experimental PB para otimizar a produção do biopolímero, afirma que a fonte energética, substrato utilizado no meio de cultivo, e a fonte de nitrogênio, são os principais parâmetros que influenciam diretamente no processo. Utilizando xilose como carboidrato, EL como fonte de nitrogênio e o fungo *Schizophyllum commune* AGMJ-1 para produzir o EPS, os autores encontraram efeitos positivos para a concentração de carboidrato e de EL, resultado que concorda com o presente estudo em relação à fonte de carbono, mas se opõe em relação à fonte de nitrogênio.

Segundo Sengupta, Datta e Biswas (2018), o papel do(s) composto(s) nitrogenado(s) em um meio é bastante complexo, citando que no caso da rizobactéria *Cupriavidus pauculus*, o aumento da concentração de nitrogênio exerceu um efeito positivo (ou benéfico) no rendimento quantitativo do EPS bacteriano, enquanto em outra situação, com *Streptococcus thermophilus*, verificaram que um aumento gradual do complexo de nitrogênio nos meios de cultivo resultou em uma mudança do EPS bacteriano produzido de maior para menor massa molar.

Feng et al. (2010), ao realizarem uma otimização de meios para o crescimento de micélios e para produção de EPS por *Lentinus edodes*, afirmam que o EL tem sido frequentemente utilizado para fornecer os fatores de crescimento necessários, mas que uma concentração muito alta reduziria o uso de outras fontes de carbono e o acúmulo de metabólitos. Assim, como o EPS é um metabólito secundário do micro-organismo, grandes quantidades de nitrogênio impediriam o consumo da fonte de carboidrato para consequente produção do polímero, fato que pode explicar o motivo do incremento da concentração de EL nesse estudo ter sido negativo. Barbosa et al. (2004) também confirmaram esta hipótese ao citar que baixas concentrações de nitrogênio estimularam a produção de EPS, enquanto altos níveis inibiram a sua produção. Freitas, Alves e Reis (2011) ainda citam que a disponibilidade de carbono, concomitante com a limitação de nitrogênio, normalmente favorecem a produção de EPS por micro-organismos.

Liu et al. (2003), aplicando planejamentos experimentais para otimizar a produção de nisina pela bactéria *Lactococcus lactis* em meio à base do soro do leite, identificaram pelo planejamento PB que o EL, KH_2PO_4 , e MgSO_4 exerciam efeitos significativos na biossíntese da nisina, assim como na produção de EPS por *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 no presente estudo. No planejamento PB avaliaram também os efeitos da temperatura e pH, mas estes não tiveram influência significativa, explicando que os testes foram realizados com valores

próximos às condições ideais desses dois fatores. Isto também pode ter ocorrido na produção de EPS no presente estudo pois, apesar de apresentarem efeitos significativos, foram efeitos bem menores se comparados aos outros componentes estudados que apresentaram influência na resposta. A faixa de valores que foi utilizada nesse planejamento tanto para a temperatura (25–35 °C) quanto para o pH (6,5-7,5) é amplamente utilizada nos processos com bactérias diazotróficas, sendo os valores considerados como níveis ótimos para produção de EPS de acordo com a literatura (GONZÁLEZ, 2019; LIU et al., 2017).

5.1.2.2 Análise dos Efeitos na Concentração de Biomassa

A fim de observar também a influência das variáveis independentes no crescimento microbiano, foi realizada a análise estatística em relação à concentração de biomassa máxima obtida nos 20 ensaios realizados. Da mesma forma que procedeu-se utilizando a produção de EPS como variável resposta, o tratamento estatístico foi realizado primeiramente sem análise de curvatura, apresentado na Tabela 7. Nessa estimativa, verifica-se que o erro padrão não teve um valor alto como constatado em relação ao de EPS sem checagem de curvatura e, voltando na Tabela 4, também é possível verificar que os valores de biomassa máxima dos pontos centrais (na média de 3,04 g L⁻¹), apesar de serem superiores a maioria dos ensaios, não foram as maiores concentrações obtidas, sendo inferiores aos ensaios 6 (7,15 g L⁻¹), 8 (4,73 g L⁻¹) e 10 (5,03 g L⁻¹). Essas observações já são indicativos que não existe uma curvatura na resposta.

Tabela 7 – Efeitos estimados utilizando a concentração de biomassa máxima como variável dependente sem análise de curvatura.

Fator	Efeito	Erro padrão	<i>t</i> (7)	<i>p</i> -valor
Média	2,57	0,18	14,41	<0,0001
K ₂ HPO ₄	0,53	0,40	1,34	0,2232
KH ₂ PO ₄	-0,70	0,40	-1,77	0,1201
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,30	0,40	3,27	0,0136
NaCl	0,40	0,40	1,00	0,3488
EL	2,03	0,40	5,10	0,0014
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,55	0,40	1,38	0,2099
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,08	0,40	0,20	0,8466
PS	0,77	0,40	1,94	0,0937
pH	-0,63	0,40	-1,57	0,1593
Agitação	0,59	0,40	1,49	0,1790
V _i :V _R	-1,23	0,40	-3,08	0,0178
Temperatura	-0,98	0,40	-2,47	0,0427

EL: Extrato de Levedura; PS: Permeado de soro de queijo; V_i:V_R: Relação volume inicial do meio:volume do reator.

