

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

Clerison Wagner Nascimento

**APROVEITAMENTO DO PERMEADO DE SORO OBTIDO POR OSMOSE
REVERSA COMO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULA
POR *Pseudomonas* spp.**

Juiz de Fora

2024

Clerison Wagner Nascimento

**APROVEITAMENTO DO PERMEADO DE SORO OBTIDO POR OSMOSE
REVERSA COMO MEIO DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE BIOMOLÉCULA
POR *Pseudomonas* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Otenio
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mirian Pereira Rodarte

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nascimento, Clerison Wagner.

Aproveitamento do permeado de soro obtido por osmose reversa como meio de cultivo para produção de biomolécula por *Pseudomonas* spp. / Clerison Wagner Nascimento. -- 2024.
96 p. : il.

Orientador: Marcelo Henrique Otenio

Coorientadora: Mirian Pereira Rodarte

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2024.

1. Osmose reversa. 2. Permeado. 3. *Pseudomonas* spp.. I. Otenio, Marcelo Henrique, orient. II. Rodarte, Mirian Pereira, coorient. III. Título.

Clérison Wagner Nascimento

Aproveitamento do permeado de soro obtido por osmose reversa como meio de cultivo para produção de biomoléculas por *Pseudomonas* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 27 de março de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Henrique Otenio - Orientador
Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Elis Marina Turini Claro
UNOESTE - Medicina Jaú

Juiz de Fora, 14/03/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Henrique Otenio, Usuário Externo**, em 29/09/2025, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mirian Pereira Rodarte, Professor(a)**, em 29/09/2025, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Moreira Hungaro, Professor(a)**, em 29/09/2025, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elis Marina Turini Claro, Usuário Externo**, em 29/09/2025, às 20:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1751103** e o código CRC **0892F85A**.

Dedicado à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados pela oportunidade de realização deste curso.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Leite pelo apoio dado e recursos disponibilizados.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia do Rumem da Embrapa Gado de Leite com que trabalhei e tanto me ajudaram Júnior César Fernandes Lima, Larice Aparecida Rezende Santana, Guilherme Henrique da Silva, Larissa de Souza Araujo, Nayara Felga Santos, Camila Branda Reis.

Ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes pelo apoio e recursos disponibilizados.

À professora Gisela Machado, Taline Amorim Santos, Daiana Aparecida Cardoso, por todo tempo e auxílio disponibilizado.

Ao meu orientador, Marcelo Henrique Otenio, por toda dedicação, sabedoria, paciência dispensada nesta jornada.

À Deus, por me dar força e saúde durante essa empreitada em superar as adversidades.

RESUMO

O permeado de soro de leite é um subproduto singular que contém moléculas orgânicas com grande potencial poluidor, quando não tratado de forma adequada. Sua origem se dá no processo de separação por membranas que segrega a parte proteica do soro, denominada como retentado. De forma secundária, é gerado o permeado, um subproduto de baixo valor comercial. O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento de diferentes cepas de *Pseudomonas* spp. em permeado de soro de leite obtido por osmose reversa (OR), suplementado ou não com sais minerais, bem como determinar o perfil de metabólitos produzidos ao longo do tempo de incubação a fim de obter compostos de interesse biotecnológico. Foram utilizadas quatro estirpes de *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas aeruginosa* LBI (Laboratório de Biotecnologia Industrial); *Pseudomonas putida* CCMI 852 (Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais) e dois microrganismos isolados de uma planta de concentração de soro denominados (IBPCS) IBPCS 09 e IBPCS 14 e identificados presuntivamente como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp). As bactérias foram testadas quanto à capacidade de crescimento em permeado de soro de leite obtido por OR seguido da verificação qualitativa e quantitativa da formação de metabólitos. A avaliação do crescimento celular ocorreu por leitura da densidade ótica na faixa de 600nm (DO 600nm) em espectrofotômetro. As leituras espectrofotométricas demonstraram ao final de 72 horas o desenvolvimento de massa celular nos cultivos em permeado. A DO 600nm inicial de 0,8 foi ampliada para 1.288, 1.305, 2.210 e 2.454 respectivamente pelos microrganismos IBPCS 09, IBPCS14, *Pseudomonas putida* CCMI 852 e *Pseudomonas aeruginosa* LBI. A avaliação do potencial de obtenção de metabólitos de interesse biotecnológico demonstrou concentrações de 0,621 mg.mL⁻¹ de ácidos cítrico, 12,151 mg.mL⁻¹ de ácido isocítrico, 0,246 mg.mL⁻¹ de ácido fórmico além de 0,558 mg.mL⁻¹ de lactulose nas amostras de sobrenadante resultante do cultivo. O permeado de soro obtido por osmose reversa se mostrou um meio de cultivo eficiente para o crescimento dos microrganismos utilizados neste estudo, além de apresentar potencial para aplicação em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: osmose reversa; permeado; *Pseudomonas* spp.

ABSTRACT

Whey permeate is a unique by-product that contains organic molecules with high polluting potential when not treated properly. It originates from the membrane separation process that segregates the protein part of whey, called retentate. Secondly, permeate is generated, a by-product of low commercial value. The objective of the study was to evaluate the growth of different strains of *Pseudomonas* spp. in whey permeate obtained by reverse osmosis (RO), supplemented or not with mineral salts, as well as to determine the profile of metabolites produced over the incubation period in order to obtain compounds of biotechnological interest. Four strains of *Pseudomonas* spp. were used: *Pseudomonas aeruginosa* LBI (Industrial Biotechnology Laboratory); *Pseudomonas putida* CCMI 852 (Industrial Microorganism Culture Collection) and two microorganisms isolated from a whey concentration plant called (IBPCS) IBPCS 09 and IBPCS 14, presumptively identified as belonging to the genus *Pseudomonas* spp. The bacteria were tested for their ability to grow in whey permeate obtained by OR, followed by qualitative and quantitative verification of metabolite formation. Cell growth was evaluated by optical density in the 600 nm range (OD 600 nm) using a spectrophotometer. Spectrophotometric readings showed the development of cell mass in the permeate cultures after 72 hours. The initial OD 600 nm of 0.8 contained in the medium was increased to 1.288, 1.305, 2.210, and 2.454, respectively, by the microorganisms IBPCS 09, IBPCS14, *Pseudomonas putida* CCMI 852, and *Pseudomonas aeruginosa* LBI. The evaluation of the potential for obtaining metabolites of biotechnological interest showed concentrations of 0.621 mg.mL⁻¹ of citric acid, 12.151 mg.mL⁻¹ of isocitric acid, 0.246 mg.mL⁻¹ of formic acid, and 0.558 mg. mL⁻¹ of lactulose in the supernatant samples resulting from the culture. The serum permeate obtained by reverse osmosis proved to be an efficient culture medium for the growth of the microorganisms used in this study, in addition to showing potential for application in biotechnological processes.

Keywords: reverse osmosis; permeate; *Pseudomonas* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Membrana tipo espiral OR	16
Figura 2 - Biofilme em válvula pneumática	29
Figura 3 - Esquema de cultivo microbiano	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição meio mineral S.R.....	34
Tabela 2 - Composição meio mineral sais B.H	35
Tabela 3 – (%) Sólidos totais, fixos e voláteis proteína total e nitrogênio total.....	38
Tabela 4 - Diferenciação por técnica de Gram das colônias IBPCS crescidas em meio BHI	40
Tabela 5 - Teste de catalase e oxidase das colônias IBPCS crescidas em BHI	41
Tabela 6 - Seleção dos microrganismos IBPCS por meio da metabolização do citrato em meio específico	42
Tabela 7 - Seleção dos microrganismos IBPCS em meio SIM	43
Tabela 8 – Constituintes do permeado de soro de leite obtido por osmose reversa não suplementado	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de crescimento em permeado de osmose reversa não suplementado a 30°C sob agitação (150 rpm) em 72 horas microrganismos IBPCS 09, 14, 20 e 41.....	45
Gráfico 2 - Curva de crescimento em permeado não suplementado a 30°C sob agitação (150 rpm) por 72 horas microrganismos IBPCS 09, 14, <i>P. putida</i> CCM 852 e <i>P. aeruginosa</i> LBI.....	47
Gráfico 3 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR não suplementado.....	51
Gráfico 4 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Robert	52
Gráfico 5 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Robert	53
Gráfico 6 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% Sais de Bushnell-Haas	54
Gráfico 7 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Bushnell-Haas	55
Gráfico 8 – Produção de metabólitos bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR não suplementado	57
Gráfico 9 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Robert	58
Gráfico 10 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado em 50% de sais de Robert	59
Gráfico 11 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Busnhell-Haas	60

Gráfico 12 - Produção de metabólitos Bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Bushnell-Haas	61
Gráfico 13 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR não suplementado	63
Gráfico 14 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Robert	64
Gráfico 15 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Robert	65
Gráfico 16 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Busnhell- Haas	66
Gráfico 17 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas putida</i> CCMI852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Busnhell- Haas	67
Gráfico 18 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR não suplementado	69
Gráfico 19 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Robert	70
Gráfico 20 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Robert	71
Gráfico 21 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Busnhell-Haas	72
Gráfico 22 - Produção de metabólitos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Busnhell-Haas	73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 TECNOLOGIA DE MEMBRANAS NA INDÚSTRIA DE LÁCTEOS	15
2.2 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DO PERMEADO DO LEITE E DO SORO DE LEITE	18
3. OBJETIVOS	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PERMEADO DE SORO DE LEITE OBTIDO POR OSMOSE REVERSA.....	25
4.1.1 Determinação do pH.....	25
4.1.2 Determinação de acidez e alcalinidade	26
4.1.3 Determinação de proteína.....	26
4.1.4 Determinação de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF).....	26
4.1.5 Determinação da composição açúcares e ácidos orgânicos por cromatografia	27
4.2 COLETA DE AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS	29
4.2.1 Isolamento em meio seletivo e coloração de Gram	30
4.2.2 Teste bioquímico	30
4.2.3 Seleção dos microrganismos	32
4.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO APÓS PREPARO DOS MEIOS	32
4.3.1 Preparação do permeado de soro de leite	33
4.3.2 Preparação do meio mineral mínimo de sais de Robert (SR).....	34
4.3.3 Preparação do meio mineral mínimo de sais de Bushnell-Haas (BH)	35
4.3.4 Preparação do permeado de soro de leite suplementado	35
4.3.5 Inoculação, crescimento dos microrganismos selecionados e coleta de sobrenadante para análise cromatográfica.....	36
4.3.6 Comparação do crescimento em permeado sem suplementação dos IBPCS 09 e IBPCS 14 com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI e <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852.....	37
5 DISCUSSÃO E RESULTADOS.....	37
5.1 CARACTERÍSTICAS DO PERMEADO DE OSMOSE REVERSA.....	37
5.1.1 Isolamento e seleção de bactérias do grupo <i>Pseudomonas</i> spp.	39
5.1.2 Avaliação da capacidade de crescimento dos microrganismos selecionados em permeado de soro por osmose reversa	44

5.2 COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE CRESCIMENTO EM PERMEADO SEM SUPLEMENTAÇÃO ENTRE OS MICRORGANISMOS IBPCS 09, IBPCS 14 COM <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI E <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852.	45
5.2.1 Avaliação dos constituintes presentes no permeado de osmose reversa não suplementado.....	49
5.2.2 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo da bactéria IBPCS14 com permeado de soro de leite obtido por osmose reversa suplementado e não suplementado.....	50
5.2.3 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo da bactéria IBPCS09 com permeado de soro de leite obtido por osmose reversa suplementado e não suplementado.	56
5.2.4 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852 com permeado não suplementado e suplementado.....	63
5.2.5 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI com permeado não suplementado e suplementado.	69
6 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES.....	87

1. INTRODUÇÃO

O processo de separação por membranas é uma técnica de filtração baseada no uso de membranas semipermeáveis para separar componentes de uma mistura, geralmente líquidos, com base em suas propriedades físicas ou químicas, como tamanho de moléculas, carga elétrica ou solubilidade de seus constituintes.

Na indústria láctea, essa tecnologia tem sido aplicada sob diversas óticas, desde a padronização do teor de proteína do leite e do soro de leite destinados à fabricação de produtos lácteos ou mesmo como ferramenta para remoção de matéria orgânica dos efluentes gerados devido à capacidade de retenção dessas membranas que permite a remoção de grande parte das proteínas, gorduras e carboidratos presentes nos efluentes. Isso reduz os níveis de DBO (demanda bioquímica de oxigênio), melhora a qualidade da água e permite seu reuso nos processos industriais diminuindo o consumo e o impacto ambiental.

Em fábricas voltadas para a produção de queijos é comum que a tecnologia de filtração por membranas atue com o objetivo promover a separação e concentração de proteínas contida no leite ou no soro de leite. Durante o processo de filtração do soro ou do leite ocorre, a segregação da parte nobre do fluido filtrado que passa a ser denominado como retentado ou concentrado. Esse é usado como matéria prima em diferentes formulações. Entretanto, de forma secundária é formado o permeado.

O tipo fluido a ser processado no equipamento, a técnica de filtração utilizada (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração, osmose reversa), a concentração de sólidos iniciais presentes no líquido, o tipo de membrana, a pressão e temperatura de trabalho constituem um conjunto de fatores que podem influenciar a composição média do concentrado e do permeado gerado. Dessa forma, a composição do permeado pode não ter valor de mercado agregado ao término do beneficiamento e assim tornar-se um produto que a indústria de laticínios brasileira disponibiliza para a alimentação animal ou destina a aterros sanitários sob altos custos.

Entretanto, essas formas de alocação são consideradas anacrônicas, pois estão em desconforto com as atuais premissas de sustentabilidade que preconiza o aproveitamento máximo de tudo que é gerado em um processo produtivo na indústria de alimentos. A indústria queijeira possui grande potencial para a geração de soro de

leite, um subproduto formado numa proporção de 9 litros para cada kg de queijo processado.

Várias indústrias ao longo dos anos têm tratado o soro remanescente da produção de queijo pelo processo de separação por membras devido a possibilidade de recuperação das soroproteínas nele contido, de alto valor comercial e pela capacidade de reduzir o potencial poluidor do soro. Contudo, o permeado de soro de leite, resíduo remanescente do processo de concentração por membranas constitui-se em um subproduto singular por arrastar moléculas orgânicas em quantidades suficientes para ocasionar problemas ambientais quando esse não sofre destinação adequada. Uma alternativa de aplicação racional do permeado de soro de leite seria sua utilização como fonte de carbono em meio destinado ao cultivo de microrganismos produtores de biocompostos.

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade de microrganismos, em metabolizar resíduos agroindustriais para a produção de biomoléculas. Microrganismos da espécie *Actinobacillus succinogenes* foram cultivados em permeado de soro delactosado apresentando ao final do processo de fermentação a formação de ácido succínico. Cultivos em permeado de soro com microrganismos da espécie *Komagataeibacter xylinus* demonstraram a capacidade dessa bactéria em sintetizar celulose bacteriana.

Microrganismos do gênero *Pseudomonas* são muito utilizados em pesquisas que aplicam de soro como fonte de carbono em meio de cultivo bacterianos para a formação biomoléculas como polihidrixialcanoatos (PHA), ácido lactobiônico, bacteriocina azurina, ramnolipídeo entre outros. A versatilidade, robustez metabólica e fisiológica, além da característica ubíqua de crescimento, justifica sua utilização em estudos molecular de bioprospecção.

Nesse sentido, a presente pesquisa busca uma melhor destinação ao permeado de soro de leite obtido por osmose reversa utilizando-o como meio de cultivo para proliferação de microrganismos do gênero *Pseudomonas* spp. com objetivo de observar sua capacidade de desenvolvimento assim como também capacidade de formação dos metabólitos de interesse industrial. Os resultados obtidos neste projeto poderão contribuir para uma aplicação racional dos resíduos lácteos auxiliando na redução do potencial poluidor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TECNOLOGIA DE MEMBRANAS NA INDÚSTRIA DE LÁCTEOS

A indústria de laticínios destaca-se na geração de resíduos, principalmente soro de leite oriundo da fabricação de queijos. Com volume situado em torno de 190 milhões de toneladas ao ano, o soro de leite se configura como o resíduo responsável pela maior carga poluidora no setor lácteo (MANO *et al.* 2019). Por outro lado, como detém substâncias de elevado valor nutricional é comum que a indústria faça uso desse potencial (GUPTA, 2017). As proteínas encontradas no soro, contém propriedades biológicas de excelência como emulsificação, gelificação e formação de espuma que propicia diversas aplicações tecnológicas. Sua utilização como suplemento alimentar, como ingrediente de preparações lácteas, como base para produção de bebidas termogênicas, produção de etanol, entre outros, são exemplos de reuso do soro de leite (ILTCHENCO, 2018). Atualmente, diversas técnicas de tratamento estão em prática para o reaproveitamento do soro e demais resíduos lácteos, possibilitando o reuso destes constituintes de forma racional.

A tecnologia de separação por membranas está presente na indústria de laticínios desde a década de 1970. O emprego de membranas sintéticas como barreira seletiva, permite segregar substâncias presentes no leite e soro. Pode também ser utilizado no processo de tratamento dos efluentes gerados na indústria durante o beneficiamento do leite. O processo tem grande importância, pois, promove de forma eficaz a separação, a concentração e a purificação de compostos em meio aquoso permitindo um maior aproveitamento da matéria prima e dos recursos hídricos utilizados pela indústria láctea (GOMES; GALVÃO, 2015; Tetra Park, 2019; MOSSMANN, 2020).

As técnicas de separação por membranas, comumente aplicadas na indústria de laticínios são: osmose reversa (OR), nanofiltração (NF), ultrafiltração (UF) e microfiltração (MF). Nesses processos, o leite ou soro de leite são bombeados sob pressão sendo forçados a transpassar um conjunto de membranas específicas para cada modelo de equipamento que por serem distintas entre si geram produtos diferentes, com finalidades específicas e ao mesmo tempo reduzindo a carga orgânica dos resíduos gerados (DE MOURA BELL, 2018; Tetra Park, 2019).

O processo UF, normalmente é utilizado para concentração de proteínas do leite e do soro de leite a fim de obter uma padronização do teor de proteínas durante a fabricação de queijos e iogurtes. A NF realiza a dessalinização parcial do leite, soro de leite, do permeado ou do retentado proveniente de outro processo de separação por membranas. Já a OR tem aplicação no processo de desidratação de leite, do soro de leite e permeado oriundo da UF. O processo de MF é usado principalmente para a redução de bactérias no leite desnatado, soro de leite e salmoura, mas também para desengordurar o soro de leite destinado à produção de concentrado proteico de soro de leite (WPC) e para o fracionamento de proteínas. Tais tecnologias vêm sendo aplicadas pela indústria lática com objetivo melhorar a qualidade e agregar valor ao leite e ao soro de leite (ILTCHENCO, 2018; Tetra Park, 2019).

Os equipamentos de separação podem ser construídos com diferentes módulos de filtração. Esses, diferem quanto a sua estrutura e geometria como nos modelos a placa e moldura e nos modelos tubulares e cerâmica. Os modelos enrolados em espiral são os mais aplicados no seguimento lácteo (Figura 1). As características de separação de um conjunto de membranas têm relação com o material de construção, com o seu processo de fabricação e com o tipo de moléculas que serão filtradas. Portanto, a distribuição e o tamanho dos poros das membranas (estreita ou larga), tipos de moléculas presente no fluido, condição de pressão exercidas na alimentação do sistema, temperatura de trabalho são fatores que interferem diretamente no resultado do processo de separação por membranas (Tetra Park, 2019).

Figura 1- Membrana tipo espiral OR



Fonte: do autor

O objetivo desse processo é a otimização e a recuperação das proteínas do leite e do soro. A parte obtida recebe o nome de retentado ou concentrado, seguido do nome do equipamento que o gerou UF, OR, NF ou MF. Esse produto é destinado como matéria prima para diversas preparações lácticas. O produto que passa pelas membranas durante a concentração é denominado como permeado e também recebe o nome do equipamento em que foi gerado sendo designado como permeado de UF, OR, NF ou MF (Tetra Park, 2019).

A composição do permeado sofre variações de composição devido à característica do equipamento utilizado para obtenção, ao modelo de membrana que compõe o sistema e às características do produto usado na alimentação, leite ou soro. JAHADI, EHSANI, PAIDARI (2018) demonstraram que o permeado de leite não homogeneizado produzido em sistema de ultrafiltração equipado com membrana em espiral de polissulfona com peso molecular de corte de 20.000 Daltons (Da) apresentou em sua composição 0,01% de proteínas totais.

BARILI et. al (2009) avaliou a composição do permeado obtido de um processo de concentração e soro de queijo num sistema de ultrafiltração de fluxo cruzado em escala laboratorial da marca (Ultran-Miniflex Whatman Suíça), equipado com membrana de ultrafiltração de polietersulfona hidrofílica com massa molecular de corte de 10.000 (Da) e área de membrana de 24 cm² que apresentou em sua composição 4,8% de matéria seca, 0,1% de lipídeos e 0,17% de proteínas.

O permeado obtido em processo de UF de soro de queijo, proveniente de equipamento dotado de membranas de polietersulfona em módulo de fibra oca com classificação MWCO 500 (kDa) fabricada pela Koch PM-500, apresentou teor de proteína de 2,47 g.L⁻¹ e lactose a 34,75 g.L⁻¹ (DE SOUZA et. al, 2010). Já o permeado de ultrafiltração, gerado em membranas de polietersulfona fabricada em modelo espiral enrolada com classificação MWCO 5–8 (kDa), marca (Koch HFM-131), apresentou em sua composição 0,93 g.L⁻¹ de proteínas e 33,76 g.L⁻¹ de lactose ao final do processo de UF (DE SOUZA et. al, 2010).

Membranas de polietersulfona em módulos de cassetes de classificação MWCO 5 (kDa) da marca (Millipore Pelicon XL 50) apresentou 0,81 g.L⁻¹ de proteínas e 33,19 g.L⁻¹ de lactose no permeado, após ser ultrafiltrado (DE SOUZA et. al, 2010). O permeado obtido pelo processo de MF dotado de membranas construídas em óxido de titânio em modelos tubular de sete canais com diâmetro nominal dos poros com 2

micrômetros da marca (Tami Industries Filtanium), apresentou em sua composição 6,10 g.L⁻¹ de proteínas e 46,83 g.L⁻¹ de lactose (DE SOUZA *et al.*, 2010).

O permeado obtido em um processo de ultrafiltração tangencial do soro proveniente da fabricação de queijos em membranas de celulose com tamanho de corte entre 10 e 30 (kDa) da marca (Millipore Pellicon® 3 Ultracel) apresentou um teor de proteínas residual na escala de 5,2 a 5,9 g.L⁻¹ respectivamente (BOSCO; CARLETTO; MARMO, 2018).

Vale destacar que o permeado pode ser um resíduo problemático por carregar consigo quantidade abundante de compostos orgânicos. Alguns trabalhos demonstram a presença de lactose em valores que atingem 50 kg por m³ com demanda química de oxigênio (DQO) de até 142.000 mg.L⁻¹ e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 182.000 mg.L⁻¹ o que pode trazer graves problemas ambientais quando descartado de forma inadequada (DE MOURA BELL, 2018; BOSCO; CARLETTO; MARMO, 2018; MENCHIK *et al.*, 2019).

O destino convencional para a maior parte do permeado gerado é a alimentação animal o que é de certo modo, inviável devido ao grande volume diário produzido, sem mencionar o desperdício de potencial. Pesquisas recentes apontam o permeado de soro de leite como fonte atraente para o desenvolvimento de diversos compostos, com diferentes funções e aplicações tanto na cadeia de processamento alimentar, como em outros seguimentos da indústria onde pode desempenhar funções estratégicas servindo de matéria prima para a geração de energia, produção de bioplásticos, insumos farmacêuticos, nutracêuticos, entre outros (MENCHIK *et al.*, 2019).

2.2 APLICAÇÃO INDUSTRIAL DO PERMEADO DO LEITE E DO SORO DE LEITE

Diversos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de aplicar o permeado de leite e do soro de leite de forma inovadora. O trabalho desenvolvido por BECKER e colaboradores (2021) propôs a utilização de permeado de soro de leite obtido por nanofiltração como base para produção de bebida esportiva. O produto obteve resultado sensorial positivo quando comparado ao produto controle se mostrou viável para o preparo de bebida isotônica, configurando-se como uma nova opção para reaproveitamento deste composto (BECKER *et al.*, 2021).

O permeado de soro de leite também foi usado para a obtenção de oligossacarídeos bioativos para a nutrição humana. Foi demonstrado que o produto contém oligossacarídeos do leite bovino semelhantes ao oligossacarídeo de leite humano e experimentos em escala industrial mostraram que a hidrólise enzimática da lactose, a fermentação por levedura e filtração por membrana maximizam a obtenção dos oligossacarídeos bioativos presentes no permeado de soro leite o que torna um produto antes considerado resíduo, atraente para a indústria ao promover sua aplicação na dieta humana como alimento funcional (DE MOURA BELL, 2018).

Outro estudo desenvolvido por RISNER e colaboradores (2020) descreve o uso do permeado de soro de leite para a obtenção de pineno, um composto orgânico da classe dos terpenos presente em pequenas concentrações na forma de metabólito de diversos vegetais. O uso de microrganismos recombinantes aplicados ao permeado ultrafiltrado de soro de leite é apontado pelo estudo como uma alternativa de custo reduzido e economicamente viável para a produção do pineno de origem microbiana. O trabalho caracterizou o permeado de soro de leite como um efluente da indústria de laticínios que apresenta valores de DBO e DQO elevados devido a presença de hidrocarbonetos e tem na conversão da lactose em moléculas orgânicas derivadas de unidades de isopreno (C_5H_8) conhecidas como terpenoides que uma redução de 75% da demanda total de oxigênio. Tal processamento combina ganhos ambientais com a obtenção de produtos de valor agregado, o que demonstra a importância da aplicação do permeado nos processos biotecnológicos o que contribui para viabilização da economia circular (RISNER *et al.*, 2020).

BOSCO, CARLETTO; MARMO, (2018) propuseram um estudo em escala laboratorial para a recuperação de proteínas do soro de leite pelo processo de ultrafiltração por membrana seguido da utilização da lactose presente no permeado em um processo de fermentação bacteriana onde o carboidrato foi utilizado como fonte de carbono para a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs). De acordo com os autores a presença de lactose, em valores médios próximos a 50 g.L^{-1} , qualifica o permeado de soro por ultrafiltração como elemento ideal a ser usado como fonte de fermentação por bactérias recombinantes para a produção de PHA devido à formação de 2 g.L^{-1} de biomassa contendo 60% de PHA e ao baixo custo para beneficiamento deste substrato.

Uma revisão bibliográfica realizada por ASUNIS *et al.*; (2020) discutiu a viabilidade de implementação de biorrefinarias para a produção de bioenergia e

moléculas bioativas a partir do permeado de soro de queijo e demais resíduos da indústria de laticínios. Os autores afirmam que técnicas de pré-tratamento baseados em procedimentos químicos, físicos e biológicos, aliados a processos biotecnológicos como a digestão anaeróbia, fermentação com produção de polímeros biológicos e sistemas bioeletroquímicos são essenciais para a geração rentável de bioenergia e commodities de origens bioquímicas como metano, hidrogênio, ácidos carboxílicos, bioplástico e etano por exemplo. Atualmente, o processo tem sido implantado de forma satisfatória por grandes indústrias lácticas europeias (ASSUNIS *et al.*, 2020).

