

OBTEÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE
Pseudomonas mendocina.

01/92

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

TESE APRESENTADA A FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS.

Campinas, SP, 1992.

OBTENÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DE

Pseudomonas mendocina.

Parcer

*Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por José Miguel Müller
e aprovada pela Comissão Julgadora em 13.01.*

Ranulfo Monte Alegre

JOSÉ MIGUEL MÜLLER

ENGENHEIRO DE ALIMENTOS

PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE

ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

Ranulfo Monte Alegre
Dr. RANULFO MONTE ALEGRE

(ORIENTADOR)

Terezinha de Jesus Garcia Salva
Dra. TEREZINHA DE JESUS GARCIA SALVA
(MEMBRO)

Jose Luiz Pereira
Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PEREIRA
(MEMBRO)

Lucia Durantt
Prof. Dra. LÚCIA DURANTT
(SUPLENTE)

Campinas, 13 de 01 de 1992

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, pela valiosa orientação e constante apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva, Prof. Dr. José Luiz Pereira e Profa. Dra. Lucia Regina Durrant e a Dra. Silvia Yuko Eguchi pelas sugestões apresentadas na redação final da presente tese.

Ao Prof. Dr. Sebastião Amorin e a Gladston Luiz da Silva pelo auxílio na parte estatística.

Ao CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Ao FAEP pelo auxílio concedido à pesquisa.

A Fundação Atlantic pela premiação concedida ao presente trabalho.

A Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello e a Dra. Dirce Mithico Yamaoka Yano.

Aos professores: Myriam, Eliana, Dulce, Reguly, Walter, Jorge, Sônia, Maçada e Berasain e ao funcionário Joaquim (Juca) da Universidade do Rio Grande.

Aos colegas da Pós-graduação e aos funcionários do laboratório de Bioengenharia.

A ABIA pelas cópias xerográficas.

A CARMEN E
AOS MEUS PAIS,
QUE SÃO BOA GENTE.

Creo que podría vivir con los animales,
son tan secretos e tan plácidos,
me detengo y me demoro mirándolos.
No se atormentan ni se quejan de su condición,
No se quedan despiertos toda la noche
ni lamentan sus culpas,
No me abruman con discusiones de
sus deberes para con dios,
Ni uno solo está dominado por
la locura de tener cosas,
Ni uno solo se arrodilla ante otro,
así fuera de su especie
que vivió hace miles de años.
Ni uno solo es decente o desdichado
en toda la faz de la tierra

WALT WHITMAN (1819-1892)

Traduzido por J. L. Borges

RESUMO

Esta pesquisa teve o propósito de estudar a biosíntese de polissacarídeos por *Pseudomonas mendocina*.

Inicialmente foram isoladas com o antibiótico carbenicilina duas cepas mutantes, que estão depositadas na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" sob os números:

- CCT 2244 - *Pseudomonas mendocina* M02
- CCT 2245 - *Pseudomonas mendocina* M13

Em experimentos realizados em Erlenmeyers foi estudada a capacidade dos mutantes e da cepa selvagem, metabolizarem diferentes tipos de substratos (glicose, sacarose, lactose e gluconato) em diferentes concentrações. A glicose e a sacarose foram os melhores substratos e o mutante M13 apresentou a maior taxa de bioconversão, 52% para concentração de glicose de 20,07 g/l e 40% para concentração de sacarose de 29,93 g/l, sendo por isso selecionado para os experimentos em cultura em batelada.

Estes experimentos foram ajustados de forma que os resultados pudessem ser avaliados pelo método estatístico de superfície de resposta. Estudaram-se os efeitos de vazão de ar e concentração de nitrogênio na forma de sulfato de amônio. As melhores taxas médias de bioconversão foram de 0,46 para concentração de 860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e vazão de ar de 1,5 l/h e 0,42 para concentração de 1.160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e vazão de ar de 2,5 l/h.

Os resultados obtidos demonstram que a *Pseudomonas mendocina* M13 apresentou bons rendimentos de bioconversão, sendo uma boa alternativa para a produção industrial de biopolímeros.

SUMMARY

This research has the purpose of studying the biosynthesis of polisaccharides by *Pseudomonas mendocina*.