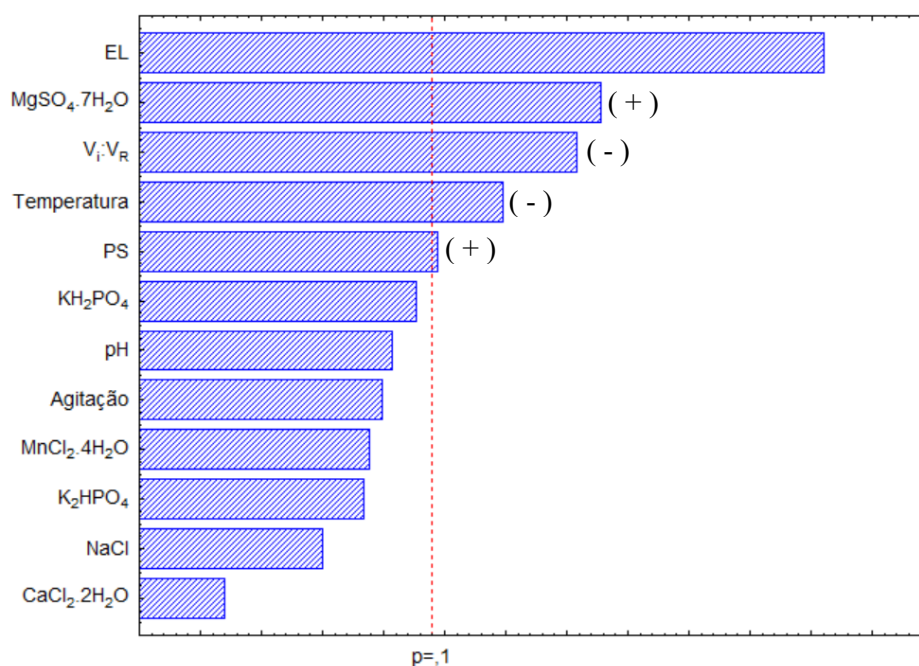
Apenas para garantir a confiabilidade da análise estatística, foi realizada também a estimativa dos efeitos com uma checagem de curvatura, apresentada na Tabela 8. Como já era esperado, nenhuma mudança significativa em relação aos efeitos das variáveis independentes foi constatada, sendo que o efeito da curvatura foi baixo com um p -valor não significativo e o erro padrão das variáveis diminuiu apenas de 0,4 para 0,37. Os fatores que apresentaram efeitos significativos por ordem de maior influência na concentração de biomassa como demonstrado no Diagrama de Pareto da Figura 5 foram: EL (2,03), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,3), relação $V_i:V_R$ (-1,23), temperatura (-0,98) e PS (0,77).

Tabela 8 – Efeitos estimados utilizando a quantidade de biomassa máxima como variável dependente com análise de curvatura.

Fator	Efeito	Erro padrão	t(6)	p-valor
Média	2,45	0,19	13,17	<0,0001
Curvatura	1,18	0,83	1,42	0,2041
K_2HPO_4	0,53	0,37	1,43	0,2023
KH_2PO_4	-0,70	0,37	-1,89	0,1069
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,30	0,37	3,51	0,0127
NaCl	0,40	0,37	1,07	0,3236
EL	2,03	0,37	5,46	0,0016
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,55	0,37	1,48	0,1898
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,08	0,37	0,21	0,8368
PS	0,77	0,37	2,08	0,0831
pH	-0,63	0,37	-1,69	0,1426
Agitação	0,59	0,37	1,60	0,1608
$V_i:V_R$	-1,23	0,37	-3,30	0,0164
Temperatura	-0,98	0,37	-2,65	0,0381

EL: Extrato de Levedura; PS: Permeado de soro de queijo; $V_i:V_R$: Relação volume inicial do meio:volume do reator.

Figura 5 – Diagrama de Pareto dos efeitos estimados na análise estatística dos ensaios do planejamento Plackett-Burman em relação à concentração de biomassa máxima.



Uma questão muito importante de ressaltar ao comparar os resultados com os das Tabelas 5 e 6 é que a única variável que apresentou efeito significativo contrário para as diferentes respostas em análise, concentrações de EPS e biomassa, foi a concentração de EL, fonte de nitrogênio no meio. Para a produção de EPS, o EL mostrou um efeito negativo significativo de -0,76, indicando que a menor concentração utilizada no estudo, de 0,4 g.L⁻¹, favoreceu a produção do biopolímero. Já para a concentração de biomassa máxima, o efeito do EL foi positivo e significativo, no valor de 2,03, levando a concluir que quanto mais EL no meio de cultivo maior será o crescimento microbiano na faixa estudada.

O EL influenciou positivamente na biomassa pois o nitrogênio é considerado, juntamente com o carbono, o macronutriente mais importante para o crescimento e metabolismo do micro-organismo. Os compostos nitrogenados são utilizados pelas células microbianas para a síntese de nucleotídeos, aminoácidos e outros metabólitos (SHARMA; SHARMA; SHARMA, 2018), sendo que a síntese de alguns destes compostos estão intimamente ligados ao processo de reprodução do micro-organismo. Além disso, o efeito estimulador do EL pode ser devido ao seu elevado conteúdo de vitaminas e outros compostos que atuam como fatores de crescimento (SOUSA, 2011; POKHREL; OHGA, 2007). Freitas, Torres e Reis (2017) indicam que a presença de nitrogênio extra favorece o crescimento celular.