O permeado de soro delactosado (PSD) foi objeto em um estudo realizado por BANGER *et al.*, (2021) que avaliou sua performance como meio fermentador em um processo de síntese de ácido succínico. O microrganismo de escolha foi o *Actinobacillus succinogenes*, espécie Gram negativa, capnofílica, anaeróbia facultativa. Procedeu-se diversas fermentações utilizando como meio padrão uma cultura comercial seguida das fermentações usando o PSD suplementados com peptona e bicarbonato. Como resultado foi detectado que o PSD se apresentou como um ótimo meio para a fermentação por *Actinobacillus succinogenes* com formação de 0,64g de ácido succínico/g de lactose, resultado semelhante ao produzido pela fermentação ocorrida nos meios específicos encontrados no mercado para a produção do ácido succínico o que demonstra que o PSD é um substrato adequado para a produção de ácidos com menor custo por ter como matéria prima um resíduo da indústria láctica.

KOLESOVS; SEMJONOV, (2021) realizaram uma revisão sobre a produção de celulose bacteriana (CB) a partir da fermentação do permeado de soro de leite por bactérias do ácido acético. Foi observado que a produção de CB em escala industrial ainda esbarra em questões de custo de aquisição dos meios de crescimento microbiano o que impede seu desenvolvimento e o uso de fontes de carbono de origem alternativa como o permeado de soro de leite para o desenvolvimento da biomassa se faz necessário. Os autores destacaram que poucos são os estudos que objetivou avaliar o permeado de soro de leite como um substrato alternativo para a produção de CB por meio da fermentação por cepas de bactérias do ácido acético e até o momento os melhores resultados alcançaram produção máxima de 5,4 g de CB por litro de meio no fermentador.

ROLLINI *et al.*, (2020) realizou um estudo cujo objetivo foi a obtenção de uma embalagem alimentar antimicrobiana ativa a partir da utilização do permeado do soro

de queijo como substrato para uma fermentação promovida por bactérias pertencentes ao gênero *Komagataeibacter xylinus* formadora de celulose bacteriana (CB), juntamente com a produção de uma classe de bacteriocina proveniente da fermentação do mesmo substrato pelo microrganismo *Lactobacillus sakei* denominada Sakacin-A. Os autores concluíram que o permeado de soro de queijo apresentou grande potencial ao atuar como um substrato, de baixo custo para a obtenção de moléculas bioativas envolvidas na produção da embalagem antimicrobiana ativa e a aplicação deste resíduo para a obtenção de um produto com valor agregado se enquadra como exemplo para o desenvolvimento da economia circular.

Sharma *et al.*, (2021) realizou um estudo que objetivou a formulação de um meio de cultura para a produção de plantaricina e ácido láctico via fermentação por *Lactobacillus plantarum* CRA52, utilizando o permeado de soro de leite como fonte de carbono seguido da adição de hidrolisado de proteína de soro de leite como fonte de nitrogênio para formular um meio de cultivo de baixo custo com bom rendimento. No estudo, os autores concluíram que os constituintes lácteos usados como fonte alternativa de carbono e nitrogênio auxiliaram na redução do custo do meio de cultivo além de promover bom rendimento na formação de ácido láctico e plantaricina quando comparados ao meio tradicional.

Um outro estudo propôs avaliar a elaboração de um meio de cultura de baixo custo, a partir de permeado de soro de leite suplementado com diferentes compostos nitrogenados e sais minerais com finalidade de permitir o desenvolvimento de cepas bacterianas do gênero *Lactobacillus salivarius* de origem aviária formador de biomassa probiótica. O estudo identificou que o meio composto permitiu o desenvolvimento dos microrganismos com melhor rendimento na formação de biomassa e com custo dose vezes menor quando comparado a outros meios (BERESVIL *et al.*, 2021).

O cultivo de microrganismos com potencial biotecnológico em resíduos industriais de baixo custo pode ser uma alternativa racional ao reduzir a carga poluidora dos rejeitos e agregar valor econômico por meio da geração de compostos de interesse industrial formados pela via metabólica de cepas microbianas específicas. Os microrganismos pertencentes ao grupo das *Pseudomonas* spp. podem ser aplicados como microrganismos de escolha para compor inóculo de um meio de cultivo destinado a formação de biomoléculas devido a sua capacidade de

crescimento ubíqua e da arquitetura distinta do seu metabolismo central de carbono que algumas de suas espécies possuem (NIKEL; DE LOURENZO, 2018).

Bactérias do grupo da *Pseudomonas* spp. têm sido usadas em diversos estudos com objetivo de geração de metabólitos. BOSE *et al.*, (2020) realizou um estudo que objetivou a produção de polihidroxialcanoato (PHA) a partir do cultivo em soro de queijo por uma bactéria que foi caracterizada com base nas sequências do gene 16S rRNA e identificada como *Pseudomonas putida* SS9. O cultivo ocorreu em um fermentador de tanque agitado e a concentração máxima de PHA encontrada foi de 5,98 g.L⁻¹ indicando que o soro de queijo poderia ser uma excelente fonte alternativa de carbono para a produção de PHA usando *P. putida* SS9 como microrganismo de escolha.

DE GIORGI *et al.*, (2018) realizou um estudo que avaliou a produção de ácido lactobiônico a partir do cultivo de microrganismos pertencentes à cepa de *Pseudomonas taetrolens* LMG 2336 em soro proveniente da fabricação de ricota em um biorreator de tanque agitado de 3 litros. No estudo o título de ácido lactobiônico obtido foi de 34,25 ± 2,86 g.L⁻¹, com rendimento de conversão por meio da oxidação da lactose de até 85 ± 7,0%, obtido após 48 horas de fermentação em lote.

Outro estudo realizado por ÜNVER (2021) avaliou produção de azurina, uma bacteriocina secretada por bactérias do grupo das *Pseudomonas aeruginosa* que induz apoptose em células cancerígenas humanas. Nesse estudo as *Pseudomonas aeruginosa* foram cultivadas em soro de leite adicionados de sulfato de cobre e nitrato de potássio nas proporções de 2,5 e 45 mg.L⁻¹ respectivamente que culminou na produção de azurina de alto nível além de reduzir muitos problemas de gerenciamento de resíduos industriais de processamento de soro de leite.

A produção de ramnolipídeo foi objeto de um estudo realizado por IBRAHIM; DIAB; ABDULLA, (2021) a partir do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de solo contaminado com óleo usando como substrato um meio mínimo composto por soro de leite adicionado com resíduos de óleo vegetal de refinaria agroindustrial. Como resultado foram obtidas quantidades de 5,72 g.L⁻¹ de ramnolipídeo. Dez congêneres de mono- e di-ramnolipídeos foram detectados e estes reduziram a tensão superficial da água para 26 mN/m com uma concentração micelar crítica de 33 mg.L⁻¹.

Bactérias que tem a capacidade de se desenvolver naturalmente em ambientes adversos têm atraído a atenção para atuação como plataformas microbianas, uma vez que estão frequentemente expostas a condições ambientais extremas. Esse fator se correlaciona com uma notável robustez metabólica e fisiológica. Entre os microrganismos com a diversidade metabólica intrinsecamente elevada encontra-se as espécies de *Pseudomonas* spp. que emergiram como um grupo de microrganismos que nos últimos anos tem atuado como uma base para projetar e criar caminhos para a bioprodução. Muitas espécies bacterianas ambientais são amplamente reconhecidas por seus estilos de vida metabólicos versáteis e flexíveis, que lhes permitem adaptar-se a condições que mudam rapidamente por exemplo, contato com estressores oxidativos, desafios de temperatura e perturbações osmóticas repentinas e os microrganismos pertencentes ao grupo das *Pseudomonas* spp. servem como um excelente exemplo dessas qualidades (NIKEL; DE LOURENZO, 2018).

Nesse trabalho utilizou-se cepas de bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa* LBI isoladas por Benincasa et al. (2002) de solo contaminado com petróleo, cepas de *Pseudomonas putida* CCMI 852 originalmente isolada de uma estação de tratamento de efluentes em Portugal e duas cepas isoladas numa planta de concentração de soro de leite e identificadas de forma presuntivas como pertencentes ao grupo das *Pseudomonas* spp. que foram testadas quanto à sua capacidade de formação de biomoléculas quando cultivadas sob condições específicas em um meio de cultivo formado por permeado de soro de leite obtido por osmose reversa como fonte exclusiva de carbono.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho apresenta objetivos geral e específicos, os quais serão descritos a seguir:

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento de *Pseudomonas* spp. em permeado de soro de leite obtido por osmose reversa suplementado ou não com sais minerais, bem como, determinar o perfil de metabólitos produzidos ao longo do tempo de incubação a fim de obter compostos de interesse biotecnológico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar caracterização físico-química do permeado de soro de leite gerado por osmose reversa quanto aos parâmetros de pH; acidez e alcalinidade; proteína, teor de sólidos totais, voláteis fixos; composição de açúcares e ácidos orgânicos;
- Selecionar microrganismos pertencente ao gênero das *Pseudomonas* spp. a partir de biofilme formado nas tubulações de condução de permeado de OR da planta de concentração de soro;
- Avaliar a capacidade dos isolados de *Pseudomonas* spp. em crescer em permeado de soro de leite obtido por OR;
- Determinar o perfil de metabólitos produzidos pelos isolados ao longo da incubação e crescimento dos microrganismos selecionados para o estudo.
- Comparar o crescimento e perfil metabólico entres os isolados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PERMEADO DE SORO DE LEITE OBTIDO POR OSMOSE REVERSA

O permeado de soro de leite foi obtido em equipamento OR fabricado pela empresa WGM. O sistema de filtração OR foi dimensionado para operar com soro de leite de forma contínua por 20 horas, seguido de um tempo de limpeza de 4 horas. O equipamento foi projetado em três estágios, onde cada estágio possui três carcaças contendo cinco módulos de filtragem cada, formando um conjunto de 45 membranas. As membranas utilizadas no equipamento são de modelo em espiral Dairy-Pro 8038 RO-30 da marca (Koch) com área de 34,5 m² por módulo, pressão de operação entre 20,7 e 41,4 bar, queda de pressão por carcaça de 2,1 – 3,4 bar, com temperatura de operação de 5°C durante a produção e de 50°C durante processo de limpeza CIP.

As amostras de permeado de soro de leite foram disponibilizadas por um laticínio localizado no centro da cidade de Lima Duarte-MG. A coleta ocorreu durante o beneficiamento de 210.543 litros de soro de leite originados da fabricação de queijo tipo Gruyere, Emmental, Reino e Gouda com técnica de cozimento por massa lavada onde o cada lote de queijo fabricado recebeu adição de 25% de água quente para a determinação do ponto. Foram coletadas ao final de cada hora de trabalho do equipamento alíquotas de 2 litros do fluido ao longo de 11 horas formando uma amostra composta com volume final de 24 litros de permeado sendo então, armazenadas em recipientes plástico, acondicionadas em caixas isotérmicas sob refrigeração e transportada para o Laboratório de Microbiologia do Rúmen na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG. Posteriormente, foram realizadas análises físico-químicas das amostras do permeado.

4.1.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em pHmetro de bancada modelo Hanna HI 2221 com leitura direta do eletrodo na amostra de permeado.

4.1.2 Determinação de acidez e alcalinidade

Para a determinação dos parâmetros de acidez e alcalinidade foi aplicada a técnica de titulação ácido-base onde uma solução padrão alcalina com concentração conhecida de NaOH a 0,02 mol/mL e uma solução ácida com concentração conhecida de HCL 0,02 mol/mL determinou a alcalimetria e a acidimetria da amostra usando como indicador solução de fenolftaleína 1%. A partir do conhecimento desse parâmetro, optou-se pelo ajuste do pH do meio para 7,00 por meio da adição de hidróxido de sódio a 0,02 mol/L antes da inoculação dos microrganismos testados na curva de crescimento.

4.1.3 Determinação de proteína

A determinação quantitativa de proteína bruta e nitrogênio total do permeado de soro por osmose reversa foi realizada de acordo com o método de Kjeldahl (BRASIL, 2006; GALVANI; GAERTNER, 2006; IAL, 2008), pelo laboratório de análise de alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG. Para a determinação do teor de proteína do permeado de OR foi utilizado no cálculo de obtenção do resultado o fator de conversão usualmente aplicado para leite e produtos lácteos de 6,38.

4.1.4 Determinação de sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV) e sólidos fixos (SF)

A determinação de ST e SF foi realizada por métodos gravimétricos, utilizando estufas de bancada marca (Marconi modelo MA033/1), para a secagem da amostra a 105 °C e determinação dos ST em forno tipo mufla marca (Thermo Scientific modelo 42,5L), para incineração à 550 °C e determinação dos SF. Os SV foram obtidos pela diferença entre os ST - SF de acordo com método APHA, (2012).

4.1.5 Determinação da composição açúcares e ácidos orgânicos por cromatografia

Amostras de permeado de soro de leite recém obtidas durante o processo de filtração e não inoculadas foram avaliadas quanto a sua composição no Laboratório de Físico-Química do Instituto de Laticínios Candido Tostes (ILCT), empregando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com objetivo de identificar constituintes presentes no permeado fresco.

A determinação dos açúcares e ácidos orgânicos foi realizada conforme a metodologia proposta por ACQUARO JUNIOR *et al.* (2013) e FREITAS M.C *et al.* (2017), com algumas modificações. O método para extração de açúcares em meio aquoso seguiu-se com a transferência de uma alíquota da amostra para um balão volumétrico, adicionado de água deionizada até a metade do balão. Foi adicionado os clarificantes ferrocianeto de potássio (Carrez I) e sulfato de zinco (Carrez II), seguido de agitação e preenchimento de todo o volume do balão com água deionizada sob agitação seguido de repouso por 60 minutos, filtração da amostra em papel de filtro qualitativo, com nova filtração através de filtro seringa.

Para a extração dos ácidos orgânicos partiu-se de 3 mL de amostra, adicionando-se o solvente etanol 99,5% marca (Synth), onde a proporção de etanol:permeado foi de 4:1, (v/v). A mistura foi agitada manualmente por cerca de um minuto e então os tubos foram colocados em centrífuga, modelo CDR 1600 (Anco, Brasil) e submetidos à centrifugação por 30 min sob rotação de 2.490 G a 20°C.

A temperatura foi mantida a 20°C. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo e por cartucho Sep-Pak C18 (Waters®). Após a filtração, a amostra foi levada à evaporação completa no evaporador a vácuo (Concentrator Plus/Vacufuge® Plus, Eppendorf), com a temperatura mantida em 30°C. Em seguida, a amostra seca foi ressuspensa em 6 mililitros de água ultrapura e passada em filtro seringa PVDF hidrofóbico (25 MM).

A determinação dos compostos foi realizada utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR), modelo Agilent 1260 Infinity II, com bomba quaternária 600 bar (Agilent Technologies, USA). Para a separação utilizou-se coluna Hi-Plex H, (300 x 7.7 mm), sendo a fase móvel

constituída de água ultrapura. O volume de injeção de amostra foi 20µL, a vazão da fase móvel foi de 0,6 mL/min e a temperatura foi mantida a 65°C tanto para os açúcares como para os ácidos orgânicos (Coelho *et al.*, 2018).

Os padrões utilizados no estudo foram produzidos pela empresa Sigma Aldrich Merck. Os padrões ácidos testados no estudo foram o ácido acético 500 mg; ácido adípico 500 mg; ácido L-ascórbico 500 mg; ácido benzóico 500 mg; ácido butírico 500 mg; ácido cítrico 500 mg; ácido isobutírico 500 mg; ácido fórmico 500 mg; ácido fumárico 500 mg; L-(+)-ácido láctico 100 mg; Hidrato de sal trissódico de ácido DL-isocítrico 100 mg; ácido maleico 500 mg; ácido malônico 500mg; ácido D-(+)-málico 100 mg; ácido oxálico 500 mg; ácido fítico 500 mg; ácido propiônico 500 mg; (-) ácido quínico 500 mg; ácido succínico 500 mg; ácido chiquímico 100 mg; ácido D-(-)-tartárico 500 mg.

Os de padrões de monossacarídeos utilizados foram D(-) Arabinose 100 mg; D(-) Ribose 100 mg; D(+) Xilose 100 mg; D(+) Glicose 100 mg; D(-) Frutose 100 mg; D(+) Manose 100 mg; D(+) Galactose 100 mg. Entre os padrões de dissacarídeos testados foram Isomaltose - anômeros mistos 100 mg; α- lactose 500 mg; Maltose 500 mg; Sacarose 500 mg. Também foi utilizado o padrão de lactulose (4-O-β-D-Galactopyranosyl-D-fructofuranose) frasco com 100 mg. Todos os padrões continham grau de pureza para análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A identificação dos compostos orgânicos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos picos dos analitos na amostra em relação aos picos gerados nas corridas com solução padrão. As curvas analíticas dos padrões foram elaboradas a partir de quatro diluições dos padrões (0,4; 0,75; 1,15 e 1,50 mg.mL⁻¹). A concentração dos açúcares e ácidos orgânicos foi obtida por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico x concentração) feitas previamente por injeção de padrões.

Posteriormente, para a avaliar os metabólitos gerados nas amostras de sobrenadantes obtidas durante a confecção das curvas de crescimento cultivadas com e sem a suplementação de sais foi aplicada a mesma metodologia descrita anteriormente a fim de promover a determinação e quantificação dos metabólitos formados durante o cultivo.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS MICROBIOLÓGICAS

Foram realizadas coletas com swab em diversos pontos da planta de concentração de soro de leite onde ocorriam vazamento do permeado de soro de leite obtido por osmose reversa. Esses locais foram escolhidos por conter biofilme com elevado crescimento de biomassa (Figura 2). Os swabs contendo amostras foram inseridos em BHI caldo (*Infusão de cérebro e coração*) da marca (Laborclin) para viabilização do crescimento celular, levados ao laboratório de Microbiologia do Rumen da Embrapa Gado de Leite, incubados em estufa bacteriológica marca (Solab modelo SL-101/150) a uma temperatura de 36°C por 24 horas.

Posteriormente, alíquotas foram estriadas em meio sólido BHI (*Infusão de cérebro e coração*) da marca (Kasvi) sendo novamente incubados em estufa bacteriológica a uma temperatura de 36°C por 24 horas.

Figura 2 - Biofilme em válvula pneumática



Fonte: do autor.

4.2.1 Isolamento em meio seletivo e coloração de Gram

Foi realizado o isolamento em placas de Petri das colônias em meio ágar BHI (Kasvi) e em meios seletivos como meio ágar EMB (*Eosina Azul De Metileno*) (Merck) e meio ágar MacConkey (Prolab) sendo novamente incubados por 24 horas por 36°C.

Os microrganismos que se desenvolveram nos meios MacConkey e EMB que apresentaram formação de colônias características de lactose negativa, ou seja, produzem colônias esbranquiçadas opacas (ágar MacConkey) ou colônias translúcidas ou rosadas (ágar EMB) devido ao não abaixamento do pH foram coletadas com alça bacteriológica e avaliadas pela coloração de Gram com objetivo de identificação de bacilos Gram-negativos e descarte das bactérias Gram-positivas.

O método de coloração de Gram foi utilizado para classificar as bactérias com base em sua estrutura celular. Foi adicionado uma gota de água destilada em uma lâmina de vidro onde foi adicionado a uma pequena quantidade de uma colônia previamente isolada sendo misturada e espalhada. Posteriormente ocorreu a fixação da colônia através da secagem da lâmina em chama de bico de Bunsen. Aplicou-se como corante primário a solução de cristal violeta 2% e deixou descansar por 1 minuto. Após, ocorreu a adição da solução de lugol 3% com 1 minuto de tempo de exposição. Foi realizado a lavagem com álcool 95% seguido de lavagem com água destilada. Posteriormente foi adicionado o corante secundário Safranina na concentração de 1% seguido de lavagem com água destilada. As lâminas foram secas em estufa bacteriológica a 36°C por 1 hora e levadas ao microscópio para verificação de Gram.

4.2.2 Teste bioquímico

Com objetivo de promover a seleção do gênero de *Pseudomonas* foram realizadas provas bioquímicas de catalase e oxidase de todos o bacilos Gram-negativos encontrados. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% é utilizado para detectar a produção da catalase bacteriana. Uma colônia bacteriana foi transferida para uma lâmina de vidro limpa e sobre ela foi adicionada uma gota do peróxido de hidrogênio. O borbulhamento imediato indica uma reação positiva para a presença da enzima (ATLAS; SNYDER, 2011). O teste da oxidase foi realizado utilizando uma tira

de papel filtro adicionado de uma gota do reagente de oxidase (tetrametil-p-fenilenodiamina) seguido da adição de uma colônia bacteriana ao reagente onde foi observado a formação da coloração azul ou roxa confirmando a presença da enzima na colônia testada (BASAK; SHETTY, 2021).

Os microrganismos que se apresentaram como catalase e oxidase positivos foram incubados em ágar citrato marca (Synth). O preparo do ágar citrato se deu misturando 25g do meio em 1 litro de água destilada. Essa mistura foi esterilizada em autoclave vertical analógico (Prismatec modelo CS-150 150 litros) a 120°C por 15 minutos. Após ser esterilizados, o ágar citrato de Simmons foi depositado em tubos de ensaios que foram mantidos inclinados e deixados para esfriar em estufa a 36°C. A sementeira no meio ocorreu a partir de colônias isoladas de forma direta com o auxílio de uma alça bacteriológica, que foi introduzida no meio próximo ao fundo do tubo seguido de estriamento ao longo da parte inclinada do meio no tubo de ensaio. A incubação ocorreu a 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica marca (Solab, modelo SL-101/150).

A incubação em meio SIM (Motilidade, Indol e detecção de produção de H₂S) também foi realizada para identificação e exclusão de enterobactérias com base na produção de sulfeto, formação de indol e avaliação da motilidade bacteriana. Tubos de ensaio contendo 5 ml do meio da marca (Laborclin) foram retirados do pacote refrigerado em ambiente asséptico. Os tubos foram colocados em estufa bacteriológica da marca (Solab, modelo SL-101/150) entre 35 e 37°C pelo tempo necessário para adquirirem esta temperatura. Com uma agulha esterilizada tocou-se uma colônia a ser analisada e inoculou-se por picada, até uma distância a 1 cm do fundo do tubo contendo o meio. O material foi incubado em estufa bacteriológica a 37°C entre 18 e 24 horas quando realizou-se a leitura. A prova de motilidade e de formação de H₂S foi observada diretamente no tubo inoculado. A determinação da presença de indol se fez com a adição de três gotas do reativo de Kovacs na superfície do meio e observação da reação.

4.2.3 Seleção dos microrganismos

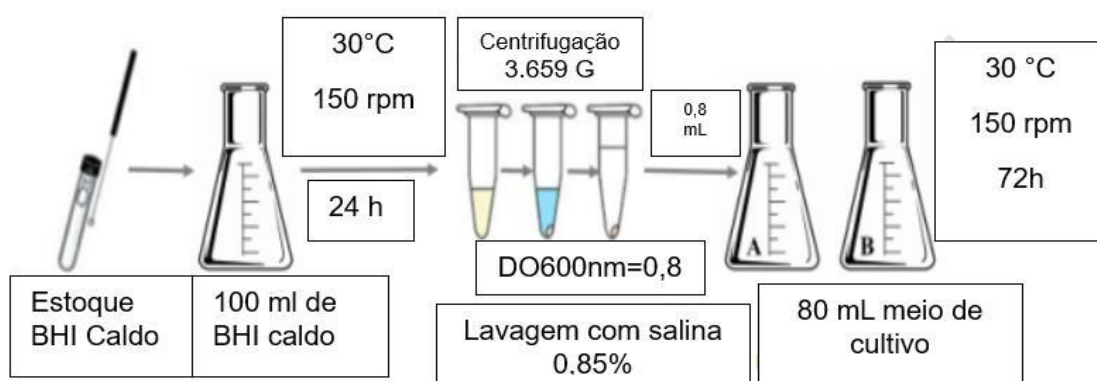
Após a realização dos testes os microrganismos, foram denominados como Isolados de biofilme da planta de concentração de soro (IBPCS) e numerados de 1 a 41. Foram selecionados microrganismos que demonstraram possuir características inerente ao gênero *Pseudomonas spp.* Os microrganismos apresentaram-se na forma de bacilo Gram-negativo, não fermentador de lactose, citrato positivo, catalase positiva, oxidase positivo, motilidade positiva e negativo para o teste de indol, formação de H₂S e produção de gás. Os microrganismos selecionados foram adicionados de glicerina a 15% e mantidos sob congelamento em freezer marca (Prismalab modelo 120L) a -80°C até o momento de sua utilização na curva de crescimento.

4.3 CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO APÓS PREPARO DOS MEIOS

Para a realização da curva de crescimento seguiu-se o processo descrito por CLARO (2017). Primeiramente, os microrganismos selecionados que estavam armazenados sob refrigeração foram colocados para crescimento em caldo BHI a 36°C por 24 horas para a reativação do metabolismo com objetivo de aumento da massa celular. Posteriormente, ocorreu a centrifugação do meio a 3.659 G por 20 min seguido da eliminação do sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado com 7,5 mL de salina 0,85% estéril, centrifugado e suspenso por três vezes (Figura 3).

Posteriormente, ocorreu leitura em espectrofotômetro da marca (Instrutherm modelo UV 1000A) da D.O 600nm. O objetivo foi atingir uma concentração conhecida do inóculo com D.O 600nm entre 0,8 e 0,9. Os inóculos dos microrganismos selecionados com massa celular padronizada foram congelados para serem usadas como cultura starter no cultivo em permeado de soro de leite não suplementado e suplementado com sais de Robert e Bushnell-Haas com intuito de avaliar a capacidade de crescimento no meio proposto e formação de metabólitos bacterianos no cultivo alternativo a base resíduo oriundo da indústria de laticínios.

Figura 3 - Esquema de cultivo microbiano



Fonte: CLARO, 2017 (Adaptado).

4.3.1 Preparação do permeado de soro de leite

O permeado de soro de leite a ser usado como meio de cultivo para os microrganismos selecionados foi adicionado de solução NaOH 0,02N até o atingimento da faixa 7 de pH. Posteriormente, o volume do permeado utilizado foi fracionado em três partes, onde, uma parte sofreu a adição de sais de Robert (SR), outra sofreu adição de sais de Busnhell-Haas (BH) e outra permaneceu sem suplementação. Todo o conteúdo líquido foi vertido em frasco de vidro com tampa, esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min a 1,1 kgf/cm² de pressão e armazenado sob refrigeração até o momento de sua utilização. Todo o meio de cultivo anteriormente preparado e previamente esterilizado foi dividido em Erlenmeyer num volume de 80 ml dentro de uma capela de fluxo laminar da marca (Veco modelo CFLH12) antes da adição do inóculo. O permeado de soro de leite preparado sem suplementação atuou como controle negativo para a avaliação do crescimento celular e para a formação dos metabólitos gerados durante o cultivo dos microrganismos selecionados no estudo.

4.3.2 Preparação do meio mineral mínimo de sais de Robert (SR)

O meio mineral mínimo SR foi descrito por Robert *et al.* (1989). A preparação do meio se deu com a dissolução dos sais apresentados na Tabela 1 em de água ultrapura. Todo volume preparado foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos a 1,1 kgf/cm² em frasco de vidro de 1.000 mL. O meio é aplicado em diversos estudos com intuito de estimular a produção de biossurfactantes em diversos cultivos bacterianos (Benincasa e Accorsini 2008; Costa *et al.*, 2008).