Initially were isolated two mutant strains with the carbenicilin antibiotic, that are dispensable in the André Tosello Tropical Foundation for Research and Technology under the numbers:

- CCT 2244 - *Pseudomonas mendocina* M02
- CCT 2245 - *Pseudomonas mendocina* M13

In experiments made in Erlenmeyers has been studied the capacity of the mutants and wild type, to metabolize different kinds of substrates (glucose, sucrose, lactose and gluconate) in different concentrations. Glucose and sucrose were the best substrates and the mutant strain M13 had the best bioconversion rates, 52% for initial glucose concentration of 20.07 g/l and 40% for initial sucrose concentration of 29.93 g/l, reason of its selection for the experiments in batch culture.

These experiments were adjusted in form that the results could be evaluated by the response surface methodology. It was studied the effects of air flow and of nitrogen concentration in the ammonium sulfate form. The averages of bioconversion rates were of 0.46 for concentration of 860 mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and air flow of 1.5 l/h and 0.42 for concentration of 1,160 mg/l of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 2.5 l/h of air flow.

The results obtained show that *Pseudomonas mendocina* M13 exhibits good bioconversion rates and it can be an alternative for industrial biopolymer production.

INDICE

	Pag.
ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS.	x
RESUMO	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Hidrocolóides	04
2.2. Propriedades funcionais dos hidrocolóides.	04
2.3. Polissacarídeos microbianos	09
2.3.1. Tipos de polissacarídeos	10
2.3.1.1. Polissacarídeos neutros	10
2.3.1.2. Polissacarídeos iônicos	11
2.4. Obtenção e produção de polissacarídeos por microrganismos	12
2.4.1. Gomas comercialmente utilizadas	13
2.4.2. Processo fermentativo	14
2.4.3. Separação dos polissacarídeos.	14
2.5. Alginato microbiano	15
2.5.1. Características gerais	15

2.5.2. Produção	10
2.5.3. Aplicações	21
2.5.4. Toxicologia	21
2.6. <i>Pseudomonas</i> que produzem outros tipos de polissacarídeos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Equipamentos utilizados.	27
3.2. Reagentes	27
3.3. Microrganismo	29
3.3.1. Meio para isolamento	29
3.3.2. Isolamento de mutantes resistentes a antibiótico.	29
3.4. Metodologia de fermentações	29
3.4.1. Meio de manutenção	30
3.4.2. Meio de fermentação.	31
3.4.3. Pré-fermentação	31
3.4.3.1. Inóculo 1.	32
3.4.3.2. Inóculo 2.	32
3.4.4. Fermentação	32
3.4.4.1. Fermentação em erlenmeyers	32
3.4.4.2. Fermentação em fermentadores de bancada	33
3.5. Análises efetuadas	33
3.5.1. Determinação da concentração de substrato	33
3.5.1.1. Separação das células.	33
3.5.1.2. Hidrólise enzimática da lactose	34

3.5.1.3. Hidrólise enzimática	
da sacarose	34
3.5.1.4. Determinação de glicose	35
3.5.2. Determinação da concentração	
de polissacarídeo.	35
3.5.3. Determinação de massa seca.	36
3.5.4. Determinação de pH	36
3.6. Método estatístico para otimização	
da vazão de ar e concentração de nitrogênio	36
3.6.1. Primeiro conjunto de experimentos	37
3.6.2. Segundo conjunto de experimentos.	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	39
4.1. Microrganismo	39
4.1.1. Seleção por resistência a antibiótico	39
4.2. Fermentação.	40
4.2.1. Ensaio em Erlenmeyers	40
4.2.1.1. Efeito do tipo de substrato.	40
4.2.1.2. Efeito da concentração	
de substrato.	48
4.2.2. Experimentos realizados em	
fermentadores de bancada	51
4.2.2.1. Resultados referentes ao	
primeiro conjunto de pontos.	51
4.2.2.2. Resultados referentes ao	
segundo conjunto de pontos	61
4.3. Análise estatística	71
5. CONCLUSÕES	79
6. SUGESTÕES	81