Sousa (2011), com o objetivo de otimizar as condições de cultivo das linhagens de *Bradyrhizobium* INPA 3-11B e UFLA 3-84, aplicou uma estratégia sequencial de planejamentos experimentais. A partir de um delineamento Plackett-Burman, de 12 ensaios e 3 pontos centrais, avaliou as variáveis temperatura, agitação, glicerol, EL e pH para ambas as linhagens e no estudo da linhagem UFLA 3-84 incluiu uma solução de micronutrientes. Para a linhagem INPA 3-11B, selecionou-se para realizar um posterior Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) a agitação e o EL, por apresentaram no delineamento PB efeitos positivos significativos sobre o crescimento celular e próximo da significância no metabolismo bacteriano. Para a linhagem UFLA 3-84 selecionou-se a agitação, que apresentou efeito positivo significativo sobre a biomassa e contagem de células; e o glicerol e o EL, por apresentaram efeitos, também positivos, sobre a biomassa. A partir do DCCR concluíram que a concentração de EL foi a variável mais importante no processo, para INPA 3-11B, e a faixa ótima para a concentração de EL foi entre 4 e 6 g L⁻¹, faixa na qual o presente estudo também alcançou a maior concentração de biomassa, no ensaio em que o meio continha 4 g L⁻¹ de EL. Já para a linhagem UFLA 3-84, o autor identificou que a faixa ótima de concentração de EL estava em torno de 2 g L⁻¹. Em relação ao EL, o autor ressaltou que é um componente muito importante para o crescimento microbiano e que, dependendo da concentração e marca utilizada, favorece a obtenção de alta produção de células ou até inibe o crescimento, produzindo células com baixa viabilidade.

Torres et al. (2014) estudaram o impacto da concentração de glicerol e nitrogênio no crescimento da bactéria *Enterobacter* A47 e na produção de EPS, obtendo resultados os quais mostraram que o aumento da concentração inicial de nitrogênio levou a um maior crescimento microbiano, mas foi prejudicial para a síntese de EPS, sendo a maior produtividade de EPS obtida para concentrações de até 1,05 g L⁻¹. Os autores também citam que um comportamento semelhante foi relatado em diferentes estudos para várias outras bactérias produtoras de EPS, como *Aeromonas salmonicida*, *Sphingomonas paucimobilis* - GS1 e *Xanthomonas campestris*. Eles explicam, assim como outros autores já mencionados, que a fonte de nitrogênio é usada principalmente para o crescimento celular e produção de enzimas para as vias catabólicas e anabólicas, mas a concentração aumentada de nitrogênio é frequentemente a causa da diminuição da produção de EPS.

O efeito positivo ao aumentar a concentração de MgSO₄.7H₂O de 0 para 0,4 g L⁻¹ pode ser explicado pelo fato desse componente ser um fator importante utilizado em pequenas quantidades como suplemento para o crescimento dos micro-organismos, muitas vezes

relacionado à ação de enzimas. Esse sal atua como um cofator enzimático, requerido no metabolismo de carboidratos e em processos de transporte (FREITAS; TORRES; REIS, 2017; GONZÁLEZ, 1019;). Su, Chi e Lu (2007), ao estudarem a otimização do meio e das condições de cultivo da bactéria diazotrófica marinha *Cyanothece* sp. 113 para obter maior rendimento de EPS, testaram os efeitos de diferentes concentrações de $MgSO_4$ adicionado ao meio no crescimento celular, observando que o crescimento foi estimulado pela adição $MgSO_4$ na faixa de concentrações de 0 a $0,9\text{ g L}^{-1}$, sendo a principal diferença entre 0 e $0,2\text{ g L}^{-1}$.

A relação $V_i:V_R$ influencia diretamente a aeração do meio de cultivo, ou seja, interfere na disponibilidade de oxigênio, condição muito importante para o crescimento dos microorganismos. Quanto maior a relação, maior o volume inicial do meio e, conseqüentemente, menos oxigênio estará disponível no frasco (LIU et al, 2016; FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Mahapatra e Banerjee (2013), ao conduzirem um estudo da otimização da produção de EPS de *Fusarium solani* SD5, explicaram que embora o tampão de algodão não impeça a penetração de ar nos frascos de cultura, o tampão pode restringir a passagem de ar livre. Assim, o volume de ar do espaço vazio pode influenciar o nível de oxigênio no meio líquido. Outros fatores relacionados à variável $V_i:V_R$ que também influenciam são a área de superfície e a profundidade do meio líquido, que controlam a difusão e circulação do oxigênio, onde uma maior área de superfície e menor profundidade aumentam a difusão. Os autores ainda constataram que, considerando a área de superfície, volume do espaço vazio e profundidade média, pode-se supor que, quanto menor o volume médio, maior o oxigênio dissolvido e quanto maior o volume médio, menor o oxigênio dissolvido. Dessa forma o efeito negativo da variável $V_i:V_R$ neste estudo pode estar ligado à menor aeração do meio.

Serrato et al. (2006) também concluíram que a queda na aeração afetou a concentração de biomassa. Os autores estudaram as condições de cultivo para a produção de EPS pela bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica* e, nesse estudo, realizaram variações nos níveis de aeração dos cultivos utilizando diferentes volumes de meio em frasco *Erlenmeyer* de 500 mL da seguinte forma: para baixa aeração utilizaram 400 mL de meio, para aeração moderada 250 mL e para alta aeração 100 mL. Todos os frascos foram agitados na mesma rotação e temperatura (120 rpm e $30\text{ }^\circ\text{C}$) e após 72 h foram medidas suas densidades ópticas a 600 nm. Os resultados encontrados mostraram que a alta aeração promoveu um intenso crescimento microbiano ($DO_{600} \sim 8$) e com a queda da aeração o crescimento foi comprometido e os valores da DO_{600} foram ~ 4 e $\sim 1,4$ para aeração moderada e baixa, respectivamente.

A temperatura de incubação é um dos fatores limitantes no crescimento microbiano, o qual cada espécie bacteriana apresenta uma temperatura ótima. De acordo com Liu et al. (2016), a temperatura ideal de incubação da maioria das espécies endofíticas, como os rizóbios, varia entre 24 a 30 °C. Sendo assim, o efeito negativo da temperatura pode ser explicado pelo maior nível testado, a temperatura de 35 °C, não se encontrar dentro da faixa de temperatura ideal segundo a literatura.