Tabela 1- Composição meio mineral S.R

Composto	Fórmula	Quantidade (g.L ⁻¹)
Nitrato de sódio (Cinética Química)	NaNO ³	4,000
Fosfato de potássio dibásico (Vetec)	K ₂ HPO ⁴	1,000
Fosfato de potássio monobásico (Merck)	KH ₂ PO ⁴	0,500
Sulfato de magnésio (Chemco)	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,500
Cloreto de potássio (Cinética Química)	KCl	0,100
Sulfato de ferro (Merck)	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,010
Cloreto de cálcio (Vetec) CaCl ₂	CaCl ²	0,010
Extrato de levedura (BD)	-	0,010
Cloreto férrico (Merck)	FeCl ³	0,050
Elementos traços*	-	0,05 mL.L ⁻¹
Elementos traços*	Fórmula	Quantidade %
Ácido bórico (Mallinckrodt)	H ₃ BO ³	0,026
Sulfato de cobre (Reagen)	CuSO ₄ .7H ₂ O	0,050
Sulfato manganoso (Mallinckrodt)	MnSO ₄ .H ₂ O	0,050
Molibdato de Amônio (Mallinckrodt)	NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ .H ₂ O	0,006
Sulfato de zinco (Grupo Química)	ZnSO ₄ .H ₂ O	0,070

Fonte: Claro, (2017). Adaptado

4.3.3 Preparação do meio mineral mínimo de sais de Bushnell-Haas (BH)

O meio mineral mínimo BH descrito por Difco (1984), foi preparado e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos a 1,1 kgf/cm² em frasco de vidro de 1.000 mL. Foi realizado a dissolução dos sais apresentados na Tabela 2 em 1.000 mL de água ultrapura. O meio BH é aplicado em diversos estudos com intuito de estimular a produção de metabólitos diversos em cultivos bacterianos (HANSON *et al.*, 1993; MARIANO *et al.* 2008).

Tabela 2 - Composição meio mineral sais B.H

Composto	Fórmula	Quantidade (g.L ⁻¹)
Nitrato de amônio (Vetec)	NH ₄ NO ₃	1,000
Fosfato de potássio dibásico (Vetec)	K ₂ HPO ₄	1,000
Fosfato de potássio monobásico (Merck)	KH ₂ PO ₄	1,000
Cloreto férrico (Merck)	FeCl ₃	0,050
Sulfato de magnésio (Vetec)	MgSO ₄	0,200
Cloreto de cálcio (Vetec)	CaCl ₂	0,020

Fonte: Claro, (2017). Adaptado

4.3.4 Preparação do permeado de soro de leite suplementado

O permeado de soro de leite foi suplementado com sais de Robert (SR) e sais de Bushnell-Haas (BH) com objetivo de estressar e estimular os microrganismos a produzirem diferentes compostos metabólicos, durante o processo de crescimento bacteriano no meio proposto. Foram adotadas metodologias distintas de suplementação. A primeira estratégia consistiu em formar 1000 mL de um meio de cultivo a base de permeado de soro de leite onde foi misturado 250 mL do meio mineral de sais SR em 750 mL de permeado de soro de leite não suplementado. O

mesmo processo foi realizado para obter 1000 mL de um meio a base de permeado do soro de leite utilizando 250 mL saís de BH adicionado a 750 mL de permeado de soro de leite. A outra estratégia consistiu em formar 1000 mL de um meio contendo 500 mL de saís SR e 500 mL de permeado de soro de leite não suplementado para o cultivo dos microrganismos selecionado. Também foi produzido 1000 mL de um meio de cultivo contendo 500 mL de permeado de soro de leite adicionado de 500 mL de meio mineral mínimo saís de BH.

4.3.5 Inoculação, crescimento dos microrganismos selecionados e coleta de sobrenadante para análise cromatográfica

O permeado foi fracionado em erlenmeyer previamente esterilizado na proporção de 80 mL. Utilizando uma capela de fluxo laminar (Veco modelo CFLH12) inoculou-se aos frascos contendo permeado de soro de leite não suplementado e suplementado uma alíquota de 0,8 mL do inóculo das bactérias IBPCS 09, IBPCS 14, *Pseudomonas aeruginosa* LBI e *Pseudomonas putida* CCMI 852 anteriormente padronizada em D.O 0,8 a 600nm. Para cada microrganismo foi realizado de forma individualizada a construção de uma curva de crescimento em duplicata, a uma temperatura de 30°C, por 72 horas, sob rotação de 150 rpm em mesa agitadora da marca (Tecnal modelo TE-420) de acordo com o descrito na figura 3.

No tempo zero e a cada 24 horas um frasco foi retirado para centrifugação a 3.659 G por 20 min. Os *pellets* formados durante as centrifugações foram lavados com 7,5 mL de salina 0,85% estéril, novamente centrifugados e suspensos por três vezes. A construção da curva de crescimento microbiano ocorreu por meio da avaliação da formação de biomassa com constatação do crescimento celular determinado por espectrofotômetro de massa marca Instrutherm modelo UV 1000A. O sobrenadante gerado, resultante do processo de centrifugação passou por identificação das amostras e congelamento para posterior avaliação qualitativa e quantitativa dos metabolitos formados em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR), modelo Agilent 1260 Infinity II, dotado de bomba quaternária 600 bar (Agilent Technologies, USA).

4.3.6 Comparação do crescimento em permeado sem suplementação dos IBPCS 09 e IBPCS 14 com *Pseudomonas aeruginosa* LBI e *Pseudomonas putida* CCMI 852.

Foi realizado a construção de uma curva de crescimento utilizando como meio de cultivo o permeado sem suplementação por 72 horas, sob agitação de 150 rpm, a 30°C onde foi comparado a capacidade de crescimento das bactérias selecionadas IBPCS 09, IBPCS 14 com as cepas *Pseudomonas aeruginosa* LBI e *Pseudomonas putida* CCMI 852 seguido da construção de um gráfico que destacou o desempenho de cada microrganismo no meio proposto por este estudo.

5 DISCUSSÃO E RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DO PERMEADO DE OSMOSE REVERSA

O permeado de osmose reversa utilizado neste trabalho é um subproduto da concentração do soro de queijo que foi obtido por meio do processo de coagulação enzimática do leite durante a fabricação de queijos. O processo de coagulação é conhecido por gerar um soro doce, ou seja, não ocorre a conversão da lactose em ácido láctico pelas bactérias lácticas de forma acentuada resultando em um pH inicial do soro geralmente situado entre 5,90 e 6,60 (BANSAL; VEENA, 2024). Os resultados encontrados durante a determinação da acidez e alcalinidade do permeado de soro de leite por osmose reversa demonstraram que o produto utilizado no experimento apresentou pH na faixa de 6,80. É importante destacar que o permeado de osmose reversa tem composição diferente pois passou pelo processo de concentração que retirou grande parte dos compostos de maior peso molecular presentes originalmente no soro de leite (BANGER *et al.*, 2021; ROLLINI, 2020). As medições de pH das amostras de permeado de soro de leite obtido por OR trabalhadas apresentaram-se acima da faixa encontrada do quando comparadas à média do pH do soro de leite obtido pelo método da coagulação enzimática.

Os resultados da avaliação dos teores de sólidos totais, sólidos fixos, sólidos voláteis, proteína bruta e nitrogênio total, encontrados nas amostras do permeado utilizado como meio de cultivo são apresentados na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3 – (%) Sólidos totais, fixos e voláteis proteína total e nitrogênio total

Composto	(%)
ST	0,750
SF	0,040
PB	0,100
SV	0,710
NT	0,016

Fonte: elaborado pelo autor. (ST) sólidos totais; (SV) sólidos voláteis; (PB) proteína bruta; (NT) nitrogênio total.

MENCHIK et al (2019) avaliou a composição de diferentes coprodutos gerado pela indústria lática entre os quais estava o permeado de leite por ultrafiltração quanto ao teor de ST, PB e NT em três amostras distintas. Ao avaliar o teor de ST foi evidenciado a presença de 13,4%, 14,8% e 15,4% nas amostras respectivamente. O teor de PB atingiu 3,20 mg/g, 4,35 mg/g e 3,73 mg/g. Já os valores de NT encontrados nestas amostras chegaram a 502 mg/Kg, 682 mg/Kg e 584 mg/Kg. DECESARO *et al.* (2020) realizou a caracterização do permeado de soro de leite por ultrafiltração durante a execução de um estudo que objetivou a produção de biossurfactantes. Neste trabalho foi observado a presença de ST na proporção de 4,31% em sua composição.

As diferenças observadas nos resultados da avaliação do teor de PB, ST e NT destacadas no estudo podem ser explicadas pela diferença da origem do permeado analisado. Quando proveniente do processo de ultrafiltração o permeado gerado tem constituição diferente devido a diversos fatores como a diferenças de porosidade, composição da membrana, números estágios do equipamento, temperatura de trabalho. Esses aspectos interferem na permeabilidade permitindo a passagem de compostos com maior peso molecular formando um fluido com características diferentes do fluxo gerado em cada processo de filtração o que altera diretamente na composição do permeado obtido (CARTER et al, 2021).

5.1.1 Isolamento e seleção de bactérias do grupo *Pseudomonas* spp.

O gênero *Pseudomonas* pertence à ordem *Pseudomonadales* e à família *Pseudomonadaceae*, compõem um grupo de microrganismos de grande importância e são encontrados em diferentes ecossistemas (LALUCAT *et al.*, 2022). Classificados como bacilos Gram-negativo, com comprimento entre 1,5 e 5 µm e diâmetro de 0,5 a 1 µm são predominantemente móveis devido a presença de um flagelo polar (SOARES, 2018). Possuem respiração aeróbia, onde o oxigênio atua como receptor final de elétrons. Ocasionalmente podem, na ausência de oxigênio, utilizar nitratos como aceptor final, contudo, não adota a via metabólica fermentativa. São oxidase e catalase positivos e seu desenvolvimento em pH inferior a 4,5 é inexpressivo (RAMOS, 2004; SOARES, 2018; LALUCAT *et al.*, 2022).

Por tratar-se de microrganismo ubíquo, de baixa exigência nutricional optou-se por promover coletas de amostras por swab na planta de concentração de soro com intuito de realizar o isolamento de cepas deste gênero. As amostras foram inicialmente inoculadas em caldo BHI. Por conseguinte, houve a inoculação em meio Ágar BHI onde ocorreu o desenvolvimento de diferentes colônias de aspectos morfológicos variados. Um total de quarenta e uma colônias distintas foram isoladas, (Tabela 4) numeradas e avaliadas inicialmente frente a coloração de Gram em esfregaço das colônias crescidas e isoladas em meio ágar MacConkey e ágar EMB.

O ágar MacConkey é um meio de cultivo seletivo e diferenciador do crescimento microbiano. A presença do corante cristal violeta e de sais biliares em sua composição impedem o crescimento de bactérias Gram-positivas possibilitando apenas o crescimento de espécies de bactérias Gram-negativas. O meio também diferencia microrganismos Gram-negativos quanto à capacidade de metabolismo da lactose. A capacidade de diferenciação dos microrganismos Gram-negativos que fazem metabolização da lactose neste meio de cultivo está ligada à formação ácidos orgânicos, por meio da conversão da lactose presente na formulação em ácido láctico, que diminui o pH do ágar. O ágar MacConkey contém em sua composição o corante vermelho neutro, um indicador de pH que muda de esbranquiçado para vermelho/rosa brilhante à medida que o pH cai abaixo de 6,8 permanecendo com coloração rósea em condições ácidas. Portanto, microrganismos Gram-negativos fermentadores de

lactose formam colônias rosa, enquanto os não fermentadores produzem colônias esbranquiçadas opacas (KOHLETSCHMIDT *et al.*, 2021; JUNG; HOILAT, 2022).

O ágar EMB também é seletivo e diferencial para bactérias Gram-negativas. Contém em sua composição o corante azul de metileno que inibe eficazmente o crescimento da maioria dos microrganismos Gram-positivos. A lactose e a sacarose são os carboidratos disponíveis no meio que estimulam o crescimento das bactérias inoculadas. Bactérias Gram-negativas fermentadoras de lactose acidificam o meio e, sob condições ácidas, os corantes produzem um complexo roxo escuro que geralmente está associado a um brilho metálico verde. Esta coloração é um indicador de uma grande capacidade de fermentação da lactose e/ou sacarose. Microrganismos que apresentam menor produção de ácidos produzem neste meio uma coloração marrom-rosada. E colônias de microrganismos que não fermentam a lactose apresentam colônias translúcidas ou rosadas (LAL; CHEEPHAM, 2007).

Tomando como base as características das bactérias pertencente ao gênero *Pseudomonas* todas as amostras identificadas e confirmadas como Gram positivas foram descartadas do estudo.

Tabela 4 - Diferenciação por técnica de Gram das colônias IBPCS crescidas em meio BHI

Amostra	Gram	Amostra	Gram	Amostra	Gram	Amostra	Gram
1	(-)	12	(-)	22	(-)	32	(-)
2	(-)	13	(-)	23	(-)	33	(-)
3	(-)	14	(-)	24	(-)	34	(-)
4	(+)	15	(+)	25	(-)	35	(-)
5	(-)	16	(-)	26	(+)	36	(-)
6	(-)	17	(-)	27	(+)	37	(-)
7	(-)	18	(-)	28	(-)	38	(-)
8	(-)	19	(-)	29	(-)	39	(-)
9	(-)	20	(-)	30	(-)	40	(-)
10	(-)	21	(-)	31	(+)	41	(-)
11	(-)						

Fonte: elaborado pelo autor

Continuando o processo de identificação presuntiva dos microrganismos isolados realizou-se os testes bioquímicos de catalase e oxidase em todos os bacilos Gram-negativos encontrados. Os resultados estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 - Teste de catalase e oxidase das colônias IBPCS crescidas em BHI

Amostra	Catalase	Oxidase	Amostra	Catalase	Oxidase
1	(+)	(-)			
2	(+)	(-)	22	(+)	(-)
3	(+)	(-)	23	(-)	(-)
4	D	D	24	(+)	(-)
5	(-)	(-)	25	(+)	(-)
6	(-)	(-)	26	D	D
7	(+)	(-)	27	D	D
8	(+)	(-)	28	(-)	(-)
9	(+)	(+)	29	(+)	(-)
10	(+)	(-)	30	(+)	(-)
11	(-)	(-)	31	D	D
12	(+)	(-)	32	(+)	(-)
13	(+)	(-)	33	(+)	(-)
14	(+)	(+)	34	(+)	(-)
15	D	D	35	(-)	(-)
16	(+)	(-)	36	(-)	(-)
17	(+)	(-)	37	(+)	(-)
18	(+)	(-)	38	(-)	(-)
19	(-)	(-)	39	(-)	(-)
20	(+)	(+)	40	(+)	(-)
21	(+)	(-)	41	(+)	(+)

Fonte: elaborado pelo autor. A letra **D** destacada na tabela representa os microrganismos Gram positivos eliminados do estudo.

Observou-se também a capacidade de metabolização de citrato pelos microrganismos selecionados que foram cultivados em meio específico. Os resultados foram compilados em uma tabela sinalizando (+) para as amostras positivas e (-) para as amostras negativas (Tabela 6).

Tabela 6 - Seleção dos microrganismos IBPCS por meio da metabolização do citrato em meio específico

Amostra	Citrato	Amostra	Citrato	Amostra	Citrato	Amostra	Citrato
1	(-)	12	(+)	22	(+)	32	(+)
2	(-)	13	(+)	23	(+)	33	(+)
3	(+)	14	(+)	24	(+)	34	(+)
4	D	15	D	25	(+)	35	(+)
5	(+)	16	(+)	26	D	36	(+)
6	(+)	17	(+)	27	D	37	(+)
7	(+)	18	(+)	28	(+)	38	(+)
8	(+)	19	(+)	29	(+)	39	(+)
9	(+)	20	(+)	30	(+)	40	(+)
10	(+)	21	(+)	32	D	41	(+)
11	(+)	22					

Fonte: elaborado pelo autor. A letra **D** destacada na tabela representa os microrganismos Gram positivos eliminados do estudo.

Os microrganismos também foram avaliados em meio SIM para identificação de enterobactérias com base na produção de sulfeto, formação de indol e motilidade. O teste de motilidade, bem como os de produção de sulfeto de hidrogênio e de produção de indol, foram realizados no meio SIM, (Merck, Darmstadt, Alemanha)- nome que indica as características “Sulfeto”, “Indol” e “Motilidade”- o qual possibilita avaliar essas três características no mesmo tubo. A motilidade da bactéria é um fator importante na identificação final de uma espécie, interpretado pelo exame macroscópico de uma zona difusa de crescimento, a partir da linha de inoculação, possibilita verificar se a bactéria é móvel ou imóvel (WINN JR. *et al.*, 2008).

Esse teste também foi realizado no meio de cultura SIM (Merck, Darmstadt, Alemanha) e determina a liberação de sulfeto de hidrogênio (H₂S) por ação enzimática nos aminoácidos sulfurados (cisteína), que produzem uma coloração negra no meio. As bactérias podem metabolizar aminoácidos que contêm enxofre (cisteína) ou degradar o tiosulfato de sódio (substrato) em ambiente ácido, com a produção de sulfeto de hidrogênio, que é incolor e, por sua vez, pode reagir com íons férricos presentes no meio, formando como produto o sulfeto ferroso, composto insolúvel que dá origem à cor negra. Ressalta-se que o escurecimento do meio SIM indica resultado positivo e, sua coloração amarela, negativo (RIBEIRO; SOARES, 1998).

O indol é um produto da degradação do metabolismo do aminoácido triptofano, e bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de clivar o triptofano produzindo indol, ácido pirúvico e amônia. O aparecimento da coloração vermelha após a adição da solução contendo p-dimetilaminobenzaldeído (reagente de Kovacs) é indicativo da presença de indol no meio contendo triptofano. O meio SIM inoculado foi incubado por 24 horas a 35°C e 24 horas em temperatura ambiente. No momento da leitura, foram adicionadas três gotas do reagente de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeído em álcool amílico e HCl concentrado) e, em seguida, observada a reação (BARROW; FELTHAM, 1993; WINN JR. *et al.*, 2008).

Posteriormente ocorreu a eliminação dos microrganismos que não apresentaram as características presuntivas de pseudomonas. A tabela 7 destaca os resultados encontrados no teste:

Tabela 7 - Seleção dos microrganismos IBPCS em meio SIM

Amostra	Motilidade	Indol	H ₂ S	Gás	Amostra	Motilidade	Indol	H ₂ S	Gás
1	(+)	(+)	(-)	(-)	22	(+)	(+)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(-)	(-)	23	(-)	(-)	(-)	(-)
3	(-)	(-)	(-)	(-)	24	(-)	(-)	(-)	(-)
4	D	D	D	D	25	(+)	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)	(-)	26	D	D	D	D
6	(-)	(-)	(-)	(-)	27	D	D	D	D
7	(-)	(+)	(-)	(-)	28	(+)	(+)	(-)	(-)
8	(-)	(-)	(-)	(-)	29	(-)	(-)	(-)	(-)
9	(+)	(-)	(-)	(-)	30	(+)	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)	(-)	31	D	D	D	D
11	(+)	(+)	(-)	(-)	32	(-)	(+)	(-)	(-)
12	(-)	(-)	(-)	(+)	33	(+)	(+)	(-)	(-)
13	(+)	(+)	(-)	(-)	34	(+)	(+)	(-)	(-)
14	(+)	(-)	(-)	(-)	35	(-)	(-)	(-)	(-)
15	D	D	D	D	36	(-)	(+)	(-)	(-)
16	(+)	(-)	(-)	(+)	37	(-)	(-)	(-)	(-)
17	(+)	(+)	(-)	(-)	38	(+)	(+)	(-)	(-)
18	(+)	(+)	(-)	(-)	39	(+)	(+)	(-)	(-)
19	(-)	(-)	(-)	(+)	40	(+)	(+)	(-)	(-)
20	(+)	(-)	(-)	(-)	41	(+)	(-)	(-)	(-)
21	(+)	(+)	(-)	(-)					

Fonte: elaborado pelo autor. A letra **D** destacada na tabela representa os microrganismos Gram positivos eliminados do estudo.

Ao final dessa etapa, quatro amostra de microrganismos designadas como IBPCS 09, IBPCS14, IBPCS 20 e IBPCS 41 foram selecionadas por atenderem aos

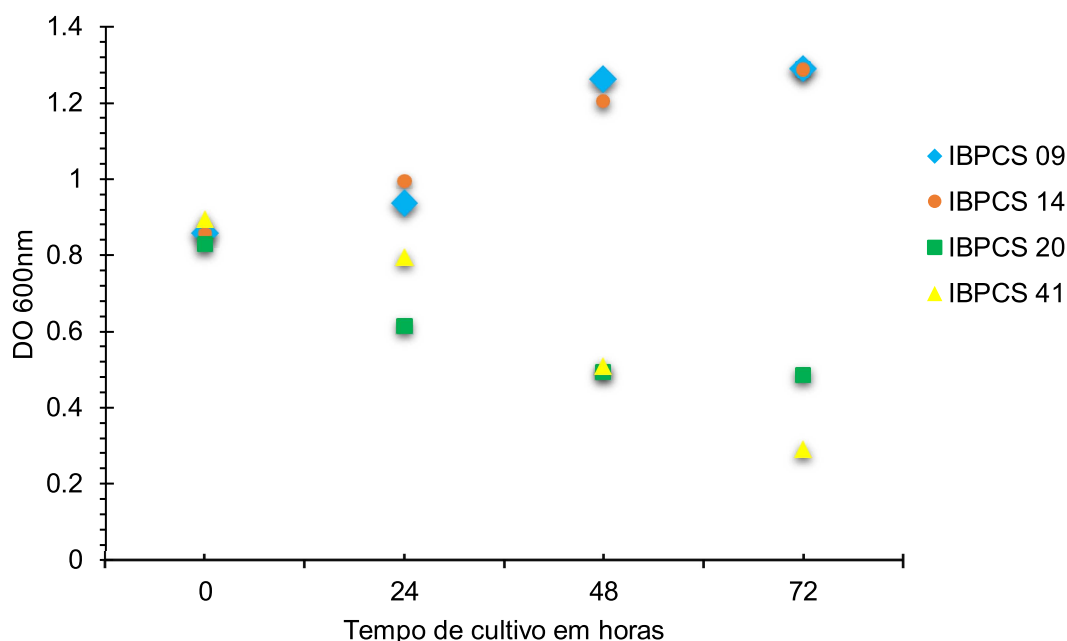
critérios de seleção. Ao final dos testes, os isolados mostraram-se como bacilos Gram-negativos, não fermentadores de lactose, citrato positivo, catalase positivo, oxidase positivo, motilidade positivo e negativo para a formação de indol, H₂S e gás nos tubos de ensaios. Dessa forma, considerou-se presuntivamente tratar-se de 4 microrganismos do gênero *Pseudomonas*.

5.1.2 Avaliação da capacidade de crescimento dos microrganismos selecionados em permeado de soro por osmose reversa

Os microrganismos selecionados foram inoculados ao permeado de osmose reversa com objetivo de avaliar por meio de uma curva de crescimento sua adaptação ao meio de cultivo alternativo. Alíquotas de 80 ml do permeado foram adicionados em erlenmeyer esterilizado em capela de fluxo laminar. Na sequência ocorreu a inoculação dos microrganismos selecionados na proporção de 1%, ou seja, 0,8 mL do inóculo previamente ajustado a uma D.O 600nm de 0,8. A incubação ocorreu em mesa agitadora, contendo 3 frascos inoculados com microrganismo selecionados a uma temperatura de 30°C a 150 rpm por 72 horas.

As leituras óticas foram realizadas a cada 24 horas com utilização de todo o volume incubado em Erlenmeyer para avaliação do crescimento de cada bactéria (IBPCS 09, 14, 20 e 41). As amostras foram centrifugadas e lavadas três vezes com 7,5 mL de salina a 0,85% em tubo Falcon. Com objetivo de realizar avaliação do crescimento celular alíquotas das amostras foram colocadas em cubetas de 1 mL para a leitura em espectrofotômetro. Os resultados encontrados estão destacados nos gráficos a seguir:

Gráfico 1 - Curva de crescimento em permeado de osmose reversa não suplementado a 30°C sob agitação (150 rpm) em 72 horas microrganismos IBPCS 09, 14, 20 e 41.



Fonte: elaborado pelo autor

A partir dos dados obtidos foi observado um melhor crescimento em permeado das bactérias IBPCS 09 e IBPCS 14 que foram selecionadas para a continuidade do estudo devido seu melhor desenvolvimento neste meio. Dessa forma foram eliminados os isolados IBPCS 20 e IBPCS 41 devido menor adaptabilidade ao meio proposto pelo estudo.

5.2 COMPARAÇÃO DO POTENCIAL DE CRESCIMENTO EM PERMEADO SEM SUPLEMENTAÇÃO ENTRE OS MICRORGANISMOS IBPCS 09, IBPCS 14 COM *Pseudomonas aeruginosa* LBI E *Pseudomonas putida* CCMI 852.

Bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* LBI (Laboratório de Biotecnologia Industrial) do IPT (Instituto de Pesquisa Tecnológica de São Paulo) são conhecidas pela capacidade de formação de metabolitos de interesse industrial quando cultivadas sob condições específicas. Esses microrganismos foram isolados de solo contaminado com petróleo e testados quanto à sua capacidade metabólica (BENINCASA *et al.*, 2002). Diversos trabalhos utilizaram como fonte de carbono

resíduos industriais para avaliação da aptidão de crescimento e formação de biossurfactantes em cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* LBI.

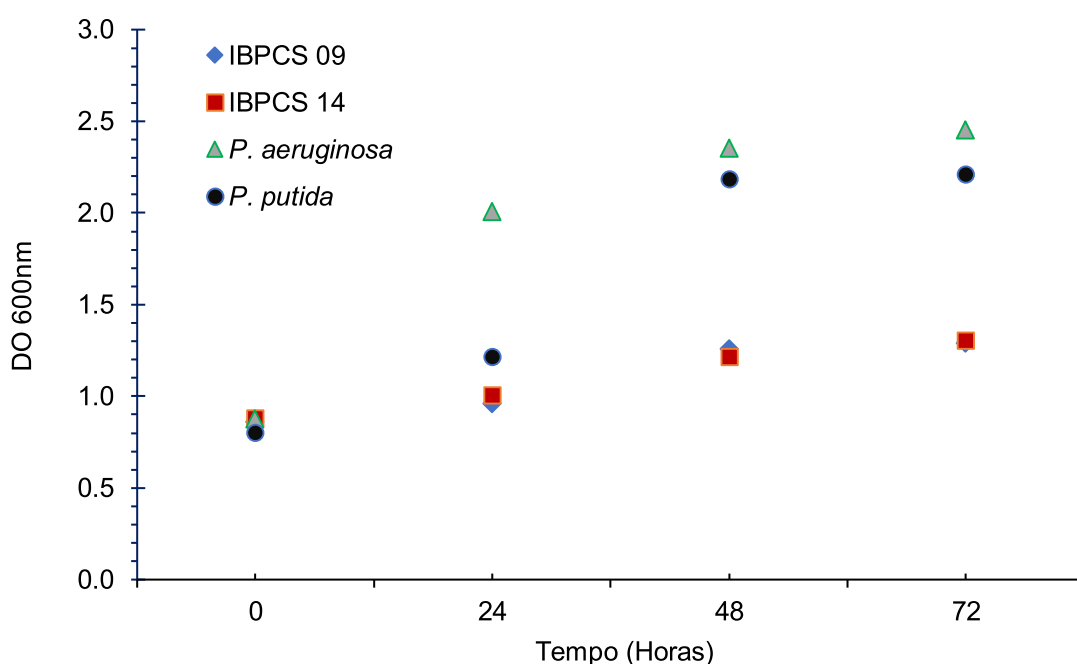
Esses microrganismos apresentaram desempenho variado com possível aplicação na produção de biomoléculas industrialmente atrativas. BENINCASA *et al.*, (2008) em um estudo que objetivou a produção de ramnolipídios através do cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI em um meio cuja fonte de carbono provinha de resíduos do processo de óleo de girassol e como resultado foi obtido um rendimento de 7,3 g.L⁻¹ deste biossurfactante. CAPELINI, (2009) também avaliou a produção de ramnolipídios pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI crescendo em um meio contendo 4% (p/V) de óleo de fritura usado, a 30°C com resultado de geração de 4.001,2 mg.L⁻¹ do biossurfactantes. COSTA *et al.*, (2006) realizou o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI em um meio cuja fonte de carbono provinha óleos de diferentes plantas da flora brasileira. Nesse estudo as maiores concentrações de ramnolipídeos foram obtidas nos óleos da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*) e no Maracujá (*Passiflora alata*) que apresentaram concentrações de 9,9 g.L⁻¹ e 9,2 g.L⁻¹ respectivamente. LOPES *et al.*, (2021) conduziu um estudo que utilizou resíduos da indústria da soja como fonte de carbono em um cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI para a produção de ramnolipídeo. Após 120 horas de cultivo, a concentração total máxima de ramnolipídios obtida foi de 1,434 g.L⁻¹. YOSHIMURA *et al.*, (2022) buscou estudar a produção de ramnolipídios a partir da utilização do óleo de semente de goiaba como fonte de carbono em cultivo utilizando a cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI com duração de 96 horas de fermentação e obteve produção variando de 11,04 a 42,15 g.L⁻¹.