Em relação ao efeito positivo do PS, como já foi mencionado anteriormente, o carboidrato é um componente essencial para o crescimento microbiano, sendo a principal reserva de nutrientes e energia, ou seja, quanto maior a concentração do substrato, maior será a disponibilidade da fonte de carboidrato.

5.2 CULTIVOS PROPOSTOS A PARTIR DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE PLACKETT-BURMAN

O estudo resultante do planejamento PB levou a certas condições experimentais não testadas inicialmente, portanto cultivos adicionais foram propostos, a fim de buscar a melhor condição para a produção de EPS utilizando a bactéria *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 e o PS como fonte de carbono. Nas análises utilizando as concentrações de EPS e biomassa como resposta, observou-se que a concentração de EL influenciou as mesmas com efeitos opostos. Dessa forma, decidiu-se realizar outros 3 cultivos com as condições fixadas no planejamento PB para a concentração de EPS, mas variando as concentrações de EL. Os testes foram denominados de cultivo 1, 2 e 3, definidos na Tabela 9, e foram realizados em quintuplicatas, sendo calculados os valores médios e desvio-padrão das respostas.

Tabela 9 – Condições dos cultivos 1, 2 e 3.

Componente/Condição	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3
K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	0,2	0,2	0,2
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	0	0	0
MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,4	0,4	0,4
NaCl (g L ⁻¹)	0	0	0
EL (g L⁻¹)	0,4	2,2	4,0
MnCl ₂ .4H ₂ O (g L ⁻¹)	0	0	0
CaCl ₂ .2H ₂ O (g L ⁻¹)	0,30	0,30	0,30
PS (g L ⁻¹)	40	40	40
pH inicial	6,5	6,5	6,5
Agitação (rpm)	100	100	100
Relação V _i :V _R	0,15:1	0,15:1	0,15:1
Temperatura (° C)	25	25	25

EL: Extrato de Levedura; PS: Permeado de soro de queijo; V_i:V_R: Relação volume inicial do meio:volume do reator.

Primeiramente, como o principal objetivo do trabalho em questão foi estudar a produção de EPS, o cultivo 1 foi realizado seguindo as condições estabelecidas pela análise de efeitos da Tabela 6. Dessa forma, as concentrações dos nutrientes e as condições do cultivo foram estabelecidas de acordo com o efeito de cada uma das variáveis independentes na resposta concentração de EPS. Utilizou-se o valor do nível inferior (-1) do planejamento para as variáveis que não apresentaram efeitos significativos a fim de reduzir custos. Para as variáveis com efeito significativo, os valores utilizados foram do nível superior (+1) para os efeitos positivos e do nível inferior para os efeitos negativos. Como os resultados encontrados para a produção de EPS não foram superiores aos pontos centrais do planejamento PB, foram realizados após o cultivo 1 os cultivos 2 e 3, variando a concentração do EL, o qual teve efeitos opostos em relação à produção de EPS e biomassa no planejamento PB, e as demais condições mantiveram-se as mesmas utilizadas no primeiro cultivo.

Na Tabela 10 estão apresentados todos os parâmetros avaliados ao final das 96 h de cultivo das três condições testadas após a finalização do planejamento experimental. As respostas demonstradas são os valores médios e seus respectivos desvios-padrões de cinco

repetições. Nessa tabela são estabelecidas comparações entre os cultivos 1, 2 e 3 para cada resposta estudada, demonstrando a existência ou não de diferenças significativas em um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 10 – Médias \pm desvios-padrão (n=5) para biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$), EPS, produtividade de biomassa (P_X), produtividade de EPS (P_{EPS}) e fator de conversão de biomassa em EPS ($Y_{P/S}$).

Cultivo**	$X_{m\acute{a}x}$ (g L ⁻¹)	EPS (g L ⁻¹)	P_X (g L ⁻¹ h ⁻¹)	P_{EPS} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)
1	1,25 \pm 0,01 ^a	6,92 \pm 0,23 ^a	0,012 \pm 0,000 ^a	0,072 \pm 0,002 ^a	5,84 \pm 0,15 ^a
2	2,43 \pm 0,06 ^b	3,15 \pm 0,12 ^b	0,025 \pm 0,001 ^b	0,033 \pm 0,001 ^b	1,33 \pm 0,05 ^b
3	3,14 \pm 0,11 ^c	0,75 \pm 0,04 ^c	0,032 \pm 0,001 ^c	0,008 \pm 0,000 ^c	0,25 \pm 0,02 ^c

*Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os cultivos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

**As concentrações de EL nos meios dos cultivos 1, 2 e 3 foram, respectivamente, 0,4; 2,2 e 4,0 g L⁻¹.

A comparação dos resultados obtidos nos três cultivos confirma as condições estabelecidas no planejamento experimental de PB. O cultivo 1, realizado nas melhores condições do planejamento para a resposta de concentração de EPS, alcançou uma produção significativamente maior do polímero (6,92 g L⁻¹) e, conseqüentemente, uma produtividade de EPS também superior (0,072 g L⁻¹ h⁻¹). O cultivo 3, realizado nas condições indicadas pelo PB mas com acréscimo da concentração de EL, apresentou a maior biomassa (3,14 g L⁻¹) e conseqüentemente a maior produtividade de biomassa (0,032 g L⁻¹ h⁻¹). Ribeiro (2015), estudando a produção de EPS a partir de bactérias diazotróficas cultivadas em meios à base de glicerol residual, salientou que micro-organismos que apresentaram baixa produção de EPS apresentaram uma elevada produção de biomassa.

Observa-se claramente na Tabela 10 que, com o aumento da concentração do EL, do cultivo 1 ao 3, o crescimento microbiano aumentou, enquanto a produção de polissacarídeo reduziu. Gorret et al. (2001), ao estudarem os efeitos da temperatura, pH e EL no crescimento e produção de EPS por *Propionibacterium acidipropionici* em microfiltrado de leite usando metodologia de superfície de resposta, concluíram que o crescimento do micro-organismo também aumentou com o aumento da concentração de EL. Sethi, Mohanty e Pattanayak (2019), ao analisarem o efeito da fonte de nitrogênio no crescimento e produção de EPS de espécies de *Rhizobium* isoladas de nódulos radiculares de Guandu (*Cajanus cajan*) em cultura *in vitro*, observaram um decréscimo da produção de EPS com o aumento da concentração de glicina, fonte de nitrogênio.

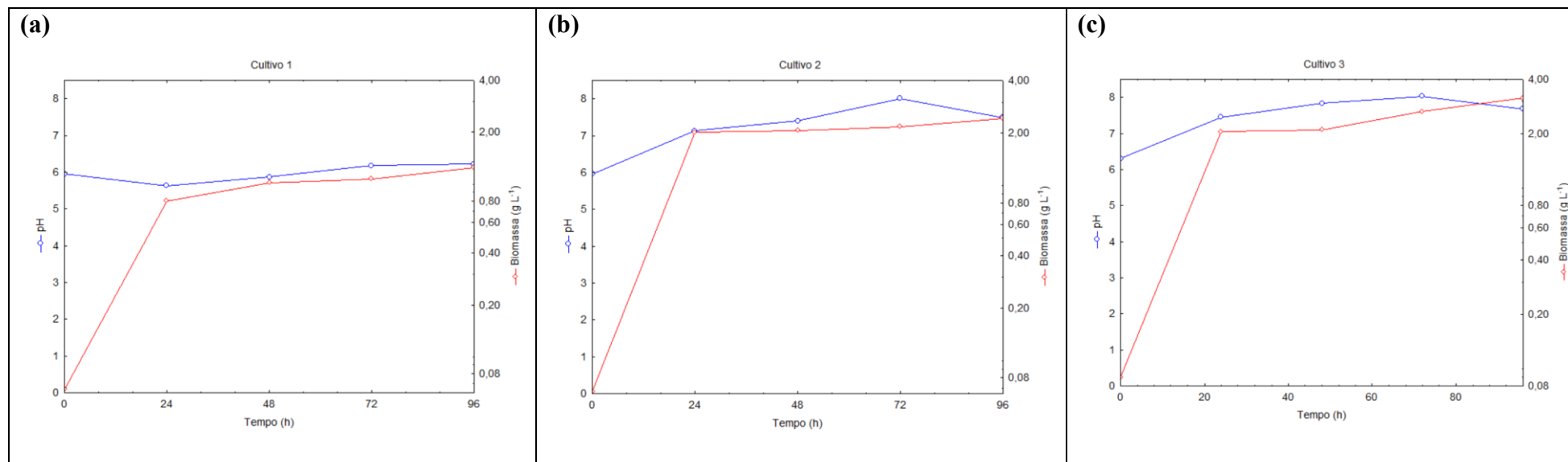
O fato do cultivo 1 não ter apresentado concentrações de EPS superiores às encontradas nos pontos centrais do planejamento experimental PB pode estar relacionado com a razão C/N do meio de cultivo não ter sido a ideal. A chamada razão C/N é o parâmetro que relaciona as quantidades exatas de carbono e nitrogênio nos meios de cultivo. Alguns estudos explicam que provavelmente a disponibilidade de carbono concomitante com a limitação de nitrogênio favorece a produção de EPS microbianos, pois sob condições limitadoras de crescimento os micro-organismos acabam destinando a quantidade extra de carbono para a produção de polissacarídeos (FREITAS; ALVES; REIS, 2011; FREITAS; TORRES; REIS, 2017). Assim, segundo a literatura, o acúmulo de polissacarídeos é favorecido por uma elevada razão C/N. Trindade (2018), ao estudar diferentes razões C/N na produção de EPS por *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 com PS como substrato, alcançou 9,46 g L⁻¹ de EPS, resultado superior a maior quantidade de EPS encontrada nesse estudo (6,92 g L⁻¹).

Entretanto, apesar de uma redução de 19,6% na concentração de EPS ao comparar com os pontos centrais do PB, conseguiu-se uma potencial redução de custos, pela eliminação de 3 constituintes do meio e redução do consumo de energia no processo, pela temperatura e agitação.

O fator de conversão de biomassa em EPS no cultivo 1 demonstrou ser significativamente maior em relação aos demais cultivos, sendo o fator de conversão ($Y_{P/X}$) igual a 5,84. Esse valor se aproxima muito ao encontrado por Ribeiro (2015), produzindo EPS também de *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 em meio à base de glicerol residual com razão C/N 94, avaliada em seus estudos como a melhor razão C/N para o processo, obtendo 6,44 g L⁻¹ de EPS e um fator $Y_{P/X}$ igual a 5,28.

Os parâmetros de produtividade de todos os cultivos apresentaram respostas significativamente diferentes, demonstrando o quanto uma condição de cultivo pode influenciar a resposta desejada. Sendo assim, os resultados ressaltam que o estudo de diferentes variáveis em relação a um cultivo microbiano por meio de planejamentos estatísticos é de extrema importância para otimizar e maximizar os processos.

Durante os cultivos, foi medido o pH do meio e determinou-se a biomassa a cada 24 h. A cinética dos cultivos está representada na Figura 6. A figura evidencia o aumento de biomassa ao aumentar a concentração de EL, como já discutido. A curva cinética referente à biomassa acentua-se em uma ordem crescente do cultivo 1 (Figura 6a) para o cultivo 3 (Figura 6c).