A cepa de *Pseudomonas putida* CCMI 852 (Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais) originalmente isolada de uma estação de tratamento de efluentes de águas residuais localizada em Frielas, freguesia do município de Loures, Portugal, faz parte de uma coleção de culturas de microrganismos de interesse industrial do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG). O microrganismo possui em seu genoma o plasmídeo TOL responsável pela degradação dos principais componentes da gasolina como benzeno, tolueno e xileno (CLARO *et al.*, 2018; MORLETT-CHÁVEZ *et al.*, 2010;) OTENIO *et al.* (2005) em um estudo utilizando um meio mineral líquido contendo Benzeno, Tolueno ou Xileno a 100 mg.L⁻¹ juntamente com suas misturas, evidenciou a velocidade da taxa de degradação que a cepa de

Pseudomonas putida CCMI 852 foi capaz de promover sobre os compostos xileno e tolueno e não sobre o benzeno. Nesse trabalho foi observado que o tolueno foi degradado a uma taxa duas vezes maior que o xileno.

Devido à facilidade de adaptação a diferentes substratos e por possuir diversas vias catabólicas capazes de agir mesmo sob ação de substâncias recalcitrantes as cepas *Pseudomonas aeruginosa* LBI e *Pseudomonas putida* CCMI 852 foram avaliadas em uma curva de crescimento juntamente com as bactérias IBPCS09 e IBPCS14 selecionadas na etapa anterior. O processo de cultivo seguiu os passos descrito no item 4.3.5. O comportamento cinético do crescimento dos microrganismos estão destacados no gráfico 2:

Gráfico 2 - Curva de crescimento em permeado não suplementado a 30°C sob agitação (150 rpm) por 72 horas microrganismos IBPCS 09, 14, *P. putida* CCMI 852 e *P. aeruginosa* LBI.



Fonte: elaborado pelo autor

As leituras obtidas no início do cultivo indicam um tempo de adaptação reduzido e uma rápida entrada na fase exponencial observada pelo aumento da D.O 600nm ocorrido no inóculo da cepa *Pseudomonas aeruginosa* LBI durante as primeiras 24 horas de incubação. O inóculo realizado com *Pseudomonas aeruginosa* LBI tem dinâmica diferenciada em relação aos demais em alguns aspectos. Ocorre de forma progressiva um aumento dos valores obtidos nas leituras em espectrofotômetro entre

os tempos 24, 48 e 72 horas. Isso pode ser explicado pelo aumento celular responsável por elevar de forma crescente os índices de D.O (600nm) indicando uma rápida adaptação deste microrganismo ao meio.

O inóculo de *Pseudomonas putida* CCMI 852 apresentou uma menor multiplicação celular o nas primeiras 24 horas de incubação quando comparada à cepa de *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Ocorreu um aumento gradual de D.O (600nm) que representou a segunda maior leitura por espectrofotometria entre os quatro microrganismos testados nesta fase.

Os inóculos IBPCS09 e IBPCS14 se comportam de forma similar durante todo o período estabelecido para o cultivo. Observando o gráfico 2 fica evidente a similaridade do padrão de crescimento destes microrganismos na curva. Ocorre nas primeiras 24 horas de cultivo a entrada na fase estacionária, seguido da estabilização do crescimento celular evidenciado pela manutenção nos índices de D.O 600nm observados ao final do período estipulado para o término da curva.

É importante destacar que todas as bactérias se desenvolveram no meio testado sem que houvesse a necessidade de suplementação. Isto foi demonstrado pelo aumento da D.O 600 nm o que indica viabilidade celular e predisposição para a multiplicação dos microrganismos escolhidos no meio proposto.

CLARO, (2017) ao estudar a biodegradação de gasolina e óleo diesel utilizando biossurfactantes produzidos por *Pseudomonas* ssp. confirmou a adaptação e crescimento das cepas de *Pseudomonas aeruginosa* LBI e *Pseudomonas putida* CCMI 852 em um meio composto por soro de ricota por meio do crescimento celular medido através de D.O (600 nm) expresso em peso seco g.L^{-1} , obtido a partir de uma curva padrão que alcançou $1,2 \text{ g.L}^{-1}$ em 120 horas.

DE GIORGI *et al.*, (2018) ao estudar o potencial utilização de soro de ricota para produção de ácido lactobiônico por cepas de *Pseudomonas taetrolens* evidenciou um aumento celular de 107 UFC/mL para 109 UFC/mL em 48 horas de cultivo seguida de uma diminuição progressiva da contagem de células.

SUDHAKAR BABU *et al.*, (1996) estudou a capacidade de crescimento em soro da cepa *Pseudomonas aeruginosa* e sua cinética de produção de biossurfactante partir deste e de outros resíduos industriais. Nesse estudo, uma suspensão de 2% v/v de uma cultura da cepa *Pseudomonas aeruginosa* padronizada por D.O 610nm = 1,0

foi inoculada no soro a 30°C e permaneceu sob agitação a 200 rpm em agitador rotativo por 50 horas. O cultivo apresentou maior concentração na 36ª hora quando a biomassa apresentou 1,98 g.mL⁻¹ demonstrando a viabilidade de crescimento deste microrganismo em soro e outros resíduos industriais.

5.2.1 Avaliação dos constituintes presentes no permeado de osmose reversa não suplementado

O permeado de osmose reversa não suplementado juntamente com as amostras de sobrenadante resultante do processo de centrifugação descrito no item 4.3.5 foram avaliados quanto a composição de seus constituintes por cromatografia líquida de alta eficiência e os resultados estão demonstrados a seguir. A tabela 8 mostra o resultado da avaliação por cromatografia da composição inicial do permeado não suplementado neutralizado e esterilizado.

Tabela 8 – Constituintes do permeado de soro de leite obtido por osmose reversa não suplementado.

Amostra	Composto	Quantidade mg.mL⁻¹
Permeado de soro de leite obtido por osmose reversa não suplementado	Lactose	1,555
	Galactose	0,019

Fonte: elaborado pelo autor.

Foram encontrados dois compostos no permeado não suplementado. Dois carboidratos se mostraram presentes sendo um dissacarídeo a lactose e um monossacarídeo a galactose. O teor de galactose encontrado foi estabelecido em pequenas quantidades na faixa de 0,019 mg.mL⁻¹. É possível perceber que a lactose é o composto que possui maior concentração encontrado na quantidade na faixa de 1,555 mg.mL⁻¹.

O soro de leite contém lactose em concentrações que podem variar de 4,2 a 4,6%. De certa forma, sua presença no permeado de soro de leite é esperada pois parte deste composto flui para o permeado durante o processo de filtração por

membranas. A constituição do permeado gerado no processo de filtração é definida por diferentes fatores. Portanto diferenças entre a tecnologia aplicada na sua obtenção (UF, OR, MF, NF), vida útil do conjunto de membranas, grau de conservação o equipamento, o modelo de membrana utilizado, temperatura e pressão de trabalho adotados no processo, configuram uma série de fatores que podem alterar as características constitucionais do permeado formado e conseqüentemente mudar o teor final de lactose no produto (ASUNIS, 2020; RISNER, 2020; ROCHA; GUERRA, 2020).

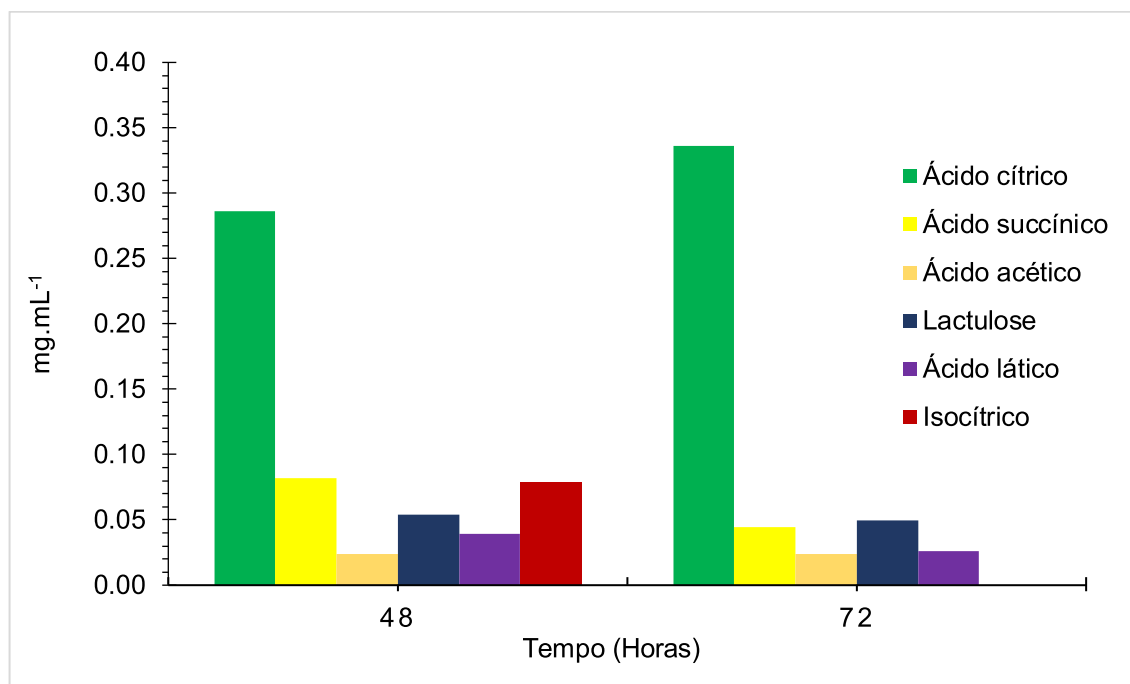
É importante destacar que o equipamento OR gerador do permeado de soro de leite utilizado como meio de cultivo no período do estudo estava no final da vida útil determinada pelo fabricante com prazo de substituição dos componentes filtrantes já estabelecido devido constatação prévia de desgaste. Essa condição possibilitou a passagem de sólidos no processo de filtração o que auxilia na explicação dos teores de lactose encontrados nas amostras não suplementadas evidenciadas na tabela 8.

5.2.2 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo da bactéria IBPCS14 com permeado de soro de leite obtido por osmose reversa suplementado e não suplementado

5.2.2.1 Avaliação dos metabolitos formados pelo microrganismo IBPCS14 em Permeado de osmose reversa não suplementado

O permeado não suplementado, neutralizado e esterilizado em autoclave foi inicialmente cultivado com cada um dos microrganismos selecionados de acordo com o processo descritos no item 4.3.5. O sobrenadante proveniente deste cultivo foi retirado, congelado e analisado quanto à sua composição. As amostras dos cultivos foram analisadas com base em cada microrganismo cultivado separadamente e os compostos encontrados estão destacados de acordo com sua formação na curva de crescimento. As amostras do cultivo realizado em permeado não suplementado foram testadas em dois momentos, 48 e 72 horas após a inoculação dos microrganismos. No gráfico 3 está destacado os metabolitos formados durante o crescimento do microrganismo IBPCS14 em permeado não suplementado:

Gráfico 3 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR não suplementado



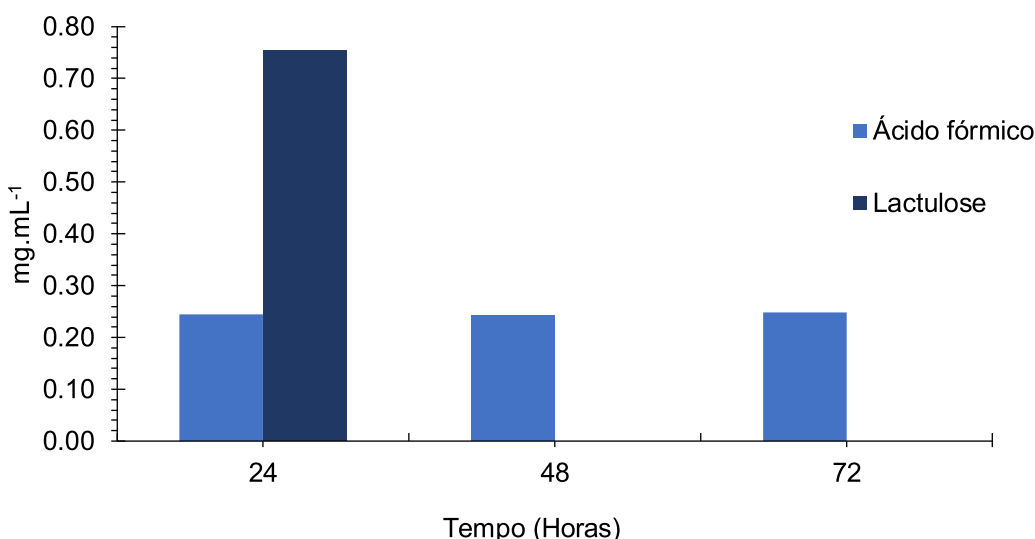
Fonte: elaborado pelo autor

O ácido cítrico apresentou uma concentração de 0,286 mg.mL⁻¹ na primeira leitura realizada 48 horas após o início da execução da curva de crescimento do microrganismo IBPCS14 em permeado não suplementado. A leitura realizada no tempo 48 também demonstrou a presença de ácido succínico a 0,082 mg.mL⁻¹, ácido acético a 0,023 mg.mL⁻¹, além de ácido láctico, ácido isocítrico e lactulose a 0,039 mg.mL⁻¹, 0,078 mg.mL⁻¹ e 0,054 mg.mL⁻¹ respectivamente. O composto que atingiu maior concentração nesta curva de crescimento foi o ácido cítrico que 72 horas após a inoculação atingiu o pico chegando a 0,336 mg.mL⁻¹. Os ácidos succínico e láctico, reduziram suas concentrações para 0,044 mg.mL⁻¹ e 0,026 mg.mL⁻¹ respectivamente. O ácido isocítrico não foi detectado na leitura realizadas neste tempo. A lactulose evidenciada na primeira leitura sofreu ligeira redução de concentração permanecendo com 0,049 mg.mL⁻¹. O ácido acético não sofreu alteração de concentração significativa permanecendo ao final do cultivo com 0,024 mg.mL⁻¹.

5.2.2.2 Avaliação dos metabólitos formados pelo microrganismo IBPCS14 em cultivo com permeado de osmose reversa adicionado de Sais de Robert

Após o tratamento para neutralização e esterilização as amostras de permeado de soro de osmose reversa sofreu a adição do meio mínimo de sais de Robert anteriormente preparado nas proporções de 25 e 50%, sendo então inoculadas como descrito no item 4.3.5. O processo de obtenção, armazenamento e análise seguiu os moldes descritos no item anterior. Os compostos formados no cultivo suplementados do permeado com microrganismo IBPCS14 estão apresentados de acordo com sua formação em cada tempo da curva de crescimento. O gráfico abaixo, destaca os metabólitos formados em permeado suplementado com 25% de sais de Robert:

Gráfico 4 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Robert

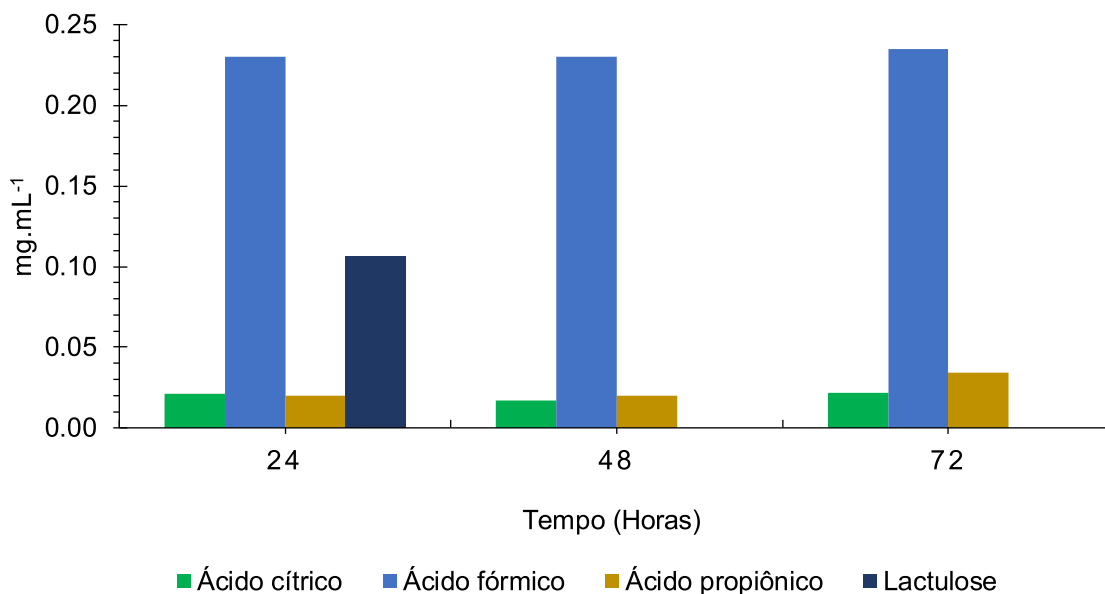


Fonte: elaborado pelo autor.

A formação dos metabólitos originados da curva de crescimento da bactéria IBPCS14 suplementado com 25% de sais de Robert ocorreu de maneira distinta. Nesta corrida cromatográfica, observou-se a presença de lactulose já nas primeiras 24 horas de cultivo chegando a 0,754 mg.mL⁻¹, sendo reduzido a zero na verificação realizado no tempo 48 horas e 72 horas. O ácido fórmico aumentou sua concentração de zero para 0,248 mg.mL⁻¹ nas primeiras 24 horas mantendo esta concentração até o término da curva.

Já a curva de crescimento do microrganismo IBPCS14 suplementado com sais de Robert a 50% promoveu o surgimento de outra configuração de metabólitos nas amostras de sobrenadantes. O gráfico abaixo destaca os resultados encontrados:

Gráfico 5 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Robert



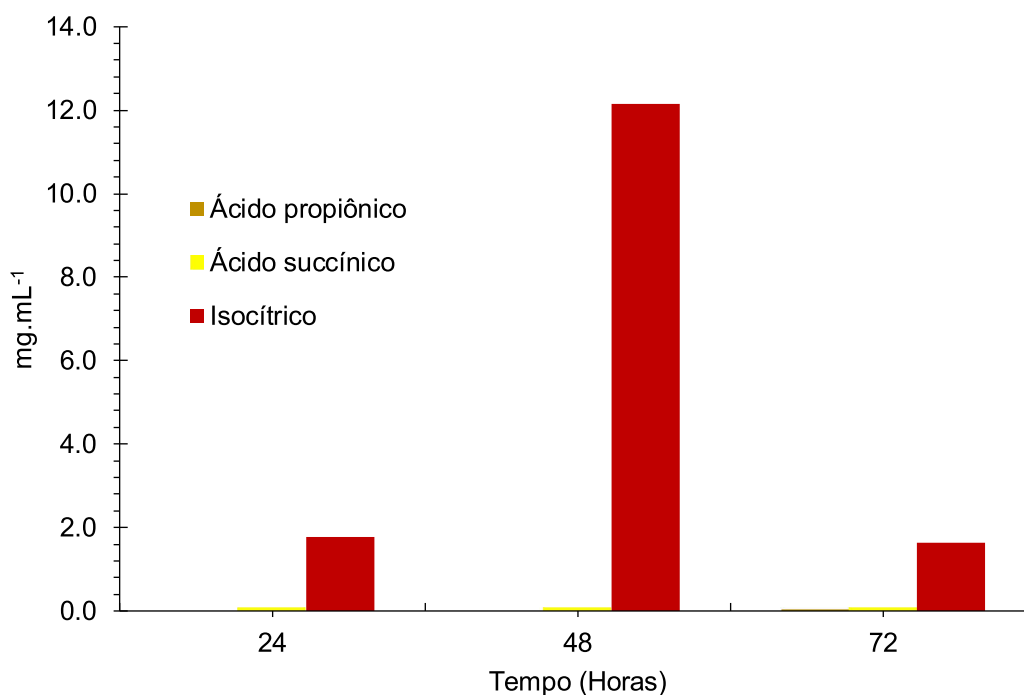
Fonte: elaborado pelo autor.

Nessa curva, o metabólito que apresentou maior concentração ao longo da curva foi o ácido fórmico formado nas primeiras 24 horas de cultivo na proporção de 0,235 mg.mL⁻¹. Esse composto manteve essa concentração até o término da curva sem sofrer alterações significativa. O ácido propiônico foi observado ao final das primeiras 24 horas de cultivo em uma concentração e 0,020 mg.mL⁻¹, permaneceu com a mesma concentração no tempo 48 horas e ampliou seu teor para 0,034 mg.mL⁻¹ durante a última aferição realizada no tempo 72 horas. O ácido cítrico apresentou na leitura realizada no tempo 24 horas a concentração de 0,021 mg.mL⁻¹, sofrendo ligeira redução para 0,017 mg.mL⁻¹ no tempo 48 horas e voltando para 0,022 mg.mL⁻¹ ao término da curva no final de 72 horas de cultivo. A lactulose foi detectada somente no primeiro ponto da curva com uma concentração de 0,106 mg.mL⁻¹ não sendo mais percebida durante as demais leituras desta curva.

5.2.2.3 Avaliação dos metabólitos formados pelo microrganismo IBPCS14 em cultivo com permeado adicionado de Sais de Bushnell-Haas

Os metabólitos produzidos no cultivo da bactéria IBPCS14 com sais de Bushnell-Haas na proporção de 25% apresentaram características singulares. O gráfico a seguir demonstra a formação destes compostos:

Gráfico 6 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% Sais de Bushnell-Haas



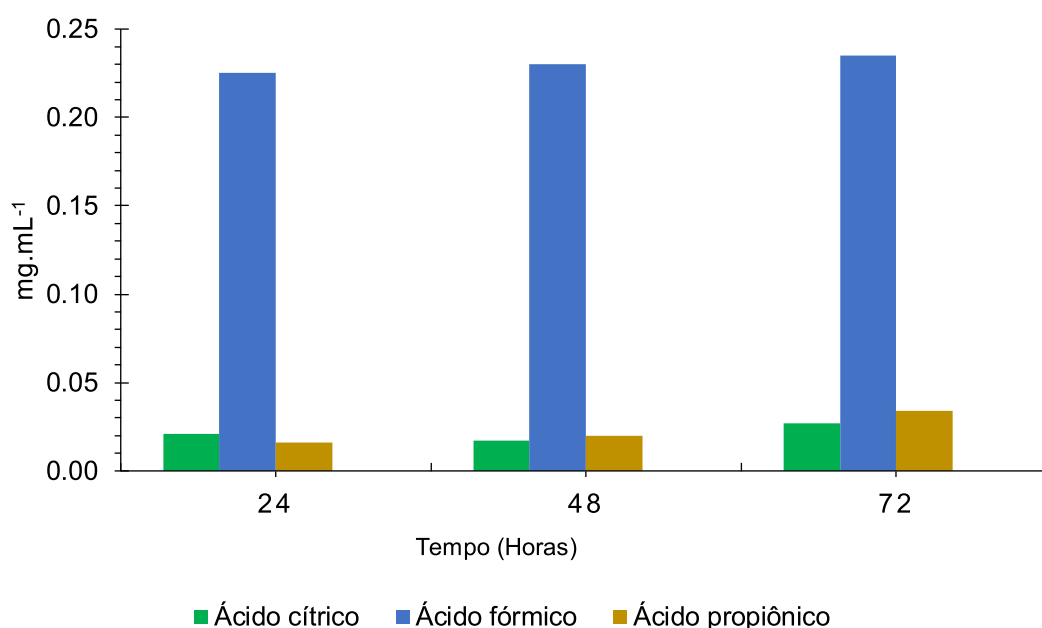
Fonte: elaborado pelo autor.

Como destacado os ácidos propiônico, e succínico apresentaram apenas traços na quantificação cromatográfica realizada nesse cultivo. O ácido propiônico não foi detectado durante os dois primeiros pontos de avaliação do cultivo. Somente na última aferição realizada no tempo 72 horas sua concentração foi aferida em 0,034 mg.mL⁻¹. O ácido succínico foi detectado na concentração de 0,075 mg.mL⁻¹ no tempo

24 horas. No tempo 48 horas sua concentração reduziu para $0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$, seguido de um aumento para $0,082 \text{ mg.mL}^{-1}$ registrado na leitura do tempo 72 horas. Entretanto o ácido isocítrico foi o metabólito que obteve uma concentração relevante registrada no tempo 48 horas com $12,151 \text{ mg.mL}^{-1}$. Contudo no tempo 72 horas houve uma redução de sua concentração para $1,638 \text{ mg.mL}^{-1}$.

No cultivo da bactéria B14 em permeado na concentração de 50% houve formação de quatros ácidos e três carboidratos. No gráfico a seguir é destacado os compostos formados:

Gráfico 7 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS14 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Bushnell-Haas



Fonte: elaborado pelo autor.

Nesta corrida cromatográfica o ácido que apresentou maior concentração ao longo da execução da curva foi o ácido fórmico que atingiu no último tempo $0,235 \text{ mg.mL}^{-1}$. O ácido cítrico e o ácido propiônico obteve concentração semelhante com teor final de $0,027 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,034 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente.

O microrganismo IBPCS14 apresentou comportamento metabólico distinto durante a execução da curva de crescimento. Diversos foram os metabólitos formados, contudo a maior relevância quantitativa apresentada foi do ácido isocítrico

formado no tempo 48 horas da curva de crescimento suplementado com sais de Bushnell-Haas a 25% na concentração de 12,151 mg.mL⁻¹.

O ácido isocítrico está presente na natureza devido sua ocorrência natural do ciclo energético dos ácidos tricarboxílicos realizado por todo os organismos vivos (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013). Apesar do metabólito ter alcançado índice considerável, quando comparado a outros microrganismos, percebe-se uma menor eficiência da produção deste ácido. No estudo realizado por KAMZOLOVA, (2013) avaliou a produção de ácido isocítrico pela levedura *Yarrowia lipolytic* VKM Y-2373 a partir de óleo de colza apresentou produção de 86 g.L⁻¹. Entretanto, o cultivo foi realizado em biorreator com capacidade de 10 litros contendo 5 litros de uma mistura formado por óleo de colza, suplementado com sulfato de amônia, fosfato monopotássico, fosfato dipotássico, sulfato de magnésio, nitrato de cálcio e cloreto de sódio, além de extrato de levedura. Este cultivo teve duração de 6 dias.