Figura 6 – Acompanhamento do pH e biomassa dos cultivos (a) 1 (b) 2 e (c) 3.

Como apresentado na Figura 6, o cultivo 1, que teve um menor crescimento de biomassa, foi o que mostrou menor variação de pH, mantendo-se praticamente estável, e os cultivo 2 (Figura 6b) e 3 (Figura 6c), com maior crescimento de biomassa, demonstraram aumento do pH até alcançar um pH próximo de 8 em 72 h, com leve queda em 96 h. Oliveira, Michelon e Burkert (2020) encontraram resultados muito semelhantes ao monitorar o pH de culturas de bactérias diazotróficas que utilizavam melão de soja como substrato. Ao final de 96 h de cultivo observaram que o pH permaneceu entre 7,5 para *R. haultense* SEMIA 6450 e *E. meliloti* SEMIA 135, e 7,9 para a *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816. Uma relação importante de ser observada é que o cultivo 1, de menor variação do pH e menor concentração de biomassa, foi o que resultou na maior produção de EPS, como apresentado na Tabela 10. O efeito do pH na produção do EPS depende das condições de cultivo e da espécie de micro-organismo. Liu et al. (2017) afirmam que para micro-organismos endofíticos, como a bactéria *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816, o pH neutro ou ligeiramente ácido favorece a produção de EPS, o que está de acordo com o cultivo 1, que manteve seu pH nessa faixa e produziu a maior quantidade de biopolímero dentre os cultivos testados.

6 CONCLUSÃO

O planejamento experimental de Plackett-Burman (PB) demonstrou que as condições de cultivo como a composição do meio e algumas condições operacionais afetam diretamente à produção de EPS, assim como o crescimento microbiano, sendo as concentrações de permeado de soro de queijo (PS) (fonte de carbono) e extrato de levedura (EL) (fonte de nitrogênio) de grande influência. Isso comprova que utilizar planejamentos experimentais para avaliar como os diferentes fatores impactam na resposta desejada é de extrema utilidade para conduzir experimentos futuros e, conseqüentemente, otimizar o processo, reduzindo custos e obtendo quantidades expressivas do produto.

Através do planejamento observou-se que a produção de EPS variou de 0 até 9,28 g L⁻¹, sendo que 10 variáveis apresentaram influência significativa ($p < 0,10$), impactando na concentração final do biopolímero. Essas variáveis, que apresentaram efeito significativo, foram em ordem de maior influência: PS (positivo), agitação (negativo), K₂HPO₄ (positivo), EL (negativo), MgSO₄.2H₂O (positivo), relação volume inicial do meio:volume do reator (V_i:V_R) (negativo), temperatura (negativo), pH (negativo), KH₂PO₄ (negativo) e CaCl₂.2H₂O (positivo).

Para a concentração de biomassa máxima, que variou de 0,6 a 7,15 g L⁻¹, 5 variáveis foram significativas: EL, MgSO₄.7H₂O, relação V_i:V_R, temperatura e PS. Dentre essas, a concentração de EL demonstrou maior influência e apresentou efeito oposto ao encontrado para a concentração de EPS.

Cultivos adicionais realizados com as condições indicadas no planejamento para a produção de EPS (40 g L⁻¹ de PS; 0 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,4 g L⁻¹ de EL; 0,2 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,4 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,3 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; pH 6,5; agitação de 100 rpm; V_i:V_R de 0,15:1 e temperatura de 25 °C), com modificações apenas nas concentrações de EL, comprovaram os resultados encontrados no planejamento PB, sendo que o aumento da concentração de EL levou a um maior crescimento microbiano (1,25, 2,43 e 3,14 g L⁻¹, respectivamente) e menor produção de EPS (6,92, 3,15 e 0,75 g L⁻¹, respectivamente), ao utilizar 0,4, 2,2 e 4,0 g L⁻¹ de EL, sendo essa produção de EPS 19,6% inferior ao alcançado no PB.

Dentre todas as condições testadas no presente estudo, a que resultou em concentração mais expressiva de EPS foi a condição correspondente aos dos pontos centrais do planejamento

experimental PB. Sendo assim, as melhores condições para a produção do biopolímero correspondem a: 0,1 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,4 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g L⁻¹ de NaCl; 2,2 g L⁻¹ de EL; 0,12 g L⁻¹ de MnCl₂.4H₂O; 0,15 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 25 g L⁻¹ de PS; pH inicial 7,0; agitação de 150 rpm; relação V_i:V_R de 0,2:1 e temperatura de 30 °C, alcançando em média 8,61 g L⁻¹ de EPS em 96 h e 3,04 g L⁻¹ de biomassa máxima em 72 h.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Definir novos planejamentos sequenciais com novas faixas de estudo das variáveis visando maximizar a produção de exopolissacarídeos (EPS) por *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816 em frascos agitados;
- Estudar o efeito da razão C/N na produção de EPS por *Mesorhizobium* sp. SEMIA 816.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, I. M. C. **Otimização da síntese de biodiesel de óleo de sementes de graviola**. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.
- ALMEIDA, K. N.; ALVIM, T. C.; SOUZA, A. R. M.; LACERDA, G. E.; ALVIM, F. A. L. S.; ALVIM, J. C. Hidrólise enzimática da lactose de permeado de soro de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 55-63, mar/abr. 2015.
- AOAC, **Official Methods of Analysis**, 17th ed. Washington, DC. Association of Official Analytical Chemists, 2000. CD-ROM.
- ASSUNÇÃO, G. M. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2014.
- 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, n. 1, p. 29-42, jun. 2004.
- BARRETO, M. C. S.; FIQUEIREDO, 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 Agrociência**, v. 17, n. 2-4, p. 221-227, 2011.
- BOMFETI, C. A.; FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; CARDOSO, P. G.; GUERREIRO, M. C.; MOREIRA, F. M. S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 35, n. 3, p. 657-671, jun. 2011.
- CASTELLANE, T. C. L.; CAMPANHARO, J. C.; COLNAGO, L. A.; COUTINHO, L. 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, out. 2007.
- DEVI, S. E.; VIJAYENDRA, S. V. N.; SHAMALA, T. R. Exploration of rice bran, an agro-industry residue, for the production of intra, extra cellular polymers by *Sinorhizobium meliloti* MTCC 100. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 80-84, 2012.
- DINIZ, P. F. A.; OLIVEIRA, L. E. M.; LOPES, N. A.; FLORENTINO, L. A.; CARVALHO, T. S.; MOREIRA, F. M. S. Bactérias diazotróficas em solos sob seringueira. **Revista Brasileira de Ciência e Solo**, v. 36, n. 5, p. 1426-1433, 2012.

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

EL-KHAIR, A. A. A. Formulation of milk permeate for utilization as electrolyte beverages. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 3, n. 2, p. 572-578, jan. 2009.

FENG, Y.-L.; LI, W.-Q.; WU, X.-Q.; CHENG, J.-W.; MA, S.-Y. Statistical optimization of media for mycelial growth and exo-polysaccharide production by *Lentinus edodes* and a kinetic model study of two growth morphologies. *Biochemical Engineering Journal*, v. 49, n. 1, p. 104–112, mar. 2010.

FERNÁNDES, C.; CARRACEDO, B.; MARTÍNEZ, E. J.; GÓMEZ, X.; MORÁN, A. Application of a packed bed reactor for the production of hydrogen from cheese whey permeate: Effect of organic loading rate. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 49, n. 2, p. 210-217, 2014.

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, dez. 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, n. 3, p. 297–305, 2010.

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

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

GONZÁLEZ, C. H. **Produção de exopolissacarídeos por rizóbios em meios de cultivo com coprodutos lácteos.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2019.

GORRET, N.; MAUBOIS, J. L.; ENGASSER, J. M.; GHOUL, M. Study of the effects of temperature, pH and yeast extract on growth and exopolysaccharides production by *Propionibacterium acidi-propionici* on milk microfiltrate using a response surface methodology. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, n. 5, p. 788–796, may 2001.

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

GRANDI, A. Z. **Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado de soro-fermento natural.** 56 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de

Alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, 2010.

GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 375–384, jun. 2010.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. *In: _____*. **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**, São Paulo, 2001, cap. 6, p. 93-121.

HUSSAIN, A.; ZIA, K. M.; TABASUM, S.; NOREEN, A.; ALI, M.; IQBAL, R.; ZUBER, M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: a review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 10–27, 2017.

JANCZAREK, M.; RACHWAL, K.; MARZEC, A.; GRZADZIEL, J.; -SZYSZ, M. P. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 94–113, 2015.

JOSHI, M.; PATEL, H.; GUPTE, S. Nutrient improvement for simultaneous production of exopolysaccharide and mycelial biomass by submerged cultivation of *Schizophyllum commune* AGMJ-1 using statistical optimization. **3 Biotech**, v. 3, n. 4, p. 307–318, 2013.

KIM, H. O.; LIM, J. M.; JOO, J. H.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 10, p. 1175-1182, jul. 2005.

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

LIU, C.; LIU, Y.; LIAO, W.; WEN, Z.; CHEN, S. Application of statistically-based experimental designs for the optimization of nisin production from whey. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 11, p. 877–882, 2003.

LIU, J.; WANG, X.; PU, H.; LIU, S.; KAN, J.; JIN, C. Recent advances in endophytic exopolysaccharides: production, structural characterization, physiological role and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 157 p. 1113- 1124, 2016.

LIU, R.–S.; TANG, Y.–J. Tuber *melanosporum* fermentation medium optimization by Plackett–Burman design coupled with Draper–Lin small composite design and desirability function. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 9, p. 3139–3146, 2010.

MACEDO, M. G.; LACROIX, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 5, p. 419–426, 2002.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers**, v. 9, n. 2, p. 627– 634, 2013.

MAJUMDER, A.; SINGH, A.; GOYAL, A. Application of response surface methodology for glucan production from *Leuconostoc dextranicum* and its structural characterization. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 150–156, 2009.

MARCHIORO, L. E. T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2005.

MESOMO, M.C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo**. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2007.

MISHRA, A.; JHA, B. Microbial exopolysaccharides. *In*: Rosenberg E., DeLong, E.F., THOMPSON, F., LORY, S., STACKEBRANDT, E. (Eds.), **The Prokaryotes – Applied Bacteriology and Biotechnology**. Springer: Berlin, Heidelberg, 2013, p. 179-192.

MONTEIRO, N. K. **Caracterização estrutural de polissacarídeos produzidos por bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium***. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011.

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERIO, 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, n. 4, p. 705-708, jan. 2012.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico da qualidade**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004. 513 p.

MOSCOVICI, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, article 2012, set. 2015.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

NWODO, U.; GREEN, E.; OKOH, A. Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 14002-14015, 2012.

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

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

OLIVEIRA, J. M.; MICHELON, M.; BURKERT, C. A. V. Biotechnological potential of soybean molasses for the production of extracellular polymers by diazotrophic bacteria. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, 101609, may 2020.

PAULO, E. M.; BOFFO, E. F.; BRANCO, A.; VALENTE, A. M. M. P.; MELO, I. S.; FERREIRA, A. G.; ROQUE, M. R. A.; ASSIS, S. A. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 2, p. 495-508, jun. 2012.