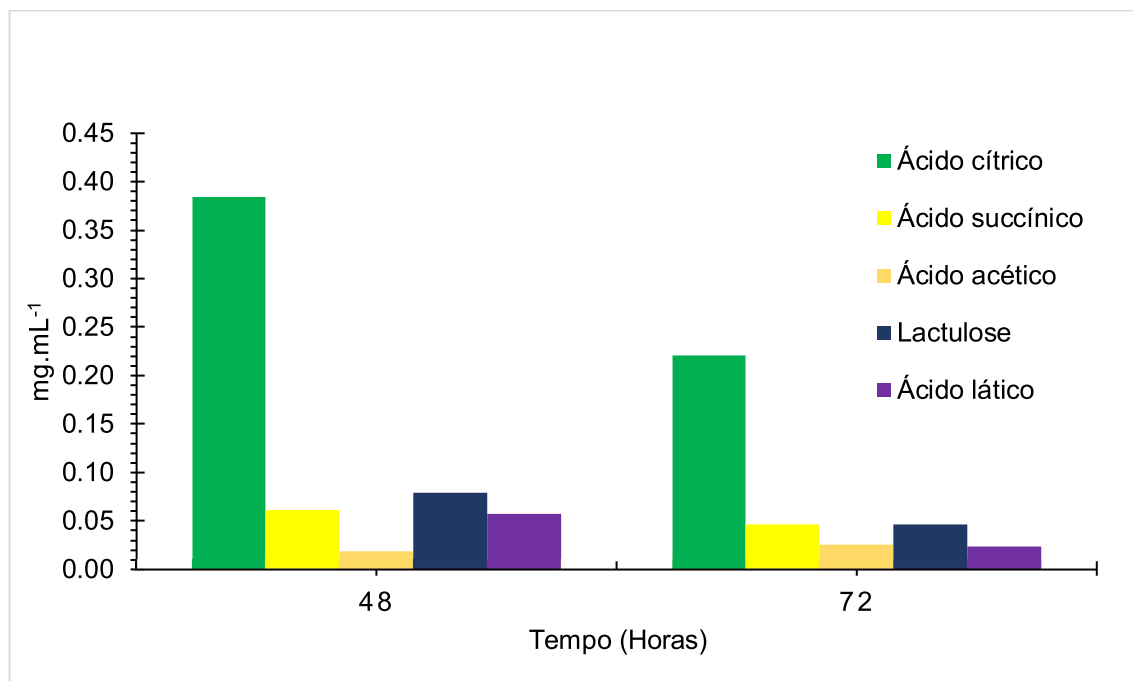
Outro trabalho realizado por RZECHONEK, (2019) com a mesma levedura num cultivo asséptico a partir de glicerol bruto atingiu 42,5 ± 2,4 g.L⁻¹. MORGUNOV, (2020) estudou a formação de ácido isocítrico pela levedura *Y. lipolytic* VKM Y-2373 cultivadas um em um processo alterado por adição de biodiesel em diferentes proporções que permitiu aumentar a concentração do composto de 58,32 para 90,2 g.L⁻¹.

5.2.3 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo da bactéria IBPCS09 com permeado de soro de leite obtido por osmose reversa suplementado e não suplementado.

5.2.3.1 Avaliação dos metabolitos formados pelo microrganismo IBPCS09 em Permeado não suplementado

As amostras deste microrganismo no cultivo realizado em permeado não suplementado foram testadas em dois momentos, 48 e 72 horas após a inoculação. As características metabólicas estão destacadas no gráfico 8 a seguir:

Gráfico 8 – Produção de metabólitos bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR não suplementado



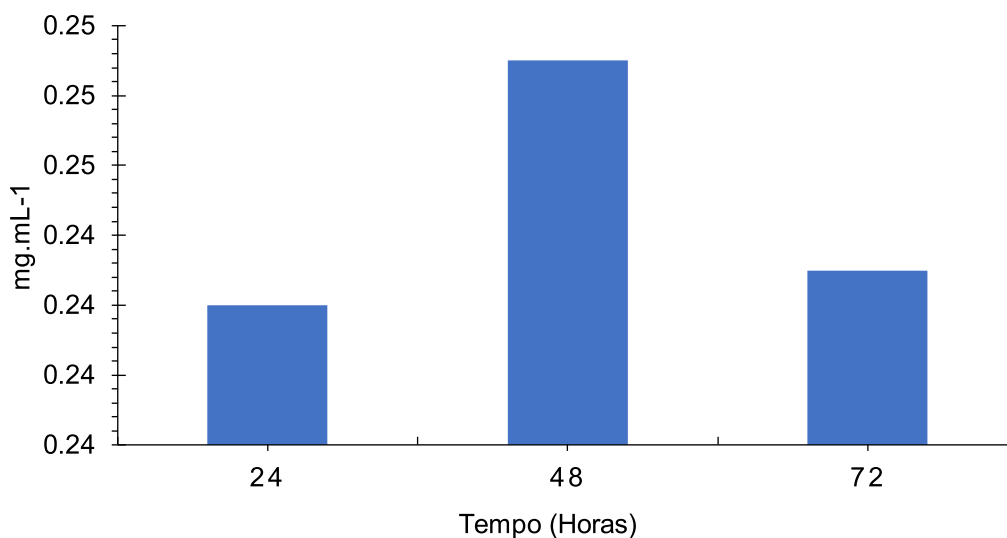
Fonte: elaborado pelo autor.

Na curva de crescimento da bactéria IBPCS09 em permeado não suplementado foi identificado a presença de cinco metabólitos. A lactulose se mostrou presente 48 horas após a inoculação com concentração de 0,0792 mg.mL⁻¹. Na última leitura realizada 72 horas após o início do cultivo sua concentração reduziu para 0,046 mg.mL⁻¹. O ácido succínico apresentou no tempo 48 horas a formação de 0,061 mg.mL⁻¹ e na aferição realizada no tempo 72 horas foi possível observar uma redução para 0,046 mg.mL⁻¹. O ácido acético formou na primeira leitura 0,0185 mg.mL⁻¹ e na leitura subsequente apresentou uma concentração de 0,0258 mg.mL⁻¹ demonstrando um ligeiro aumento ao final da curva. Já o ácido láctico apresentou na primeira leitura a concentração de 0,0569 mg.mL⁻¹ e na segunda seu volume foi reduzido para 0,0239 mg.mL⁻¹. O ácido cítrico apresentou melhor desempenho nesta curva alcançando na leitura de 0,384 mg.mL⁻¹ no tempo 48 horas seguido de uma redução da sua concentração para 0,2204 mg.mL⁻¹.

5.2.3.2 Avaliação dos metabólitos formados pelo microrganismo IBPCS09 em Sais de Robert

A bactéria IBPCS09 cultivada com sais de Robert a 25% apresentou formação de um ácido orgânico ao longo da realização da curva. No gráfico a seguir está destacado a concentração do metabólito encontrado em três tempos distintos:

Gráfico 9 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Robert

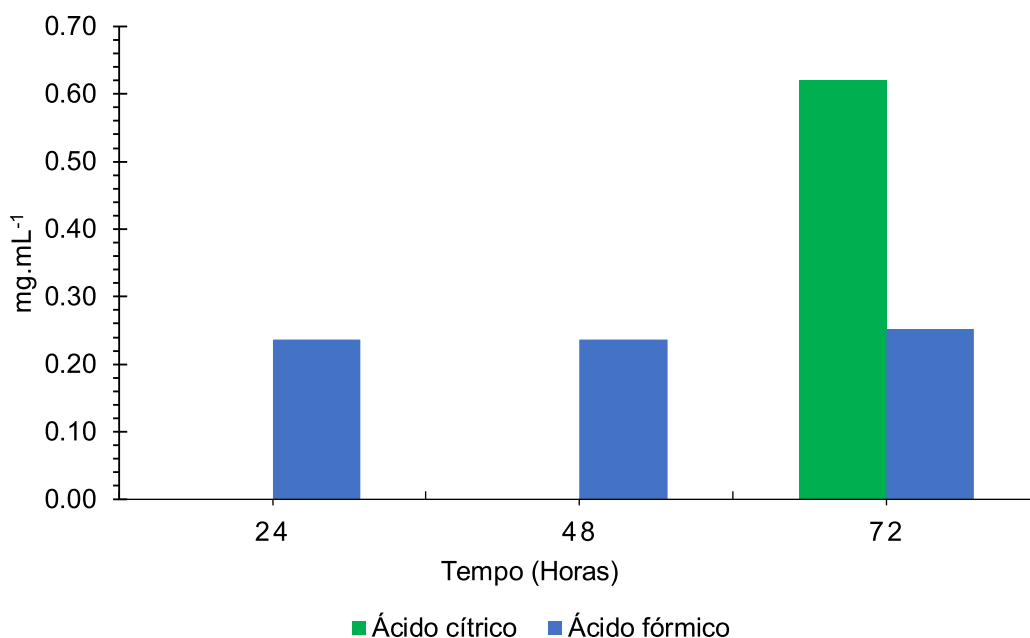


Fonte: elaborado pelo autor.

O cultivo em permeado da bactéria IBPCS09 com suplementação a 25% com sais de Robert produziu ácido fórmico já nas primeiras 24 horas quando foi observado a presença de 0,242 mg.mL⁻¹. O teor máximo alcançado foi de 0,249 mg.mL⁻¹ observado 48 horas após o início da curva. Posteriormente na terceira leitura realizada no tempo 72 horas foi observado uma redução na concentração deste metabólito onde foi constatado a presença de 0,243 mg.mL⁻¹ de ácido fórmico no sobrenadante avaliado.

Durante a suplementação com 50% de sais de Robert a bactéria IBPCS09 foi observado a presença do ácido cítrico e do ácido fórmico nas amostras de sobrenadantes analisadas. No gráfico abaixo é destacado o comportamento destes compostos ao longo da realização desta curva.

Gráfico 10 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado em 50% de sais de Robert



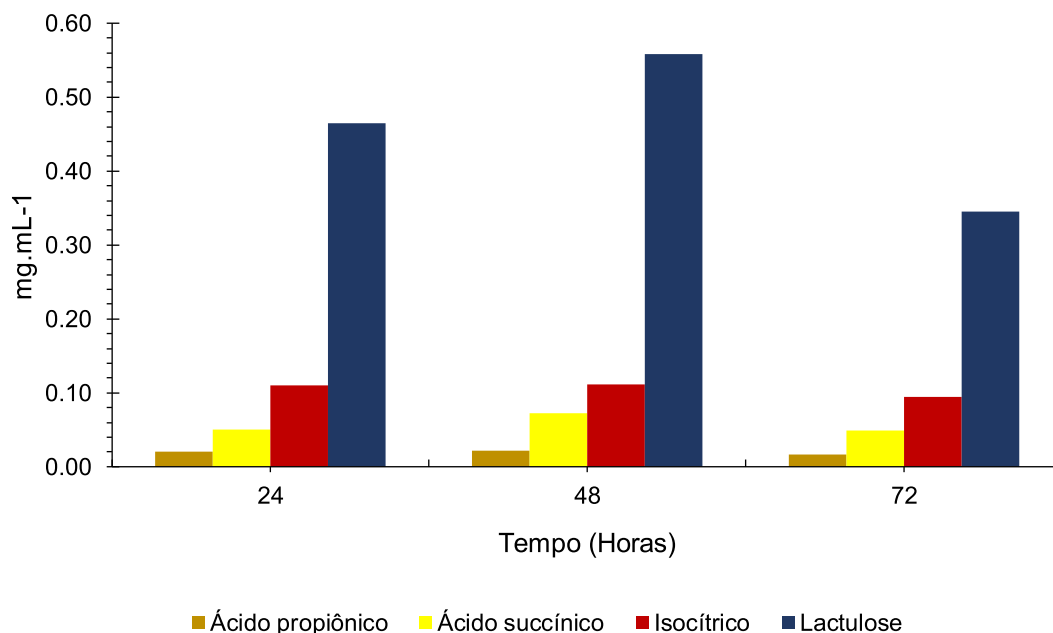
Fonte: elaborado pelo autor.

O ácido fórmico atingiu nas primeiras 24 horas uma concentração de 0,236 mg.mL⁻¹. No tempo 48 horas a concentração deste metabólito se manteve estável e ao final do tempo 72 horas a concentração deste metabólito atingiu 0,252 mg.mL⁻¹ no final da curva. Cabe destacar que apesar de não ter sido evidenciada a presença nas duas primeiras corridas cromatográficas o ácido cítrico obteve melhor desempenho ao atingir 0,621 mg.mL⁻¹ no tempo 72 horas, sendo o composto mais concentrado desta curva.

5.2.3.3 Avaliação dos metabólitos formados pelo microrganismo IBPCS09 em Sais de Bushnell-Haas

A bactéria IBPCS09 ao ser cultivada com permeado adicionado de sais de Bushnell-Haas a 25% apresentou a formação de quatro ácidos orgânicos e dois carboidratos. A concentração de cada metabólito e seu padrão de formação ao longo do tempo estão apresentados no gráfico abaixo:

Gráfico 11 - Produção de metabólitos bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Busnhell-Haas

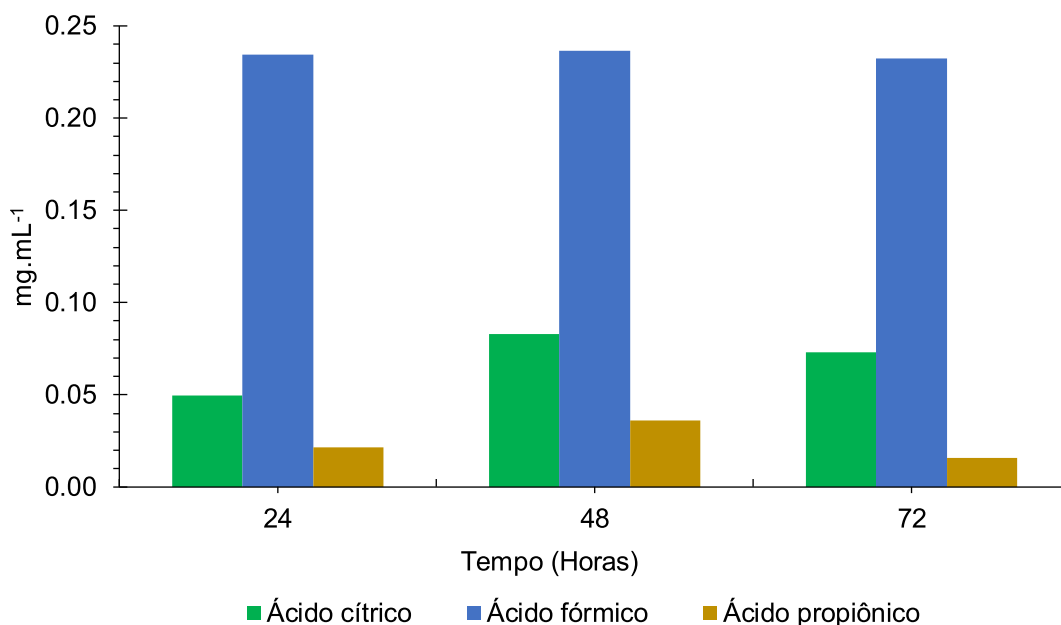


Fonte: elaborado pelo autor.

Para esta suplementação foram evidenciados três ácidos orgânicos sendo eles, o isocítrico, o propiônico e o succínico juntamente com um carboidrato, a lactulose. O ácido propiônico apresentou durante o decorrer da curva a concentração de 0,020 mg.mL⁻¹, após 24 horas, 0,022 mg.mL⁻¹ no tempo 48 e 0,017 mg.mL⁻¹ ao final de 72 horas de cultivo. O comportamento cinético da formação de ácido succínico apresentado nesta curva foi de 0,050 mg.mL⁻¹ no tempo 24 horas, 0,072 mg.mL⁻¹ no tempo 48 horas e 0,049 mg.mL⁻¹ no tempo 72 horas. Já o ácido isocítrico também manteve linearidade durante sua formação nesta curva apresentando 0,110 mg.mL⁻¹, 0,112 mg.mL⁻¹ e 0,095 mg.mL⁻¹ respectivamente. O composto que apresentou maior concentração no meio suplementado com sais de B.H a 25% foi a lactulose que na primeira amostra apresentou a formação de 0,465 mg.mL⁻¹. Na segunda amostra de sobrenadante analisada no tempo 48 horas foi evidenciado a maior concentração deste metabólito a 0,558 mg.mL⁻¹ seguido de uma redução para 0,345 mg.mL⁻¹ ao final desta curva.

Na concentração a 50% de sais de Bushnell-Haas também foram observados a formação de três ácidos orgânicos. A configuração da formação estes metabólitos estão demonstrados abaixo no gráfico.

Gráfico 12 - Produção de metabólitos Bactéria IBPCS09 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Bushnell-Haas



Fonte: elaborado pelo autor.

O ácido cítrico apresentou a concentração de 0,0498 mg.mL⁻¹ 24 horas após o início do cultivo. Sua maior concentração ocorreu em 48 horas quando foi observado a formação de 0,0830 mg.mL⁻¹ seguido de uma ligeira retração a 0,0728 mg.mL⁻¹ em 72 horas de cultivo. O ácido propiônico foi observado na primeira amostra avaliada no tempo 24 horas a 0,022 mg.mL⁻¹ seguido de um aumento da concentração no tempo 48 horas a 0,036 mg.mL⁻¹ voltando a reduzir sua concentração no final da curva onde foi observado um volume de 0,016 mg.mL⁻¹ deste composto. O ácido fórmico apresentou a maior concentração no cultivo deste microrganismo em permeado adicionado de sais de B.H a 50%. Foi observado a formação de 0,235 mg.mL⁻¹ já nas primeiras 24 horas de cultivo permanecendo desta forma nas demais amostras avaliadas neste cultivo.

A bactéria IBPCS09 quando observada quanto a sua capacidade metabólica se mostrou capaz de formar dois compostos em maior concentração. O primeiro composto que destacou foi o ácido cítrico observado no cultivo em permeado suplementado com sais de Robert na proporção 50% formou 0,621 mg.mL⁻¹. O ácido cítrico é considerado um dos ácidos orgânicos fracos mais valiosos do mercado e sua produção por abordagens biotecnológicas tem sido bastante estudada.

Num estudo realizado por AMATO; BECCI; BEOLCHINI, (2020) avaliou-se diversas patentes a fim de identificar viabilidade de implementação em escala real de processos fermentativos para produção de ácido cítrico, a partir de resíduos industriais e cepas recombinantes de *Aspergillus niger* com alta taxa de conversão, contendo cerca de $1,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido cítrico por hora.

Já DHILLON, (2011) trabalhando com *Aspergillus niger* NRRL 567 e NRRL 2001 cultivados com lodo de ultrafiltração de bagaço de maçã suplementados com 3% (v/v) de etanol e 4% (v/v) de metanol conseguiu obter valores mais elevados de ácido cítrico de $18,2 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ e $13,9 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente.

O segundo metabólito que aparece em maior concentração no cultivo da bactéria IBPCS 09 em permeado suplementado foi a lactulose com $0,558 \text{ mg.mL}^{-1}$ observado no cultivo adicionado de 25% de sais de Bushnell-Haas. A lactulose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutose) é um dissacarídeo sintético não digerível cujos monômeros, galactose e frutose estão ligados por uma ligação β -glicosídica (MAO *et al.*, 2014). A lactulose atualmente é produzida por síntese química envolvendo a isomerização alcalina da lactose (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017). Cabe destacar que os índices de rendimento de lactulose encontrados neste cultivo microbiano pode ter sido formados durante o processo de esterilização onde o permeado foi aquecido a 121°C por 15 minutos em autoclave antes de ser utilizado como meio de cultivo e a concentração deste composto pode não estar ligado diretamente ao metabolismo bacteriano do microrganismo utilizado neste cultivo.

Entretanto diversos estudos usaram enzimas isoladas para a obtenção de lactulose. KIM e OH, (2012) num trabalho realizado quanto a obtenção de lactulose observaram a formação deste composto a partir da utilização da lactose, como substrato único, de uma enzima denominada celobiose-2-epimerase recombinante termoestável de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* com rendimento e a produtividade de lactulose de $258 \text{ g.L}^{-1}\cdot\text{hora}$.

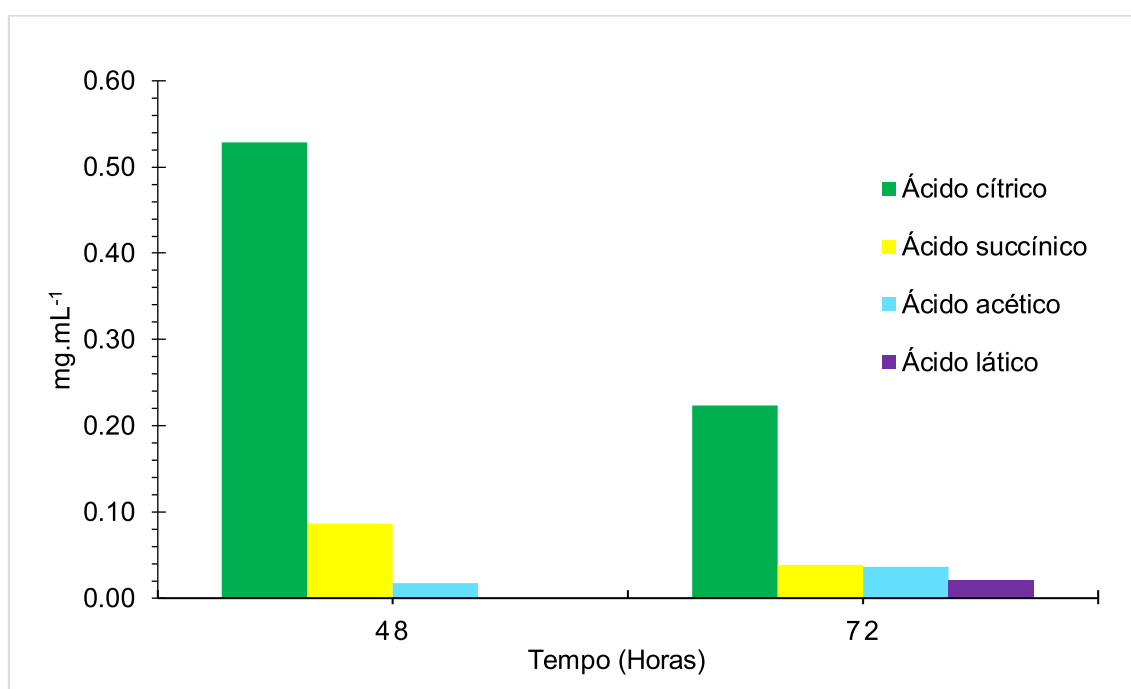
Outro estudo realizado por KIM; PARK; OH, (2006) avaliou a produção de lactulose a partir de lactose e frutose por uma β -galactosidase termoestável de *Sulfolobus solfataricus* onde sob condições ótimas, a β -galactosidase de *S. solfataricus* produziu aproximadamente 50 g.L^{-1} de lactulose em 6 horas de tempo de reação com uma produtividade de $8,3 \text{ g.L}^{-1}\cdot\text{hora}$.

5.2.4 Avaliação da formação de metabólitos no cultivo *Pseudomonas putida* CCMI 852 com permeado não suplementado e suplementado.

5.2.4.1 Avaliação dos metabólitos formados pelo microrganismo *Pseudomonas putida* CCMI 852 em Permeado não suplementado

A bactéria *Pseudomonas putida* CCMI 852 inoculada em permeado não suplementado apresentou a formação de quatro metabólitos que estão destacados no gráfico a seguir. As amostras neste cultivo foram testadas em dois momentos, 48 e 72 horas após a inoculação dos microrganismos.

Gráfico 13 - Produção de metabólitos *Pseudomonas putida* CCMI 852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR não suplementado



Fonte: elaborado pelo autor.

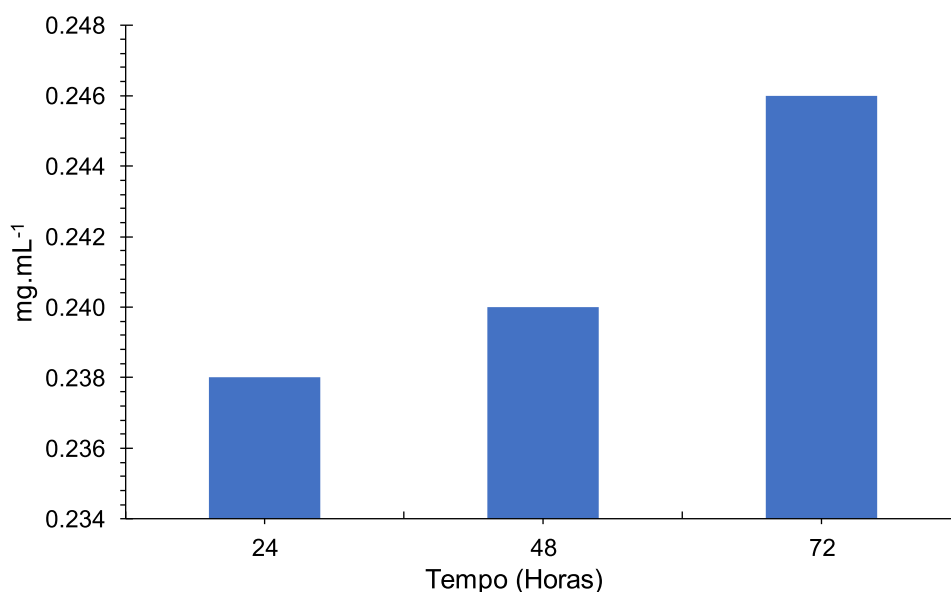
Foi detectada a presença de quatro ácidos orgânicos distintos nesta corrida. A primeira leitura apresentou a formação de 0,0175 mg.mL⁻¹ de ácido acético no tempo 48 horas, seguido de uma ampliação da concentração para 0,0369 mg.mL⁻¹ ao final da curva. A concentração do ácido succínico foi aferida 48 horas após o início do cultivo em 0,0869 mg.mL⁻¹. Na leitura realizada no segundo ponto da curva foi observado uma redução para 0,0382 mg.mL⁻¹ da concentração deste composto. Também foi observado no tempo 72 horas da curva de crescimento a formação de

0,0212 mg.mL⁻¹ de ácido láctico. O metabólito encontrado em maior concentração neste cultivo foi o ácido cítrico que obteve no tempo 48 horas a concentração de 0,528 mg.mL⁻¹. A concentração deste metabólito no segundo ponto de avaliação realizado no tempo 72 horas da curva apresentou uma redução para 0,2239 mg.mL⁻¹.