PÉREZ-RAMOS, A.; NÁCHER-VÁQUEZ, M.; NOTARARIGO, S.; LÓPEZ, P.; MOHEDANO, L. Current and future applications of bacterial extracellular polysaccharides. *In: _____*. **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**, 2016, cap. 22, p. 329-344.

PHILIPPINI, R. R. **Produção de exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas**. 133 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

PIGHINELLI, A. L. M. T. **Extração mecânica de óleos de amendoim e de girassol para produção de biodiesel via catálise básica**. 80 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

POKHREL, C.P.; OHGA, S. Cattle bedding waste used as a substrate in the cultivation of *Agaricus blazei* Murill. **Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University**, v. 52, p. 295-298, 2007.

QURESHI, N.; FRIEDL, A.; MADDOX, I. S. Butanol production from concentrated lactose/whey permeate: use of pervaporation membrane to recover and concentrate product. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 9859–9867, oct. 2014.

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, aug. 2012.

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

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de Processos**. 2 ed. Campinas: Casa de Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 358 p.

RUSSO, J. F. S. **Permeado de soro de queijo e suas aplicações: um futuro promissor**, 22 jan. 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: 08 set. 2019.

SANDRI, J. P.; PRADO, M. V.; ANDRADE, K.; LUCAS, M. S.; MIOTTO, I.; PAVAN, L.; ASSUNÇÃO, G. M.; HASAN, S. D. M.; FIORESE, M. L. Hidrólise enzimática do permeado de soro de queijo de queijo. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 613-617, dez. 2014.

SANTOS, A. A. **Produção de polissacarídeos visando obter insumos biológicos de interesse para a agricultura**. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SAYYED, R.; JAMADAR, D.; PATEL, P. Production of exo-polysaccharide by *Rhizobium* sp. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 294-300, jan. 2011.

SCHEPERS, A. W.; THIBAUT, J.; LACROIX, C. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: model and experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 324-337, feb. 2006.

SEESURIYACHAN, P.; KUNTIYA, A.; HANMOUNGJAI, P.; TECHAPUN, C.; CHAIYASO, T.; LEKSAWASDI, N. Optimization of exopolysaccharide overproduction by *Lactobacillus confusus* in solid state fermentation under high salinity stress. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 5, p. 912-917, may 2012.

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

SENGUPTA, D.; DATTA, S.; BISWAS, D. Towards a better production of bacterial exopolysaccharides by controlling genetic as well as physico-chemical parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 4, p. 1587-1598, jan. 2018.

SERRATO, R. V. **Caracterização química e estrutural de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos produzidos por bactérias diazotróficas endofíticas**. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2008.

SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M. Culture conditions for the production of an acidic exopolysaccharide by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 489-493, 2006.

SERRATO, R. V.; MENESES, C. H.S.G.; VIDAL, M. S.; SANTANA -FILHO, A. P.; IACOMINI, M.; SASSAKI, G. L.; BALDANI, J. I. Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n.1, p. 1153-1159, 2013.

SETHI, D.; MOHANTY, S.; PATTANAYAK, S. K. Effect of different carbon, nitrogen and vitamine sources on exopolysaccharide production of *Rhizobium* species isolated from root nodule of redgram. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 56, p. 86-93, feb. 2019.

SHARMA, K.; SHARMA, N.; SHARMA, R. A Study on optimization of exopolysaccharides from a potential *Lactobacillus casei* KL14 KX774469. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 3410-3418, feb. 2018.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 85-92, feb. 2006.

SILVEIRA, W. B. **Produção de etanol em permeado de soro de queijo de queijo por *Kluyveromyces marxianus* UFV-3**. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SOUSA, P. M. **Otimização do processo de produção de células das estirpes de *Bradyrhizobium* INPA 3-11 e UFLA 3-84, inoculantes do feijão-caupi**. 141 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

SPIER, F. **Produção de lipídios microbianos a partir de glicerol bruto gerado na síntese de biodiesel**. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

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

STOLIAR, M. U.S. whey ingredients in bakery products. Monografia - **U.S. Dairy Export Council**, Arlington, 2009, 8 p.

SU, C.; CHI, Z.; LU, W. Optimization of medium and cultivation conditions for enhanced exopolysaccharide yield by marine *Cyanothece* sp. 113*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 25, n. 4, p. 411-417, 2007.

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

TERRAZAS, W. D. M. **Fatores que influenciam a produção de biomassa e glicerol quinase pela levedura recombinante *Pichia pastoris***. 128 f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2012.

TORRES, C. A. V.; MARQUES, R.; FERREIRA, A. R. V.; ANTUNES, S.; GRANDFILS, C.; FREITAS, F.; REIS, M. A. M. Impact of glycerol and nitrogen concentration on *Enterobacter* A47 growth and exopolysaccharide production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 81-86, nov. 2014.

TRIGUEROS, D. E. G.; FIORESE, M. L.; KROUMOV, A. D.; HINTERHOLZ, C. L., NADAI, B. L.; ASSUNÇÃO, G. M. Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of

hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 71–83, jun. 2016.

TRINDADE, R. A. **Bioconversão do permeado de soro de queijo em ácido láctico e exopolissacarídeos por bactérias**. 303 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2018.

ZACARCHENCO, P. B.; DENDER, A. G. F. V.; SPADOTI, L. M.; GALLINA, D. A.; TRENTO, F. K. H. S.; ALVES, A. T. S. Permeado de soro de queijo. **Revista Leite & Derivados**, n. 131. p. 48-52, jan./fev. 2012.

ZEMPULSKI, D. A. **Produção de ácidos graxos voláteis por fermentação anaeróbia de manipueira e de permeado de soro de queijo**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2013.

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

APÊNDICE**APÊNDICE A: Curva de calibração da biomassa da bactéria *Mesorhizobium* sp. SEMIA****816**