5.2.4.2 Avaliação dos metabólitos formados pelo microrganismo *Pseudomonas putida* CCMI 852 em Sais de Robert

Para o cultivo de *Pseudomonas putida* CCMI 852 em permeado suplementado com sais de Robert a 25% foi observado a formação de apenas um metabólito que está destacado no gráfico a seguir:

Gráfico 14 - Produção de metabólitos *Pseudomonas putida* CCMI 852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Robert



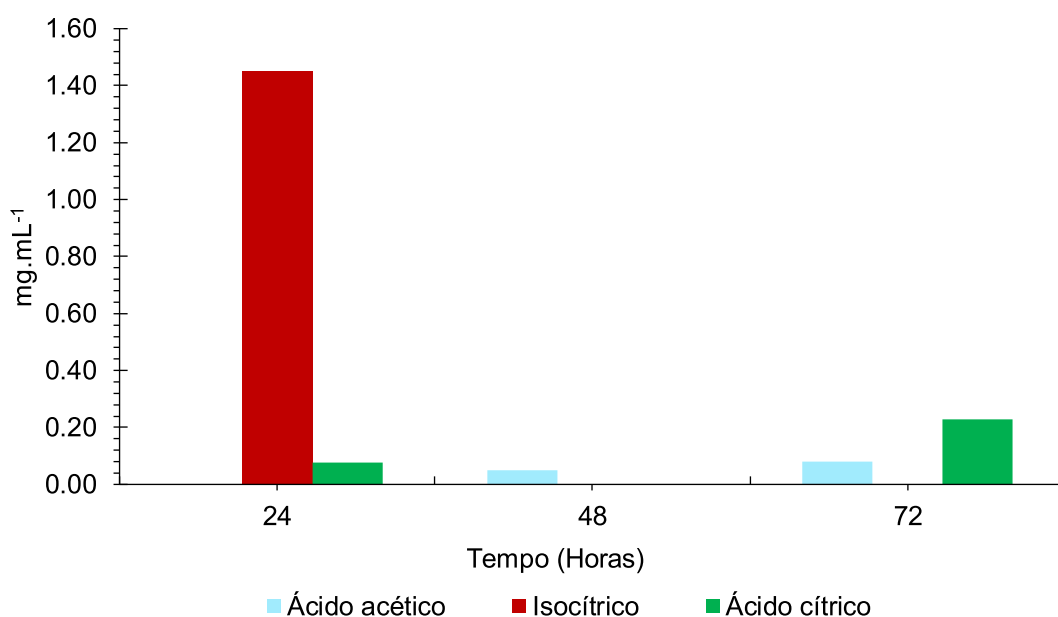
Fonte: elaborado pelo autor.

A análise cromatográfica do sobrenadante obtido após a aferição do primeiro ponto da curva de crescimento do cultivo de *Pseudomonas putida* CCMI 852 em permeado de osmose reversa suplementado com sais de Robert a 25% confirmou a formação nas primeiras 24 horas de cultivo de 0,238 mg.mL⁻¹ de ácido fórmico. Na segunda leitura realizada 48 horas após o início do cultivo observou-se a formação de 0,240

mg.mL⁻¹ do composto. No tempo 72 horas foi evidenciado a maior concentração deste metabólito durante toda a execução da curva quando foi aferido um volume de 0,246 mg.mL⁻¹ de ácido fórmico.

O cultivo dos microrganismos *Pseudomonas putida* CCMI 852 em permeado suplementado com 50% de sais de Robert gerou metabólitos em diferentes níveis quando comparados com resultados obtidos na suplementação anterior. O gráfico 15 destaca os metabólitos observados:

Gráfico 15 - Produção de metabólitos *Pseudomonas putida* CCMI 852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Robert



Fonte: elaborado pelo autor.

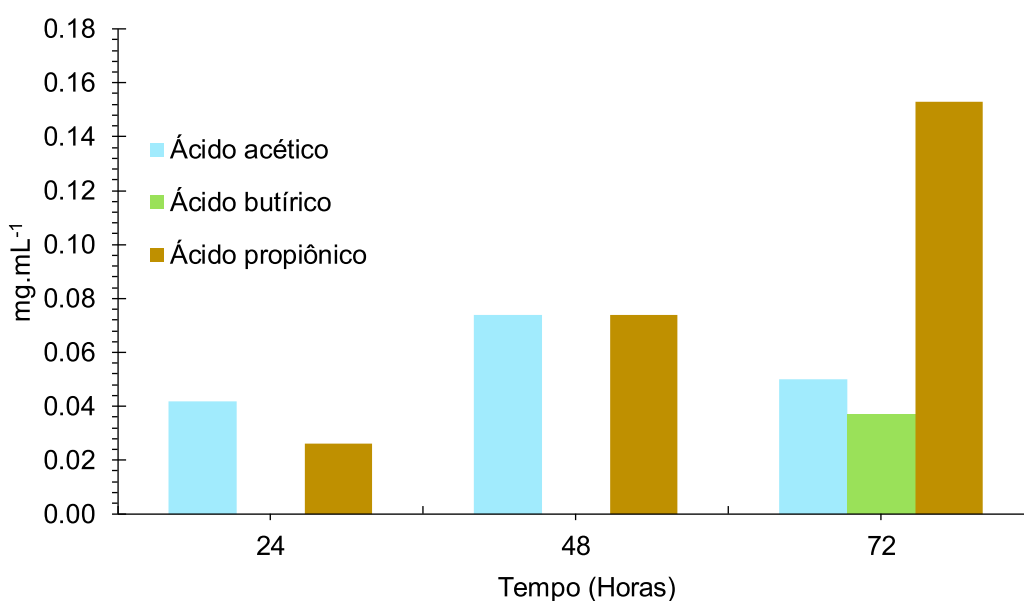
O cultivo da bactéria *Pseudomonas putida* no meio composto de permeado de osmose reversa adicionado de 50% do meio mineral mínimo de sais de Robert indicou uma acelerada produção de ácido isocítrico na primeira amostra do cultivo quando foi identificado 1,452 mg.mL⁻¹ deste composto. Contudo, nos demais tempos não foi observado a presença deste metabólito. A análise realizada após o término das primeiras 24 horas também identificou a presença de 0,076 mg.mL⁻¹ de ácido cítrico. Apesar da análise realizada no tempo 48 horas não ter evidenciado a presença deste metabólito, houve a identificação de 0,228 mg.mL⁻¹ deste composto na terceira amostra avaliada em 72 horas de cultivo.

O teor de ácido acético foi evidenciado primeiramente 48 horas após o início da curva quando foi observado a presença de $0,051 \text{ mg.mL}^{-1}$ do metabólito. A terceira amostra desta curva indicou um ligeiro aumento da concentração do ácido acético percebido a $0,079 \text{ mg.mL}^{-1}$ ao final deste cultivo.

5.2.4.3 Avaliação dos metabólitos formados pelo microrganismo *Pseudomonas putida* CCMI 852 em Sais de Bushnell-Haas

O cultivo das bactérias *Pseudomonas putida* CCMI 852 em permeado suplementado com sais de Bushnell-Haas a 25% apresentou a formação de três metabólitos que estão apresentados no gráfico abaixo:

Gráfico 16 - Produção de metabólitos *Pseudomonas putida* CCMI 852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Bushnell- Haas



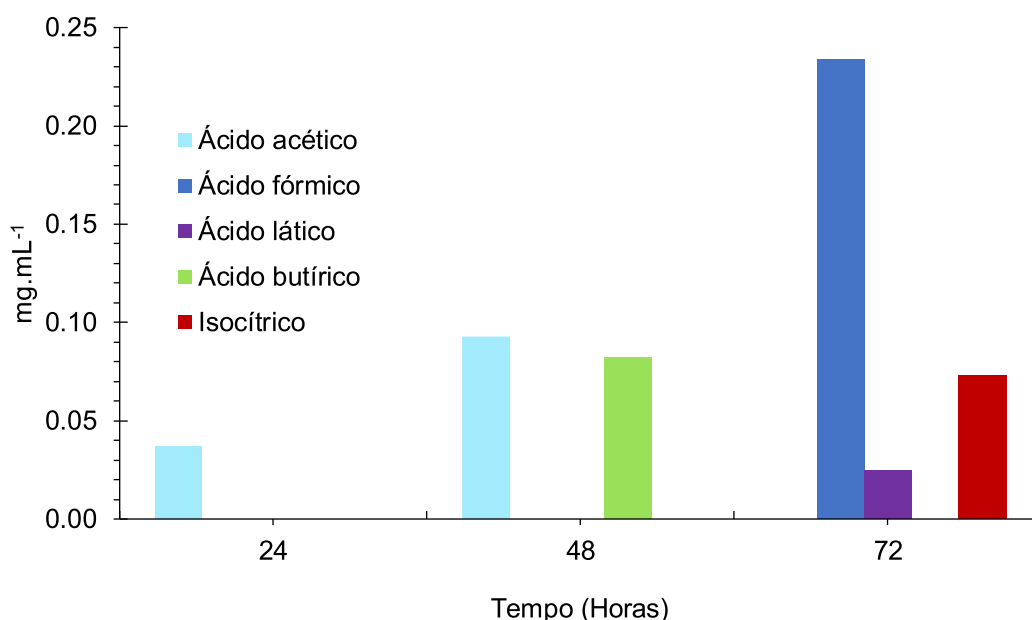
Fonte: elaborado pelo autor.

Nessa corrida foi observado a presença de três ácidos orgânicos. O ácido acético foi observado nos três tempos das corridas cromatográficas com concentrações de $0,042 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,074 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,050 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente. O ácido butírico foi percebido apenas na terceira corrida quando atingiu $0,037 \text{ mg.mL}^{-1}$. O ácido

propiónico teve suas concentrações aferidas em $0,026 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,074 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,152 \text{ mg.mL}^{-1}$ durante a execução da curva.

Quando cultivado em permeado de osmose reversa suplementado com 50% do meio mineral mínimo de sais de Bushnell-Haas as bactérias do gênero *Pseudomonas putida* CCMI 852 apresentaram metabolismo diferente do apresentado anteriormente. O gráfico a seguir destaca os compostos formados.

Gráfico 17 - Produção de metabólitos *Pseudomonas putida* CCMI852 formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Bushnell- Haas



Fonte: elaborado pelo autor.

Ocorreu a formação de cinco ácidos orgânicos distintos. O ácido acético apresentou no tempo de 24 horas a formação de $0,037 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,093 \text{ mg.mL}^{-1}$ no tempo 48 horas. O ácido butírico esteve presente somente no tempo 48 horas quando foi aferido em uma concentração de $0,082 \text{ mg.mL}^{-1}$. O ácido fórmico ampliou sua concentração somente entre o tempo 48 e 72 horas chegando a $0,234 \text{ mg.mL}^{-1}$ ao final da curva. O ácido láctico e o ácido isocítrico formaram no tempo de 72 horas as concentrações de $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,073 \text{ mg.mL}^{-1}$.

A bactéria *Pseudomonas putida* CCMI 852 quando observada quanto a sua capacidade metabólica desenvolvida nos meios propostos mostrou-se capaz de

formar dois compostos em maior concentração. Ocorreu a formação de ácido cítrico na concentração de $0,528 \text{ mg.mL}^{-1}$ no tempo 48 horas do cultivo em meio não suplementado e do ácido fórmico a $0,246 \text{ mg.mL}^{-1}$ no cultivo suplementado com sais de Robert a 25% no tempo 72 horas.

Entretanto, cabe destacar que índices de rendimento superior deste metabólito foram observados em outras pesquisas. Estudos para produção de ácido cítrico utilizando leveduras e fungos filamentosos cultivados em meio composto por resíduos da agroindústria como melaço, sacarose, xaropes de beterraba ou açúcar de cana, e óleo de palma relataram rendimento 200 vezes superior ao demonstrado neste trabalho. Outras técnicas de fermentação foram usadas nesses trabalhos entre como o processo fermentativos de superfície realizado em câmaras de fermentação, com várias bandejas dispostas em prateleiras feitas de aço inoxidável ou através de processo de fermentação submersa onde a fonte de carbono do meio ou seja, o substrato nutriente está na forma líquida e o organismo pode crescer por todo o meio de caldo (AMATO; BECCI; BEOLCHINI, 2020; BEHERA; MISHRA; MOHAPATRA, 2021; CAVALLO *et al.*, 2017;).

ABOYEJI, et al. (2020) investigou a utilização da casca da batata-doce como fonte de carbono em um meio de cultivo num processo fermentativo anaeróbico em biorreator por *Aspergillus niger* com produção de $3,22 \text{ mg/mL}^{-1}$ do composto. DHILLON, et al. (2011) utilizou cepas de *Aspergillus niger* NRRL 567 e *Aspergillus niger* NRRL 2001 num processo fermentativo em biorreator com tempo de fermentação máximo de 72 horas de incubação. A fonte de carbono usada foi o bagaço de maçã. O cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 567 apresentou produção de $66,0 \pm 1,9 \text{ g/kg}$ de substrato seco. No mesmo estudo o cultivo de *Aspergillus niger* NRRL 2001 apresentou concentração de ácido cítrico menor de $61,0 \pm 1,9 \text{ g/kg}$ de substrato seco no mesmo tempo de incubação.

Os estudos que conseguiram produzir ácido fórmico em alta concentração são baseados no uso de combustíveis fosseis (RUMAYOR; DOMINGUEZ; IRABIEN, 2018). A produção de ácido fórmico a partir de matérias-primas derivadas de biomassa por via úmida de oxidação também foi estudada para geração de ácido fórmico com resultados de produção entre 20 e 94% a partir da adição de diferentes catalisadores a temperaturas (BULUSHEV; ROSS, 2018). Esses resultados foram maiores que os encontrados neste estudo. Outro trabalho avaliou a formação de ácido

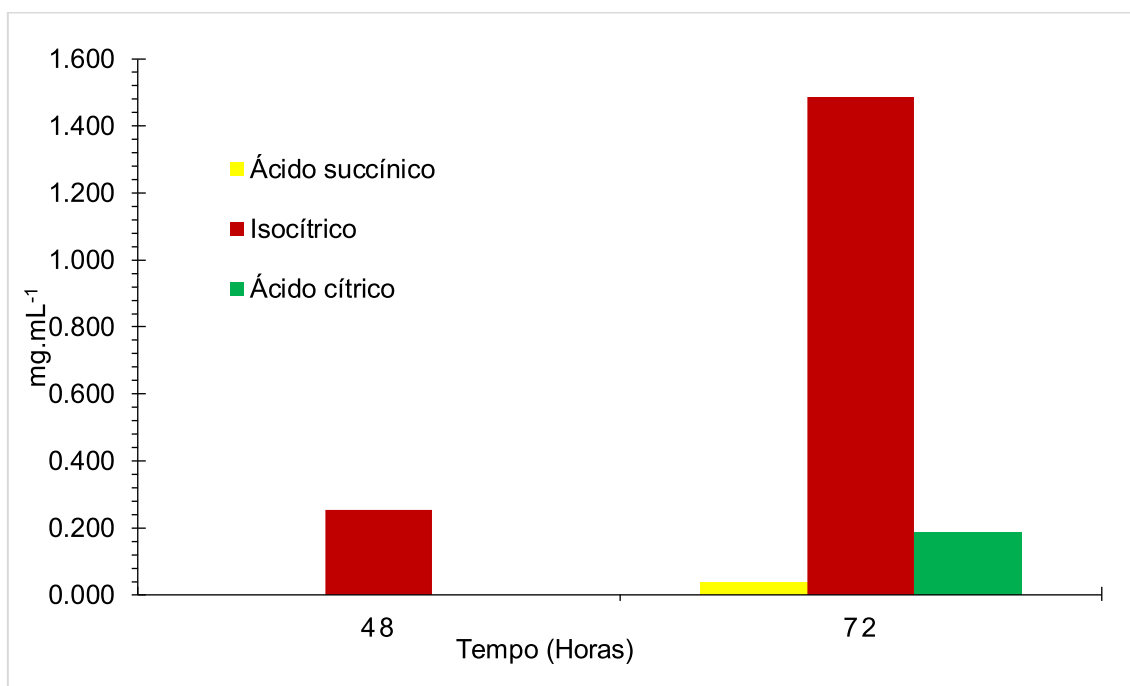
fórmico através da conversão hidrotérmica catalítica do resíduo extraído de lipídios de microalgas e atingiu rendimento superior a 22% (JEONG; KIM, 2021).

5.2.5 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo *Pseudomonas aeruginosa* LBI com permeado não suplementado e suplementado.

5.2.5.1 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo *Pseudomonas aeruginosa* LBI em permeado não suplementado

Neste cultivo as amostras foram testadas em dois momentos, 48 e 72 horas após a inoculação dos microrganismos. As bactérias do gênero *Pseudomonas aeruginosa* LBI inoculada inicialmente em permeado não suplementado apresentou formação de três metabólitos distintos que estão apresentados no gráfico a seguir:

Gráfico 18 - Produção de metabólitos *Pseudomonas aeruginosa* LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR não suplementado



Fonte: elaborado pelo autor.

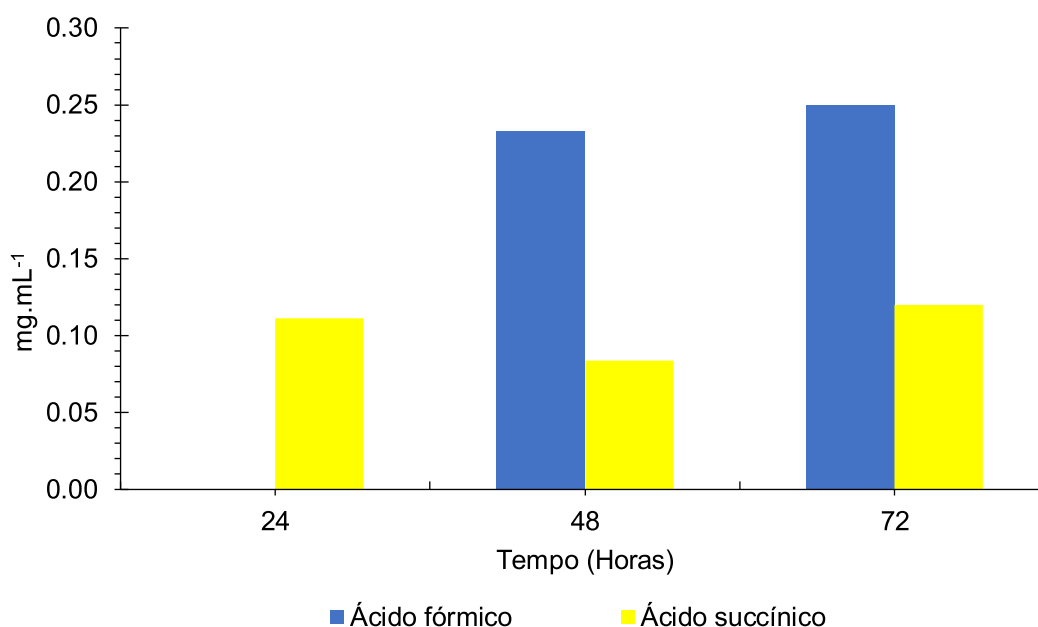
Três foram os metabólitos formados neste cultivo. O metabólito que atingiu maior concentração foi o ácido isocítrico que entre o tempo 48 horas e o tempo 72 horas ampliou sua concentração de 0,2537 mg.mL⁻¹ para 1,488 mg.mL⁻¹. O ácido succínico e o ácido cítrico foram percebidos somente na última corrida cromatográfica realizada

72 horas após o início do cultivo quando suas concentrações atingiram $0,040 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,187 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente.

5.2.5.2 Avaliação da formação de metabólitos no cultivo *Pseudomonas aeruginosa* LBI em Sais de Robert

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi cultivada em permeado suplementado em 25% com sais de Robert e formou dois metabólitos que estão destacados no gráfico abaixo:

Gráfico 19 - Produção de metabólitos *Pseudomonas aeruginosa* LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Robert

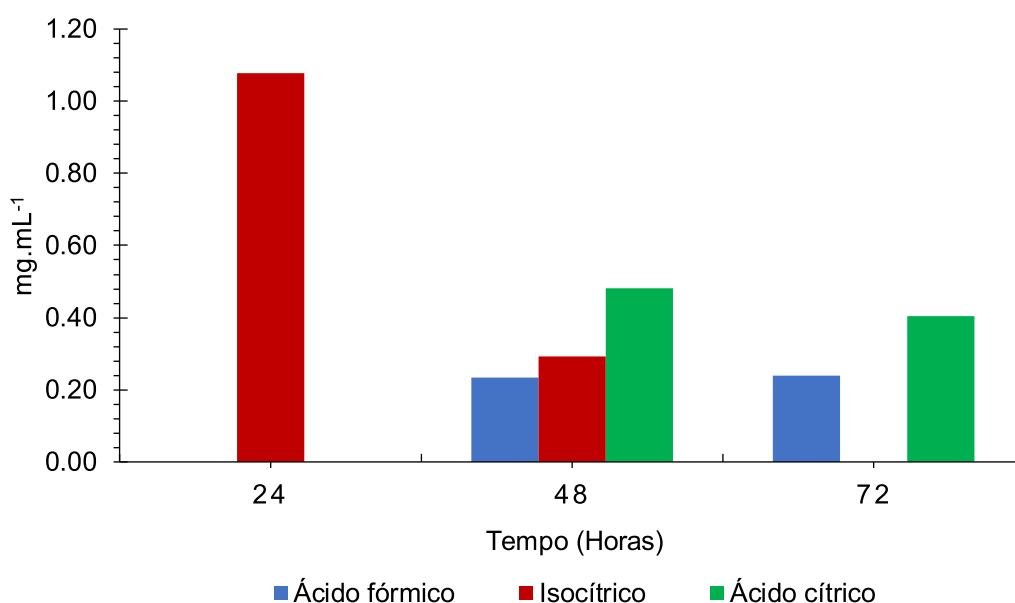


Fonte: elaborado pelo autor.

Nessa curva, as amostras de sobrenadante evidenciaram a presença de $0,111 \text{ mg.mL}^{-1}$, $0,084 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,120 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ácido succínico. O ácido fórmico se formou a partir do tempo 48 horas chegando quando apresentou $0,233 \text{ mg.mL}^{-1}$ e na realizada na amostra do tempo 72 horas sua concentração foi aferida em $0,250 \text{ mg.mL}^{-1}$.

O permeado adicionado de 50% de sais de Robert cultivado com a mesma espécie de pseudomonas apresentou a formação de cinco metabólitos que estão destacados no gráfico a seguir:

Gráfico 20 - Produção de metabólitos *Pseudomonas aeruginosa* LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Robert



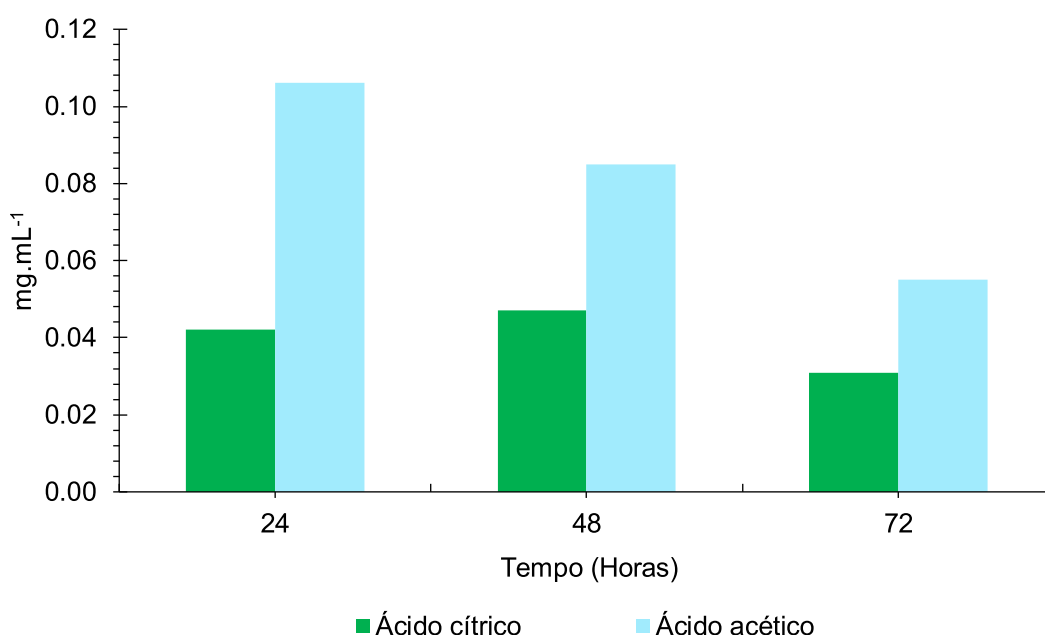
Fonte: elaborado pelo autor.

Os metabólitos destacados nessa curva foram o ácido cítrico, ácido isocítrico e o ácido fórmico. A maior concentração atingida nesta curva foi a observada pelo ácido isocítrico no tempo 24 horas com o teor de 1,079 mg.mL⁻¹. Entretanto sua concentração declinou para 0,0293 mg.mL⁻¹ na segunda amostra analisada, terminando zerado no tempo 72 horas. O ácido fórmico que não foi observado na análise realizada na primeira amostra chegou a 0,233 mg.mL⁻¹ no tempo 48 horas e ao final da realização da curva sua concentração foi de 0,238 mg.mL⁻¹. O ácido cítrico teve seu nível máximo observado no tempo 48 horas quando atingiu 0,481 mg.mL⁻¹ seguido de uma ligeira redução para 0,403 mg.mL⁻¹ na última amostra analisada .

5.2.5.3 Avaliação da formação de metabolitos no cultivo *Pseudomonas aeruginosa* LBI em Sais de Bushnell-Haas

No cultivo das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* LBI em permeado suplementado com sais de Bushnell-Haas a 25% foi detectado a presença dois metabolitos que estão destacados no gráfico a seguir:

Gráfico 21 - Produção de metabólitos *Pseudomonas aeruginosa* LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 25% sais de Bushnell-Haas

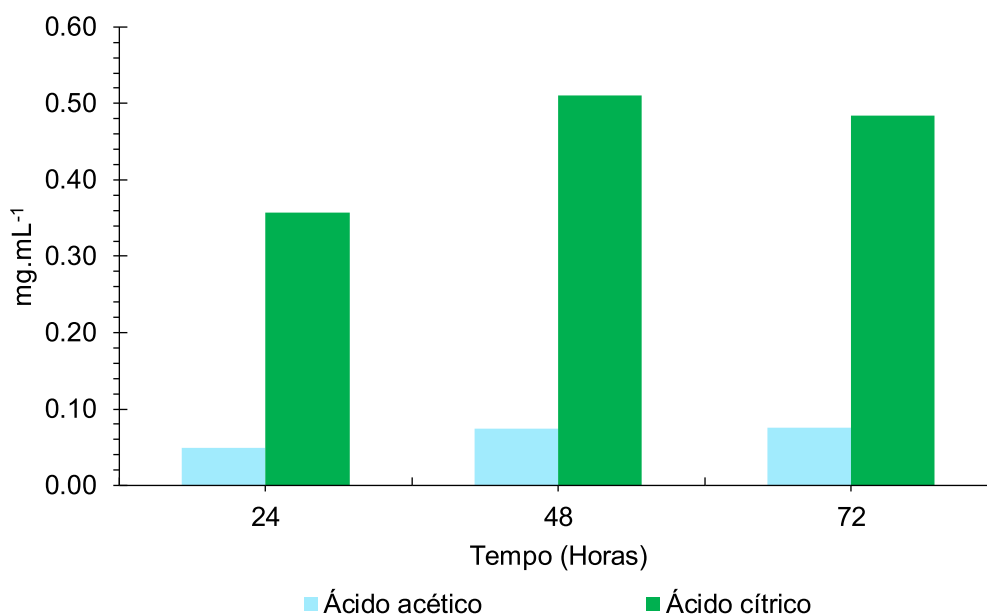


Fonte: elaborado pelo autor.

O ácido acético formou seu pico no tempo 24 horas com 0,106 mg.mL⁻¹. Quarenta e oito horas após o início da curva foi identificado 0,085 mg.mL⁻¹ e ao final apenas 0,055 mg.mL⁻¹ deste composto foi observado. A primeira amostra de sobrenadante desta curva também apresentou 0,042 mg.mL⁻¹ de ácido cítrico. A segunda amostra de 0,047 mg.mL⁻¹ observado na segunda amostra e 0,031 mg.mL⁻¹ na última análise.

Os metabolitos formados no cultivo realizado com permeado de osmose reversa suplementado com 50% do meio mineral mínimo de sais de Bushnell-Haas foram destacados no gráfico apresentado abaixo:

Gráfico 22 - Produção de metabólitos *Pseudomonas aeruginosa* LBI formado em meio de cultivo a base de permeado de soro de leite obtido por OR adicionado de 50% sais de Busnhell-Haas



Fonte: elaborado pelo autor.

Neste cultivo dois metabólitos foram formados. O ácido acético permaneceu em baixas concentrações com índice máximo inferior a 0,1 mg.mL⁻¹ no tempo 72 horas. O composto que apresentou melhor nível ao longo do tempo foi o ácido cítrico que obteve níveis crescentes em cada amostra analisada no decorrer do tempo atingindo 0,510 mg.mL⁻¹ no tempo 48 horas.

As bactérias da espécie das *Pseudomonas aeruginosa* LBI aqui estudada quanto à formação de metabólitos nos meios propostos apresentaram como principal produto o ácido isocítrico. Este composto apresentou no ponto 48 horas do cultivo em permeado não suplementado a formação de 1,488 mg.mL⁻¹. A síntese deste ácido tem sido estudada principalmente a partir da levedura *Yarrowia lipolytica*, com rendimentos que se aproximam da marca de 100 g.L⁻¹, (ANGUMEENAL; VENKAPPAYYA, 2013; KAMZOLOVA, 2013; KAMZOLOVA; MORGUNOV, 2019; RZETCHONEK, 2019), índices superiores aos encontrados nesta pesquisa.

6 CONCLUSÃO

O permeado de soro obtido por osmose reversa se mostrou um meio de cultivo eficiente para o crescimento dos microrganismos utilizados neste estudo. Foi observado por meio de leituras em espectrofotômetro o desenvolvimento em permeado sem suplementação dos microrganismos IBPCS 09, IBPCS14, *Pseudomonas putida* CCMI 852 e *Pseudomonas aeruginosa* LBI ao final de 72 horas quando as amostras analisadas atingiram D.O 600nm de 1.288, 1.305, 2.210 e 2.454 respectivamente. Dois dos microrganismos cultivados IBPCS 09 e IBPCS14 foram obtidos a partir da prospecção microbiana em biofilme formado nas tubulações de condução de permeado, sendo isolados e identificados de forma presuntiva como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

Em relação aos metabólitos formados foi possível perceber que durante a execução da curva de crescimento do isolado IBPCS 14 em meio suplementado com sais de Bushnell-Haas a 25% houve a formação em 48 horas de ácido isocítrico na concentração de 12,151 mg.mL⁻¹. Esse composto tem aplicação na industrial pois é utilizado como marcador para identificar a qualidade e a pureza de sumos de fruta, além de atuar como aditivo alimentar e como regulador de pH de formulações de medicamentos na indústria farmacêutica.

A bactéria IBPCS 09 destacou-se pela formação de dois metabólitos, sendo ácido cítrico na proporção de 0,621 mg.mL⁻¹, observado no cultivo suplementado com sais de Robert na proporção 50% 72 horas após o início da curva e a lactulose com 0,558 mg.mL⁻¹, observado no cultivo adicionado de 25% de sais de Bushnell-Haas em 48 horas de cultivo. O ácido cítrico tem aplicação na indústria alimentícia como acidulante, antioxidante, conservante, entre outros. A lactulose é conhecida como um prebiótico que pode estimular seletivamente o crescimento de bifidobactérias e lactobacilos benéficos sendo muito utilizada na indústria farmacêutica.

A espécie *Pseudomonas putida* CCMI 852 foi responsável pela formação de ácido cítrico com 0,528 mg.mL⁻¹ no cultivo em meio não suplementado e o ácido isocítrico a 1,452 mg.mL⁻¹ no cultivo suplementado com sais de Robert a 50%. As bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* LBI apresentaram como principal produto o ácido isocítrico na proporção de 1,488 mg.mL⁻¹ no cultivo em permeado não suplementado

e de $1,079 \text{ mg.mL}^{-1}$ ácido isocítrico no cultivo suplementado com sais de Robert a 50%.

É importante destacar que houve maior formação dos ácidos cítrico e isocítricos provenientes das reações do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, visto que todos os quatro microrganismos selecionados geraram estes compostos em quantidade no decorrer do tempo. Outro aspecto importante a ser destacado refere-se às concentrações dos metabólitos formados. Os compostos se apresentaram em concentrações reduzidas quando comparadas a outros trabalhos indicando a necessidade de adição de outros nutrientes ou suplementos ao meio proposto.

É importante destacar que o tempo de cultivo dos microrganismos, assim como a suplementação utilizada na formulação do meio interferiu nas concentrações dos metabólitos durante a execução da curva de crescimento onde a maior relação de metabólito aferida em mg.mL^{-1} foi observada no cultivo do microrganismo IBPCS 14 em permeado não suplementado (ácido isocítrico $12,151 \text{ mg.mL}^{-1}$).

O aumento do volume do meio de cultivo utilizando permeado de soro obtido por osmose reversa e do tempo de fermentação pode contribuir para a ampliação da produção, melhorando o rendimento dos metabólitos formados no cultivo proposto por este estudo.

A realização de repetições das corridas cromatográficas se faz necessário para validação estatística das concentrações dos compostos formados, assim como a realização da identificação por PCR dos isolados IBPCS 09 e 14. A adição de outros compostos ao permeado pode melhorar as condições de cultivos dos microrganismos e a produção dos metabólitos. A implementação dessas etapas constitui estudos a serem realizados a fim valorizar o resíduo da indústria láctea utilizado neste trabalho bem como a obtenção de metabólitos de interesse industrial em concentrações maiores.

REFERÊNCIAS

- ABOYEJI, O. O. *et al.* Optimization of media components and fermentation conditions for citric acid production from sweet potato peel starch hydrolysate by *Aspergillus niger*. **Scientific African**, v. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00554>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468227620302921>. Acesso em: 17 fev 2024.
- ACQUARO JUNIOR, V. R. *et al.* Desenvolvimento e validação de método para extração e quantificação através de HPLC com índice de refração para lactose em leite pasteurizado. **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 2, p. 137-145. 2013. DOI: 10.4322/sc.2013.010. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Suzana-Nixdorf/publication/273880262_. Acesso em: 12 out 2023.
- ALBUQUERQUE, T. L. *et al.* Production of lactulose by β -galactosidase from *kluveromyces lactis*: the effect of the substrate concentration and the temperature. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, XXI; SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, XII.**, 3 a 6 de set. 2017, Aracaju, Sergipe, Brasil. Anais [...] Aracaju, Sergipe, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/54439>. Acesso em: 10 jun 2024.
- AMATO, A; BECCI, A; BEOLCHINI, F. Citric acid bioproduction: the technological innovation change. **Critical reviews in biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 199-212, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1709799>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07388551.2019.1709799>. Acesso em 14 fev 2024.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22 ed. Washington: American Public Health Association Pub., 2012. 1935 p.
- ANGUMEENAL, A. R.; VENKAPPAYYA, D. An overview of citric acid production. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 367-370, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812002332>. Acesso em: 12 fev 2024.
- ATLAS, R. M.; SNYDER, J. W. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology. In: VERSALOVIC, J. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**. 10. ed. Washington: ASM Press, 2011, p. 272-307.
- ASUNIS, F. *et al.* The dairy biorefinery: integrating treatment processes for cheese whey valorisation. **Journal of Environmental Management**, v. 276, p. 111-240, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111240>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479720311646>. Acesso em: 26 mar 2021.
- BALDASSO, C. **Concentração, Purificação e Fracionamento das Proteínas do Soro Lácteo através da Tecnologia de Separação por Membranas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Escola de

Engenharia. Porto Alegre, RS. 2008. 163p. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/13453>. Acesso em: 17 abr 2024.

BANGER, G. *et al.* Delactosed Whey Permeate as Substrate for Succinic Acid Fermentation by *Actinobacillus succinogenes*. **Waste and Biomass Valorization**, p. 1-9, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01390-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-021-01390-5>. Acesso em: 13 abr 2021.

BANSAL, V; VEENA, N. Understanding the role of pH in cheese manufacturing: General aspects of cheese quality and safety. **Journal of Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 16-26, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05631-w>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-022-05631-w>. Acesso em: 14 mai 2024.

BARILE, D. *et al.* Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 9, p. 524-530, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.03.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694609000569>. Acesso em: 17 abr 2024.

BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria**. 3. ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1993. 331 p.

BASAK, S; SHETTY, P. H. Conventional microbial counting and identification techniques. **Techniques to Measure Food Safety and Quality: Microbial, Chemical, and Sensory**, p. 69-89, 2021. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-68636-9_4. Acesso em: 12 mar 2021.

BECKER, A. F. *et al.* Evaluation of whey permeate obtained through nanofiltration for the formulation sports drinks. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 7, n. 2, pág. 18753-18769, 2021. DOI:10.34117/bjdv7n2-493. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/25164/20060>. Acesso em: 12 mar 2021.

BEHERA, B. C; MISHRA, R.; MOHAPATRA, S. Microbial citric acid: Production, properties, application, and future perspectives. **Food Frontiers**, v. 2, n. 1, p. 62-76, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/fft2.66>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fft2.66>. Acesso em: 17 fev 2024.

BENINCASA, M. *et al.* Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, n. 4, p. 283-288, 2002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026087740100214X>. Acesso em: 12 ago 2023.

BENINCASA, M. *et al.* Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1-8, 2004. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41>. Acesso em: 12 ago 2023.

BENINCASA, M.; ACCORSINI, F. R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate.

Bioresource Technology, v. 99, p. 3843-3849, 2008. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.048>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096085240700555X>. Acesso em: 19 set 2023.

BERISVIL, A. P. *et al.* Low-cost culture medium for biomass production of lactic acid bacteria with probiotic potential destined to broilers. **Facultad de Ciencias**

Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, v. 1, n. 9, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.14409/favecv.v20i1.9978>. Disponível em:

<https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/145693>. Acesso em 13 abr 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários**. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. 2006. Disponível em:

<https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibmlink.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68>. Acesso em: 05 set. 2022.

BOSCO, F.; CARLETTO, R. A.; MARMO, L. An integrated cheese whey valorization process. **Chemical engineering transactions**, v. 64, p. 379-384, 2018.

DOI:10.1016/j.jfoodeng.2017.07.022. Disponível em:

<https://www.aidic.it/cet/18/64/064.pdf>. Acesso em: 30 mar 2021.

BOSE, S. A. *et al.* Investigation of fermentation condition for production enhancement of polyhydroxyalkanoate from cheese whey by *pseudomonas* sp. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 9, n. 5, p. 890-898, 2020. DOI: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.5.890-898>. Disponível em:

<https://office2.jmbfs.org/index.php/JMBFS/article/view/4535>. Acesso em: 24 abr 2024.

BULUSHEV, D. A.; ROSS, J. R. H. Towards sustainable production of formic acid. **ChemSusChem**, v. 11, n. 5, p. 821-836, 2018. DOI:

<https://doi.org/10.1002/cssc.201702075>. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cssc.201702075>. Acesso em: 17 fev 2024.

CALDEIRA, C. *et al.* Quantification of food waste per product group along the food supply chain in the European Union: a mass flow analysis. **Resources**,

Conservation and Recycling, v. 149, p. 479-488, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2019.06.011>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344919302721#bib0005>. Acesso em: 21 mar 2021.

CALDEIRA, C. *et al.* Sustainability of food waste biorefinery: A review on valorisation pathways, techno-economic constraints, and environmental

assessment. **Bioresource Technology**, v. 312, p. 123-575, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123575>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852420308476>. Acesso em: 21 mar 2021.

CAPELINI, T. L. **Produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes fontes de carbono e condições de cultivo**. 2009. 52 f. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/e316748a-2dd3-4df3-8fd2-c7cc9ea1f7bf>. Acesso em 11 ago 2023.

CARTER, B. *et al.* Efficiency of removal of whey protein from sweet whey using polymeric microfiltration membranes. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 8, p. 8630-8643, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18771>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221006366>. Acesso em: 13 ago 2023.

CAVALLO, E. *et al.* *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox084>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/17/8/fox084/4587737?login=false>. Acesso em: 17 fev 2024.

CERRI, C. E. P. *et al.* Reducing Amazon deforestation through agricultural intensification in the Cerrado for advancing food security and mitigating climate change. **Sustainability**, v. 10, n. 4, p. 989, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/su10040989>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/10/4/989/htm>. Acesso em: 15 abr 2021.

CHANDRASEKARAN, E. V.; BEMILLER, J. N. Constituent analysis of glycoaminoglycans. In: CHANDRASEKARAN, E. V.; BEMILLER, J. N. **Methods in carbohydrate chemistry**, 1ed, New York: Academic Press, 1980, v. 3, p. 89-96.

CLARO, E. M. T. **Biodegradação de gasolina e óleo diesel utilizando biossurfactantes e *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL**. 2017. Tese (Ciências Biológica Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/866af1c8-7864-4865-a237-f92c8018f2a9>. Acesso em: 01 Jun 2022.

CLARO, E. M. T. *et al.* Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: Technology and mechanism. **Microbial action on hydrocarbons**, p. 125-141, 2018. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_6. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-1840-5_6. Acesso em: 23 out 2023.

COELHO, E. M. *et al.* Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0889157517302958>. Acesso em 10 out 2023.

COSTA, S. G. V. A. O. *et al.* Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 483-488, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S135951130500303X>. Acesso em: 12 set 2023.

COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 34-38, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100007>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/YgGNrJjJgWTsfFk3Drvwr6N/?lang=pt>. Acesso em: 01 jul 2023.

DECESARO, A. *et al.* Biosurfactants production using permeate from whey ultrafiltration and bioproduct recovery by membrane separation process. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 23, n. 3, p. 539-551, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsde.12399>. Disponível em: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsde.12399>. Acesso em: 13 dez 2023.

DE GIORGI, S. *et al.* Potential use of ricotta cheese whey for the production of lactobionic acid by *Pseudomonas taetrolens* strains. **New biotechnology**, v. 42, p. 71-76, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.02.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871678417302108>. Acesso em: 24 abr 2024.

DE MOURA BELL, J. M. L. N. *et al.* An integrated bioprocess to recover bovine milk, oligosaccharides from colostrum whey permeate. **Journal of food engineering**, v. 216, p. 27-35, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.07.022>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877417303217>. Acesso em: 31 mar 2021.

DE SOUZA, R. R. *et al.* Recovery and purification of lactose from whey. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, n. 11, p. 1137-1143, 2010. Doi:10.1016/j.cep.2010.08.015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0255270110002084>. Acesso em: 18 abr 2024.

DHILLON, G. S. *et al.* Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 2, p. 83-92, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.02.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X11000258>. Acesso em: 15 fev 2024.

DIFCO MANUAL, **Detroit: Difco Laboratories** 10ed., 1984.

DINIZ, F. H. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: oportunidades para as empresas lácteas. **Embrapa Gado de Leite-Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2021. Disponível em:

<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1134853>. Acesso em: 23 fev 2022.

FREITAS, M. C. et al. Desenvolvimento de metodologia para análise de amostras lácteas com teor reduzido de lactose utilizando HPLC-ELSD. In: **CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**. 2017. Disponível em: <https://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2018/ciic2018/resumo2017/ITAL/RE17222.pdf>. Acesso em: 12 out 2023.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **Embrapa**, Circular Técnica, p. 1-9, 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37465/1/CT63.pdf>. Acesso em: 05 set. 2022.

GALVÃO, D. F; GOMES, E. R. S. Os processos de separação por membranas e sua utilização no tratamento de efluentes industriais da indústria de laticínios: revisão bibliográfica. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 6, p. 349-360, 2015. DOI: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v70i6.487>. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/487/395>. Acesso em: 10 abr 2024.

GUPTA, C.; PRAKASH, D. Therapeutic potential of milk whey. **Beverages**, v. 3, n. 3, p. 31, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/beverages3030031>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2306-5710/3/3/31/hm#app1-beverages-03-00031>. Acesso em: 25 mar 2021.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00152624>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00152624>. Acesso em: 14 set 2023.

IBRAHIM, S; DIAB, A; ABDULLA, H. Bio-cleaning efficiency of rhamnolipids produced from native *Pseudomonas aeruginosa* grown on agro-industrial by-products for liquid detergent formulation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 2616-2633, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03555-3>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-021-03555-3>. Acesso em: 25 abr 2024.

ILTCHENCO, S. et al. Whey protein concentration by ultrafiltration and study of functional properties. **Ciência Rural**, v. 48, n. 5, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170807>. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v48n5/1678-4596-cr-48-05-e20170807.pdf>. Acesso em: 29 mar 2021.

JAHADI, M.; EHSANI, M. R.; PAIDARI, S. Characterization of milk proteins in ultrafiltration permeate and their rejection coefficients. **Journal of Food Biosciences and Technology**, v. 8, n. 2, p. 49-54, 2018. Disponível em: <https://www.sid.ir/search/paper/Characterization%20of%20Milk%20Proteins%20in%20Ultrafiltration%20Permeate%20and%20Their%20Rejection%20Coefficients/fa/?page=1&sort=1&fyp=all&fgr=all&fyr=1379%2c1402>. Acesso em: 17 abr 2024.

JEONG, G.; KIM, S. Statistical optimization of levulinic acid and formic acid production from lipid-extracted residue of *Chlorella vulgaris*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, p. 105-142, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105142>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213343721001202>. Acesso em: 17 fev 2024

JUNG, B.; HOILAT, G. J. MacConkey medium. In: **StatPearls [internet]**. StatPearls Publishing, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>. Acesso em: 30 abr 2024.

KAMZOLOVA, S. V. *et al.* Isocitric acid production from rapeseed oil by *Yarrowia lipolytica* yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, p. 9133-9144, 2013. DOI: 10.1007/s00253-013-5182-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5182-5>. Acesso em: 09 fev 2024.

KAMZOLOVA, Svetlana V.; MORGUNOV, Igor G. Microbial production of (2 R, 3 S) - isocitric acid: State of the arts and prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 23-24, p. 9321-9333, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/00021369.1968.10859065>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-019-10207-4>. Acesso em: 19 fev 2024.

KESSTRA, S. *et al.* Soil-related sustainable development goals: Four concepts to make land degradation neutrality and restoration work. **Land**, v. 7, n. 4, p. 133, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/land7040133>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-445X/7/4/133/htm>. Acesso em: 13 abr 2021.

KIM, Y. S.; OH, D. K. Lactulose production from lactose as a single substrate by a thermostable cellobiose 2-epimerase from *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. **Bioresource Technology**, v. 104, p. 668-672, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852411016087>. Acesso em 15 fev 2024.

KIM, Y. S.; PARK, C. S.; OH, D. K. Lactulose production from lactose and fructose by a thermostable β -galactosidase from *Sulfolobus solfataricus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 903-908, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.01.023>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022906000433>. Acesso em: 15 fev 2024.

KOHLERSCHMIDT, D.J. *et al.* Identification of aerobic Gram-negative bacteria. In: **Practical handbook of microbiology**. CRC Press, 2021. p. 59-70. *E-book* (12 p.). ISBN 978 10 030 9927 7. Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9781003099277-7/identification-aerobic-gram-negative-bacteria-donna-kohlerschmidt-lisa-mingle-nellie-dumas-geetha-nattanmai>. Acesso em: 03 mai 2024.

KOLESOVS, S.; SEMJONOV, P. Production of bacterial cellulose from whey—current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10803-9>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10803-9>. Acesso em: 13 abr 2021.

LAL, A; CHEEPHAM, N. Eosin-methylene blue agar plates protocol. **American Society for Microbiology**, 2007. Disponível em: <https://asm.org/ASM/media/Protocol-Images/Eosin-Methylene-Blue-Agar-Plates-Protocol.pdf?ext=.pdf/1000>. Acesso em: 03 mai 2024.

LOPES, P. R. M. *et al.* Production of rhamnolipids from soybean soapstock: characterization and comparison with synthetics surfactants. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, p. 2013-2023, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01159-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12649-020-01159-2#citeas>. Acesso em: 03 jan 2024.

LALUCAT, J. *et al.* Past, present and future of the boundaries of the *Pseudomonas* genus: proposal of Stutzerimonas gen. nov. **Systematic and applied microbiology**, v. 45, n. 1, p. 126289, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126289>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202021001120>. Acesso em: 14 mai 2024.

MANO, M. C. R.; PAULINO, B. N.; PASTORE, G. M. Whey permeate as the raw material in galacto-oligosaccharide synthesis using commercial enzymes. **Food research international**, v. 124, p. 78-85, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.019>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996918307439>. Acesso em: 26 mar 2021.

MAO, B. *et al.* In vitro fermentation of lactulose by human gut bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 45, p. 10970-10977, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf503484d>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf503484d>. Acesso em: 10 jun 2024.

MARIANO, A. P. *et al.* Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 269-274, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-66322008000200006>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjce/a/xKxQqw8LTvndLYnc6q3Dz6D/?lang=en>. Acesso em: 16 set 2023.

MEDEIROS, C. A. B. *et al.* **Fome zero e agricultura sustentável: contribuições da Embrapa**. Brasília: Embrapa, 2018. E-book. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/183521/1/Livro-Carlos-B-Medeiros-ODS-2-fome-zero-e-agricultura-sustentavel.pdf>. Acesso em: 26 mar 2021.

MENCHIK, P. *et al.* Composition of coproduct streams from dairy processing: Acid whey and milk permeate. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 5, p. 3978-3984, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15951>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022030219302632>. Acesso em: 31 mar 2021.

MORGUNOV, I. G. *et al.* Microbiological production of isocitric acid from biodiesel waste and its effect on spatial memory. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 462, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040462>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/4/462>. Acesso em: 09 fev 2024.

MORLETT-CHÁVEZ, J. A. *et al.* Kinetics of BTEX biodegradation by a microbial consortium acclimatized to unleaded gasoline and bacterial strains isolated from it. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 7, p. 581-587, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830510001319>. Acesso em: 14 nov 2023.

MOSSMANN, J.; VIGANÓ, G. S.; BRIÃO, V. B. Obtenção e purificação de concentrado proteico de soro por ultrafiltração e diafiltração. **Revista CIATEC-UPF, [S. l.]**, v. 12, n. 1, p. 61-73, 2020. DOI: 10.5335/ciatec.v12i1.10864. Disponível em: <https://seer.upf.br/index.php/ciatec/article/view/10864>. Acesso em: 12 abr. 2024.

NAÇÕES UNIDAS. **Transformando Nosso Mundo: a agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável**. 2015. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>. Acesso em: 6 mar. 2021.

NIKEL, P. I.; DE LORENZO, V. *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: from native biochemistry to trans-metabolism. **Metabolic engineering**, v. 50, p. 142-155, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.05.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096717618301502>. Acesso em 24 abr 2024.

OLUWASEUN, A. C. *et al.* Characterization and optimization of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* C1501 with novel biosurfactant activities. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 26-36, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352554116300596>. Acesso em: 01 dez 2023.

OTENIO, M. H. *et al.* Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 258-261, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/38VqYwB7sP6xhJ8QvnHDT8B/>. Acesso em: 12 Jul 2022.

RAMOS, J. L. ***Pseudomonas: Genomics, Life Style and Molecular Architecture***. 1ed, New York: Springer Science & Business Media, 2004. *E-book*. ISBN 978-1-4419-9086-0. DOI: 10.1007/978-1-4419-9086-0. Disponível em: https://play.google.com/books/reader?id=7h_jBwAAQBAJ&pg=GBS.PA7&hl=pt-BR&lr=&source=gb_s_atb. Acesso em: 26 dez 2023.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia Prática: Roteiro e Manual Bactérias e Fungos**. São Paulo: Atheneu, 1998, 112 p.

RISNER, D. *et al.* The Potential Production of the Bioactive Compound Pinene Using Whey Permeate. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 263, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr8030263>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/8/3/263/htm>. Acesso em: 22 mar 2021.

ROBERT, M. *et al.* Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 11, p. 871-874, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01026843>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01026843>. Acesso em: 18 set 2023.

ROCHA, J. M.; GUERRA, A. On the valorization of lactose and its derivatives from cheese whey as a dairy industry by-product: an overview. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 11, p. 2161-2174, 2020. DOI: 10.1007/s00217-020-03580-2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-020-03580-2>. Acesso em: 05 fev 2024.

ROLLINI, M. *et al.* From cheese whey permeate to Sakacin-A/bacterial cellulose nanocrystal conjugates for antimicrobial food packaging applications: a circular economy case study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78430-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-78430-y>. Acesso em: 28 abr 2021.

RUMAYOR, M; DOMINGUEZ, R. A.; IRABIEN, A. Formic Acid manufacture: Carbon dioxide utilization alternatives. **Applied Sciences**, v. 8, n. 6, p. 914, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/app8060914>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3417/8/6/914>. Acesso em 17 fev 2024.

RZETCHONEK, D. A. *et al.* Produção asséptica de ácido cítrico e isocítrico a partir de glicerol bruto por *Yarrowia lipolytica* geneticamente modificada. **Tecnologia de biorecursos**, v. 340-344, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.118>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852418313713>. Acesso em: 09 fev 2024.

SHARMA, A. *et al.* Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52. **LWT**, v. 139, p. 110744, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110744>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643820317321>. Acesso em: 13 abr 2021.

SPIERS, A. J.; BUCKLING, A; RAINEY, P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v. 146, n. 10, p. 2345-2350, 2000. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/>. Acesso em: 27 Dez 2023.

SOARES, C. I. P. **Identificação e diferenciação de *Pseudomonas aeruginosa* na água, superfícies e equipamentos de piscinas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2018. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/35575/1/ulfc121896_tm_Cristina_Soares.pdf. Acesso em: 26 Dez 2023.

SOUSA, J. R. *et al.* Kinetic and characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 using glycerol as carbon source. **Química Nova**, v. 37, p. 431-441, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140064>.

Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/qn/a/xWjmYSs5nP3kDq9nGwTczP/abstract/?lang=en&format=html>. Acesso em: 12 abr 2023.

SUDHAKAR BABU, P. *et al.* Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. **Biotechnology letters**, v. 18, p. 263-268, 1996. DOI: [doi:10.1007/bf00142942](https://doi.org/10.1007/bf00142942). Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00142942>. Acesso em: 08 jan 2023.

Tetra Pak Whey Processing. In *Dairy Processing Handbook*; **Tetrapak**, 2019.

Disponível em: <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/chapter/membrane-technology#toc-membrane-technology>. Acesso em: 01 abr 2024.

TONINI, D.; ALBIZZATI, P. F.; ASTRUP, T. F. Environmental impacts of food waste: Learnings and challenges from a case study on UK. **Waste Management**, v. 76, p. 744-766, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.03.032>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X18301740>. Acesso em: 14 abr 2021.

UNEP- United Nations Environment Programme. **Food Waste Index Report 2021**.

Disponível em: <https://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-report-2021>. Acesso em: 22 fev. 2022.

ÜNVER, Y. Utilization of Cheese Whey for Production of Azurin by *Pseudomonas aeruginosa*. **Sakarya University Journal of Science**, v. 25, n. 2, p. 601-609, 2021. DOI: <https://doi.org/10.16984/sofenbilder.853961>. Disponível em:

<https://dergipark.org.tr/en/pub/sofenbilder/issue/60672/853961>. Acesso em: 25 abr 2024.

YOSHIMURA, I. *et al.* Guava Seed Oil: Potential Waste for the Rhamnolipids Production. **Fermentation**, v. 8, n. 8, p. 379, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.3390/fermentation8080379>. Disponível em:

<https://www.mdpi.com/2311-5637/8/8/379>. Acesso em: 23 dez 2023.

WINN JR. *Et al.* Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1760p.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 4ed., p. 1020, 2008 Disponível em:

<https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 04 set. 2022.

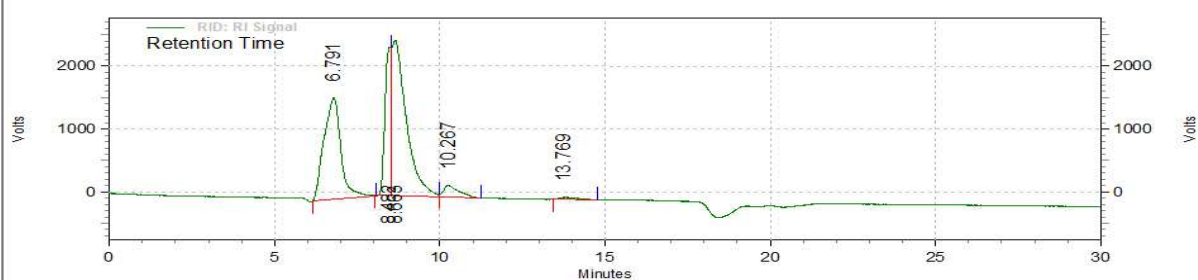
APÊNDICES

Cromatogramas das amostras de permeado suplementado e não suplementado cultivados com *Pseudomonas putida* CCMI 852, *Pseudomonas aeruginosa* LBI, B9 e B14.

Page 1 of 1

Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A2_T0_PP_BH_50G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 4:35:27 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 1:58:49 AM (GMT -02:00)



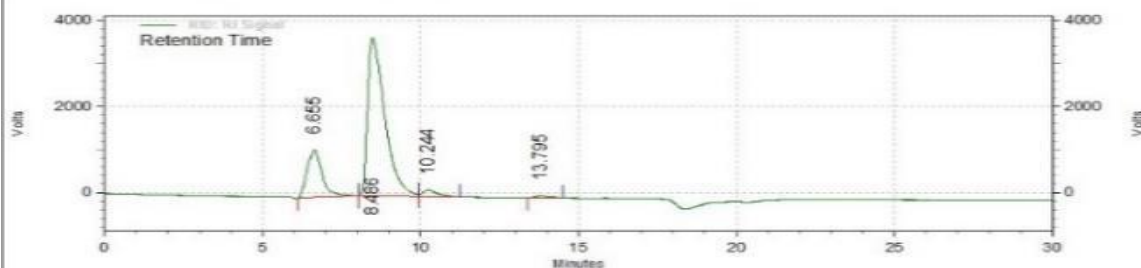
RID: RI Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.791	5674157	33.45	161466	24.18
8.482	3182813	18.76	237058	35.50
8.663	7369586	43.44	247141	37.01
10.267	608594	3.59	18780	2.81
13.769	128791	0.76	3234	0.48
Totals	16963941	100.00	667679	100.00

Page 1 of 1

Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A6_T0_PP_BH_25G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 6:12:26 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:01:47 AM (GMT -02:00)

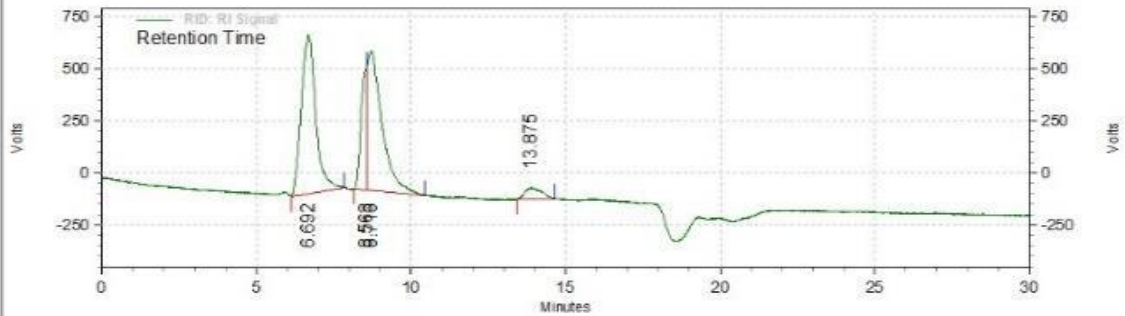


RID: RI Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.655	3654638	20.13	110351	22.17
8.486	13862521	76.36	366905	73.71
10.244	491180	2.71	15955	3.21
13.795	146165	0.81	4549	0.91
Totals	18154504	100.00	497760	100.00

Area % Report

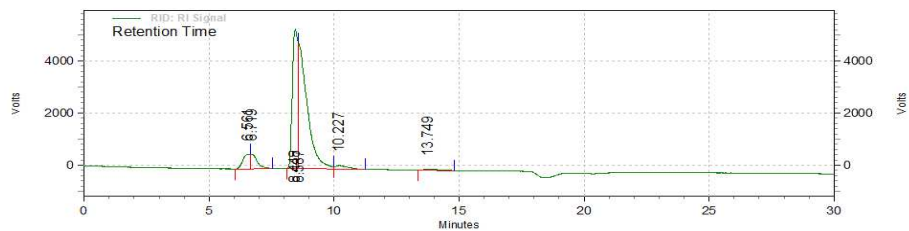
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A3_T1_PP_BH_50G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 5:07:47 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:00:02 AM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.692	2470678	43.93	76253	36.59
8.568	725860	12.91	59187	28.40
8.716	2217965	39.44	67443	32.36
13.875	209567	3.73	5523	2.65
Totals	5624070	100.00	208406	100.00

Area % Report

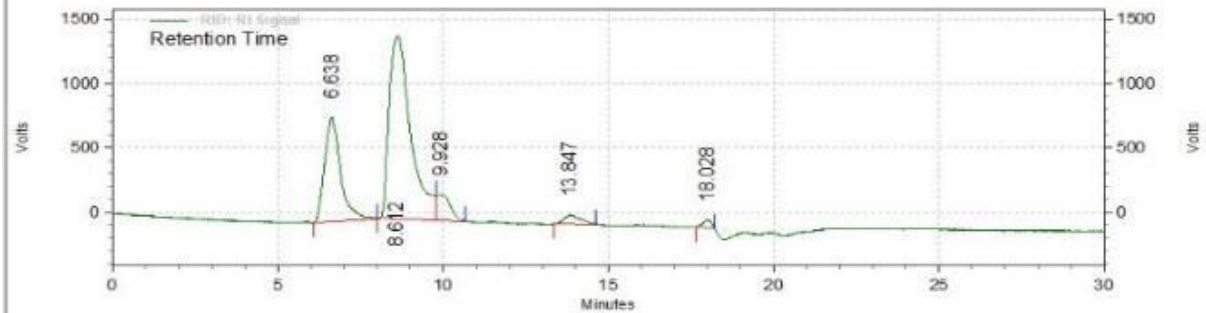
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A1_amostra_bruta2.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 4:03:07 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 1:57:51 AM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.561	1137107	4.98	56086	4.91
6.719	991858	4.35	54683	4.79
8.448	8535945	37.41	533981	46.73
8.587	11471290	50.28	479102	41.93
10.227	480978	2.11	13997	1.22
13.749	197817	0.87	4803	0.42
Totals	22814995	100.00	1142652	100.00

Area % Report

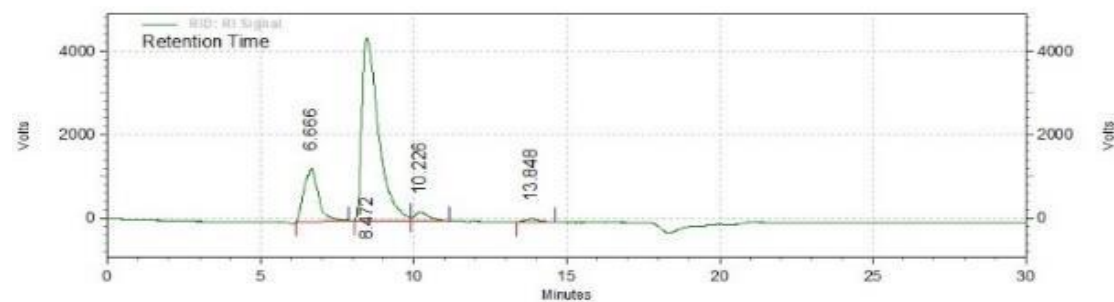
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A7_T1_PP_BH_25G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 6:44:45 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:02:20 AM (GMT -02:00)


RID: RI Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.638	2732211	27.02	81229	31.55
8.612	6466208	63.94	142707	55.43
9.928	549363	5.43	20114	7.81
13.847	249818	2.47	7096	2.76
18.028	115506	1.14	6306	2.45
Totals	10113106	100.00	257452	100.00

Area % Report

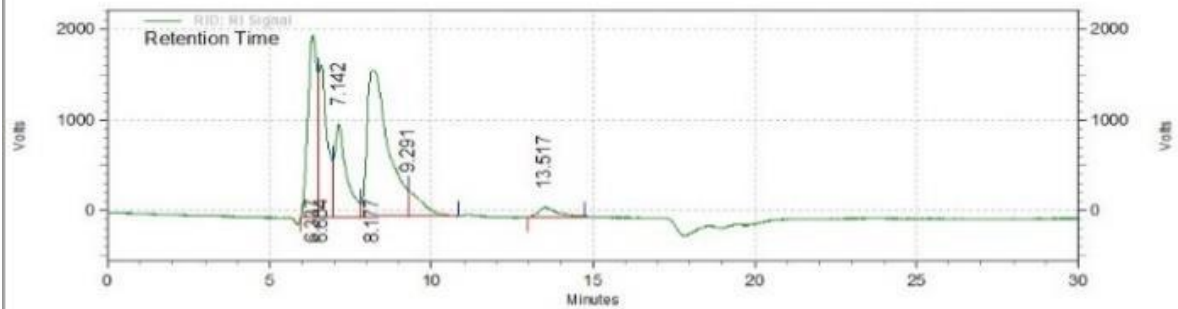
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A14_T0_PA_BH_25G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 10:31:08 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:06:25 AM (GMT -02:00)


RID: RI Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.666	4065335	18.91	126434	21.42
8.472	16524890	76.87	435250	73.72
10.226	678894	3.16	21680	3.67
13.848	229438	1.07	7029	1.19
Totals	21498557	100.00	590393	100.00

Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A21_T3_PA_SR_50G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 2:17:29 PM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:11:25 AM (GMT -02:00)

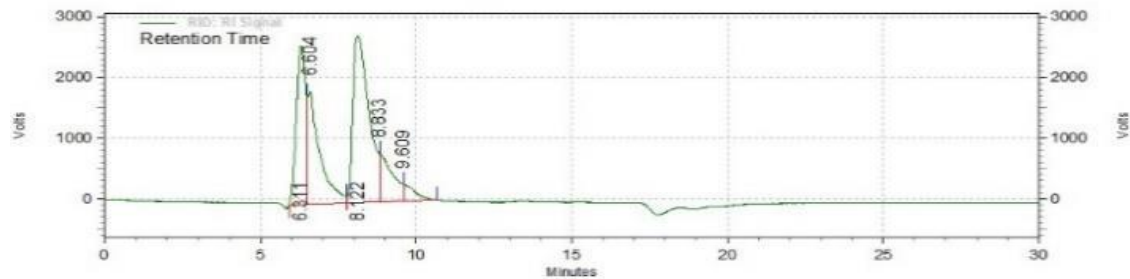
**RID: RI Signal****Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.337	3898006	21.32	199822	29.85
6.604	3060565	16.74	167454	25.02
7.142	2674390	14.63	101851	15.22
8.177	7372997	40.32	161420	24.12
9.291	852630	4.66	28090	4.20
13.517	425463	2.33	10677	1.60
Totals	18284051	100.00	669314	100.00

Page 1 of 1

Area % Report

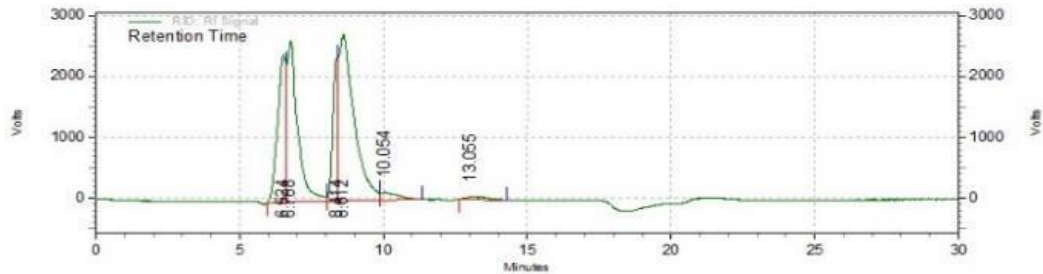
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A22_T0_PP_SR_50G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 2:49:50 PM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:11:58 AM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal****Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.311	5521110	23.59	262353	31.71
6.604	4955240	21.17	184593	22.31
8.122	9937703	42.46	274656	33.20
8.833	2285658	9.77	78907	9.54
9.609	704597	3.01	26735	3.23
Totals	23404308	100.00	827244	100.00

Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 26 a 49) - 27.11.23.rslt\A26_T0_B9_SR_50G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 3:23:06 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 12:34:33 AM (GMT -02:00)

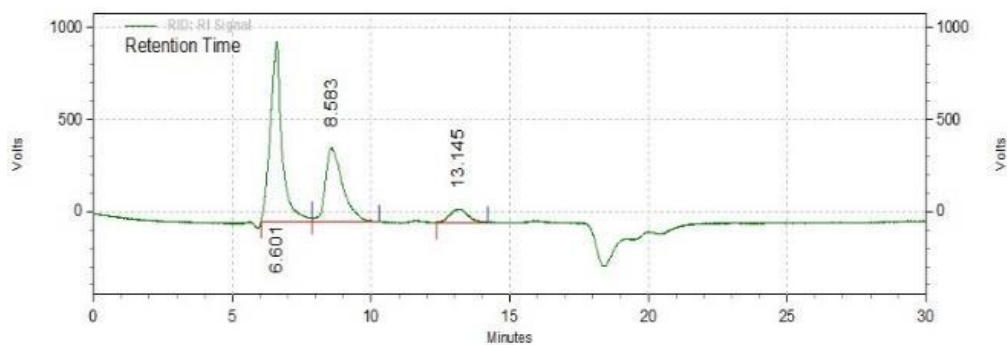
**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.524	4908088	19.33	242786	23.38
6.788	6752634	26.60	267046	25.72
8.414	2908579	11.46	237159	22.84
8.612	10073301	39.68	274777	26.46
10.054	513443	2.02	12434	1.20
13.055	232930	0.92	4207	0.41

Totals	25388975	100.00	1038409	100.00
--------	----------	--------	---------	--------

Area % Report

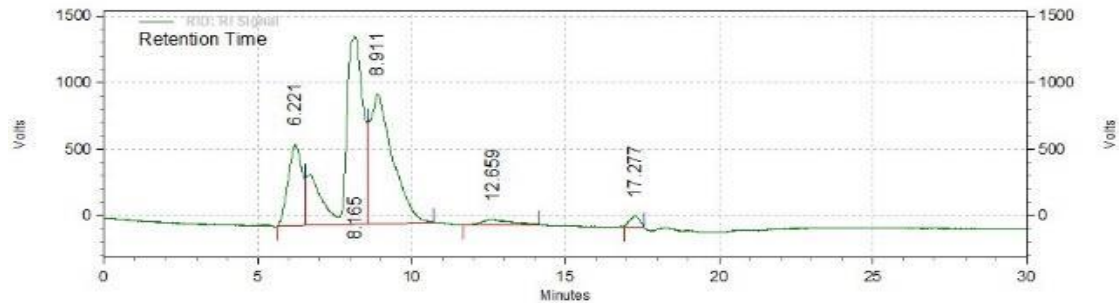
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 26 a 49) - 27.11.23.rslt\A28_T2_B9_SR_50G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 4:27:45 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 12:46:03 AM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.601	2834459	57.68	97299	67.25
8.583	1727819	35.16	40065	27.69
13.145	351581	7.15	7324	5.06

Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 26 a 49) - 27.11.23.rslt\A33_T3_B14_BH_25G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 6:37:04 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:37:36 AM (GMT -02:00)

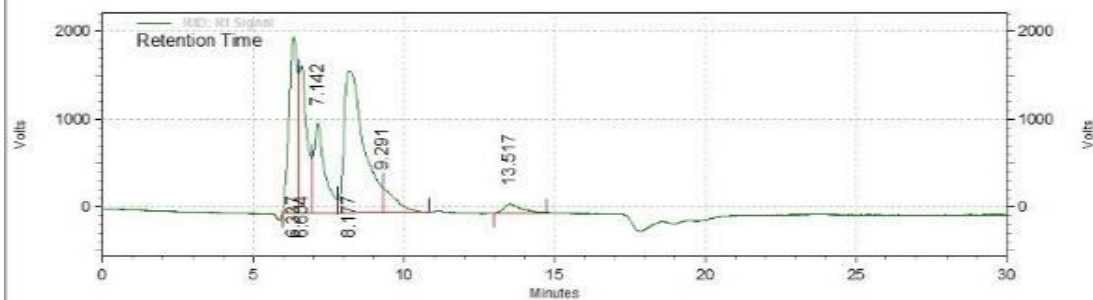

RID: RI Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.221	1861720	13.56	61264	19.59
8.165	6378093	46.45	141328	45.19
8.911	5033545	36.66	97650	31.22
12.659	280458	2.04	4289	1.37
17.277	177819	1.29	8235	2.63

Totals	13731635	100.00	312766	100.00
--------	----------	--------	--------	--------

Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 1 a 25) - 20.11.23.rslt\A21_T3_PA_SR_50G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 2:17:29 PM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:11:25 AM (GMT -02:00)

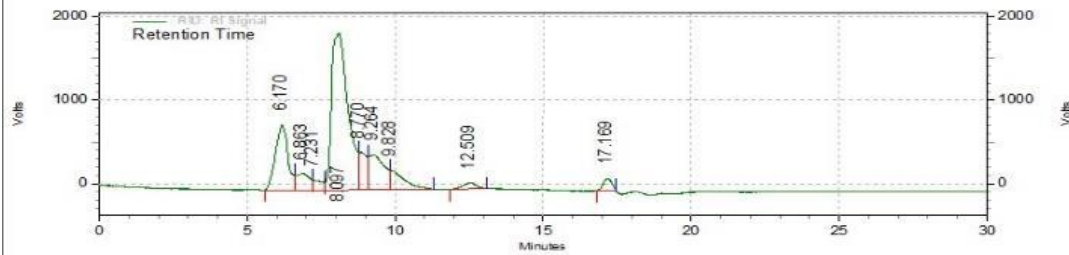

RID: RI Signal
Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.337	3898006	21.32	199822	29.85
6.604	3060565	16.74	167454	25.02
7.142	2674390	14.63	101851	15.22
8.177	7372997	40.32	161420	24.12
9.291	852630	4.66	28090	4.20
13.517	425463	2.33	10677	1.60

Totals	18284051	100.00	669314	100.00
--------	----------	--------	--------	--------

Area % Report

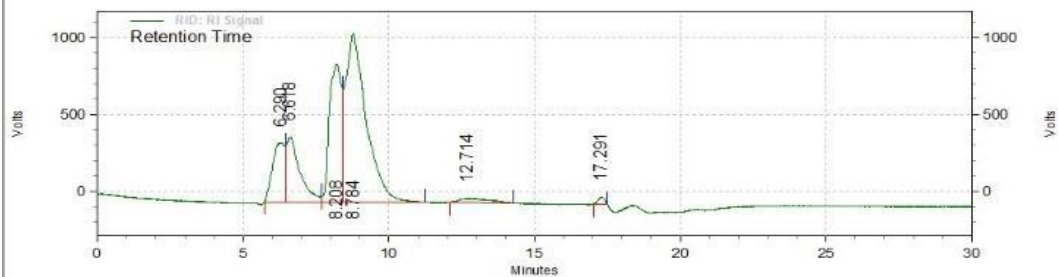
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 26 a 49) - 27.11.23.rslt\A40_T2_B9_BH_25G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 10:23:32 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 4:52:38 AM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.170	2316174	16.53	78120	18.22
6.863	601502	4.29	20023	4.67
7.231	234382	1.67	11740	2.74
8.097	7244613	51.70	187742	43.78
8.770	800455	5.71	44754	10.44
9.264	1521705	10.86	41475	9.67
9.828	765907	5.47	22827	5.32
12.509	239760	1.71	7414	1.73
17.169	287989	2.06	14708	3.43
Totals	14012487	100.00	428803	100.00

Area % Report

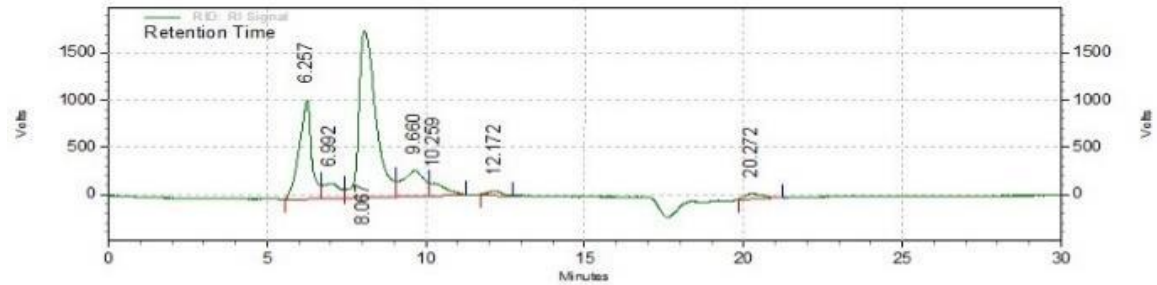
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 26 a 49) - 27.11.23.rslt\A32_T2_B14_BH_25G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 6:04:45 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 2:17:57 AM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.290	1082230	10.11	38426	13.37
6.618	1387200	12.96	42186	14.68
8.208	2595355	24.24	89644	31.19
8.784	5355795	50.02	109225	38.01
12.714	206666	1.93	2880	1.00
17.291	79824	0.75	5032	1.75
Totals	10707070	100.00	287393	100.00

Area % Report

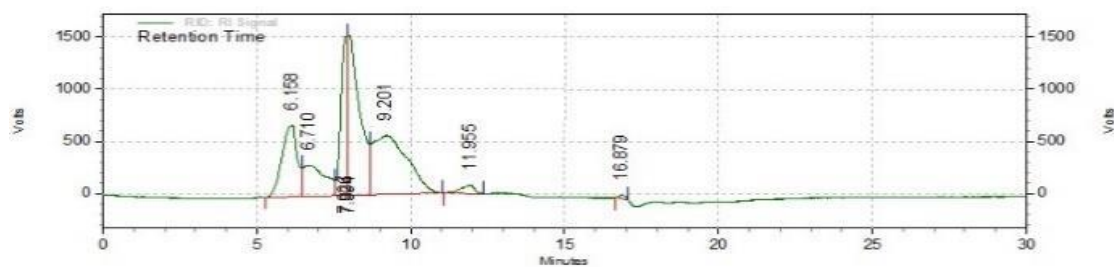
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 46 a 49) - 28.11.23.rslt\A46_T0_B9_SR_50G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 6:51:03 PM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 5:39:01 AM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal****Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.257	2826075	23.46	105202	30.17
6.992	579253	4.81	15830	4.54
8.067	6561139	54.46	177112	50.79
9.660	1287466	10.69	27479	7.88
10.259	449322	3.73	13303	3.81
12.172	123764	1.03	4333	1.24
20.272	220875	1.83	5451	1.56
Totals	12047894	100.00	348710	100.00

Area % Report

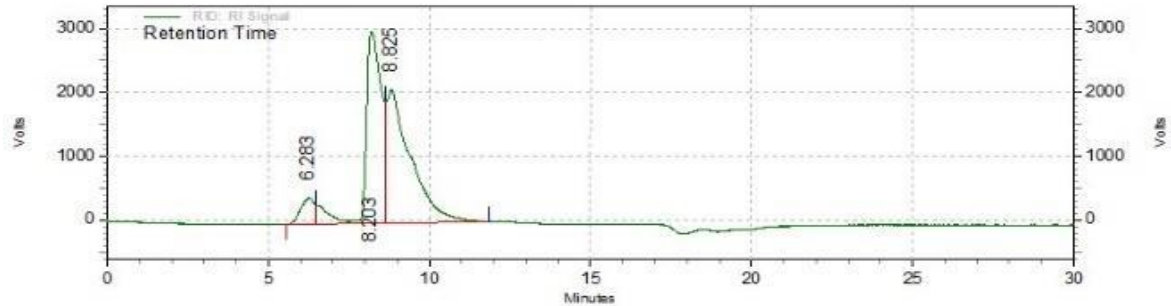
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras com padrao) - 05.12.23.rslt\A51_T1_PP_SR_25G.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 11:34:49 PM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 1:19:13 AM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal****Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.158	2333798	15.72	68863	14.61
6.710	1507914	10.16	29489	6.26
7.926	2014368	13.57	151827	32.21
7.994	4338784	29.23	153491	32.56
9.201	4353499	29.33	56378	11.96
11.955	247270	1.67	7959	1.69
16.879	49540	0.33	3344	0.71
Totals	14845173	100.00	471351	100.00

Area % Report

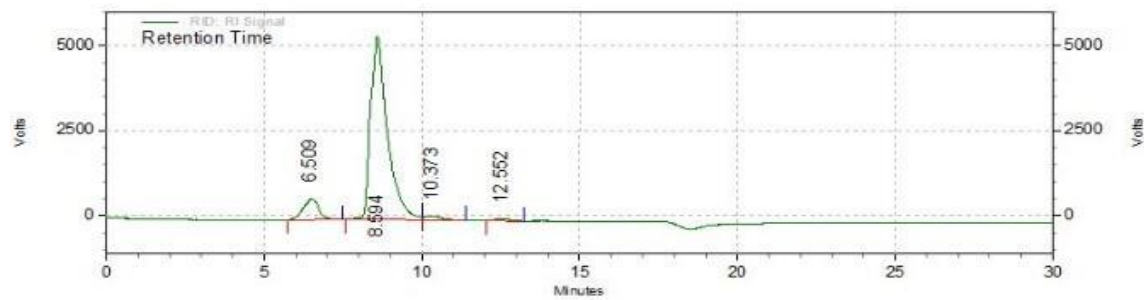
Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 50 a 65) - 30.11.23.rslt\AMOSTRA_BRUTA_06_mL.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 10:38:12 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 7:03:51 PM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.283	1239341	5.51	41330	7.49
8.203	10480362	46.58	300680	54.51
8.825	10779724	47.91	209594	38.00
Totals	22499427	100.00	551604	100.00

Area % Report

Data File: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Result\Clerison\Amostras Fase 2\FASE 2 (amostras 50 a 65) - 30.11.23.rslt\AMOSTRA_BRUTA_2.dat
 Method: C:\Enterprise\Projects\IQOQ\Method\Projeto_Clerison - 65.met
 Acquired: 1/1/2015 2:00:39 AM (GMT -02:00)
 Printed: 1/1/2015 6:54:25 PM (GMT -02:00)

**RID: RI Signal
Results**

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
6.509	2103471	9.23	62275	10.08
8.594	20101119	88.19	540750	87.50
10.373	439254	1.93	10972	1.78
12.552	148166	0.65	4010	0.65
Totals	22792010	100.00	618007	100.00