7. BIBLIOGRAFIA	85
8. ANEXO	89

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos hidrocolóides comestíveis. . . .	05
Tabela 2 - Propriedades funcionais dos hidrocolóides. . . .	07
Tabela 3 - Seleção de mutantes de <i>Pseudomonas mendocina</i> FTPT 0597 resistentes a carbenicilina.	39
Tabela 4 - Avaliação da fermentação de glicose em Erlenmeyers por <i>P. mendocina</i> FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13	41
Tabela 5 - Avaliação da fermentação de sacarose em Erlenmeyers por <i>P. mendocina</i> FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13	42
Tabela 6 - Avaliação da fermentação de lactose em Erlenmeyers por <i>P. mendocina</i> FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13	43
Tabela 7 - Avaliação da fermentação de gluconato em Erlenmeyers por <i>P. mendocina</i> FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13	44
Tabela 8 - Avaliação da fermentação de glicose em Erlenmeyers por <i>P. mendocina</i> FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13	45
Tabela 9 - Avaliação da fermentação de sacarose em Erlenmeyers por <i>P. mendocina</i> FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13	46

Tabela 10 - Avaliação da fermentação de lactose em Erlenmeyers por <i>P. mendocina</i> FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13	47
Tabela 11 - Fermentação de glicose em Erlenmeyers pelo mutante M13 de <i>P. mendocina</i>	49
Tabela 12 - Fermentação de sacarose em Erlenmeyers pelo mutante M13 de <i>P. mendocina</i>	50
Tabela 13 - Taxa de conversão média de glicose em biopolímero por <i>P. mendocina</i> M13	76

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Fermentação de glicose por mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 12 experimentos no nível (2,2), 560 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar 52
- Figura 2 - Fermentação de glicose por mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (1,1), 260 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,5 l/h de ar 53
- Figura 3 - Fermentação de glicose por mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (1,3), 260 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3,5 l/h de ar 54
- Figura 4 - Fermentação de glicose por mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (3,1), 860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,5 l/h de ar 55
- Figura 5 - Fermentação de glicose por mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (3,3), 860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3,5 l/h de ar 56
- Figura 6 - Taxa de bioconversão ($Y_{P/s}$) de glicose pela cepa mutante M13 de *P. mendocina*, para os níveis (2,2), (1,1), (1,3), (3,1) e (3,3) 57
- Figura 7 - Fermentação de glicose por mutante M13 de *P.*

	<i>mendocina</i> FTPT 0597 em fermentador de bancada.	
	Média de 4 experimentos no nível (3,3),	
	1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar	62
Figura 8 -	Fermentação de glicose por mutante M13 de <i>P.</i>	
	<i>mendocina</i> FTPT 0597 em fermentador de bancada.	
	Média de 2 experimentos no nível (1,3),	
	710 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar	63
Figura 9 -	Fermentação de glicose por mutante M13 de <i>P.</i>	
	<i>mendocina</i> FTPT 0597 em fermentador de bancada.	
	Média de 2 experimentos no nível (5,3),	
	1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar	64
Figura 10 -	Fermentação de glicose por mutante M13 de <i>P.</i>	
	<i>mendocina</i> FTPT 0597 em fermentador de bancada.	
	Média de 2 experimentos no nível (3,1),	
	1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0 l/h de ar	65
Figura 11 -	Fermentação de glicose por mutante M13 de <i>P.</i>	
	<i>mendocina</i> FTPT 0597 em fermentador de bancada.	
	Média de 2 experimentos no nível (3,5),	
	1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 4,0 l/h de ar	66
Figura 12 -	Fermentação de glicose por mutante M13 de <i>P.</i>	
	<i>mendocina</i> FTPT 0597 em fermentador de bancada.	
	Média de 2 experimentos no nível (4,4),	
	1460 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3,5 l/h de ar	67
Figura 13 -	Fermentação de glicose por mutante M13 de <i>P.</i>	
	<i>mendocina</i> FTPT 0597 em fermentador de bancada.	
	Média de 2 experimentos no nível (4,2),	
	1460 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,5 l/h de ar	68
Figura 14 -	Superfície de resposta para um tempo de	
	fermentação de 5 horas pela mutante M13	

	de <i>Pseudomonas mendocina</i> FIPI 0597	72
Figura 15 - Superfície de resposta para um tempo de fermentação de 8 horas pelo mutante M13 de <i>Pseudomonas mendocina</i> FIPT 0597		73
Figura 16 - Superfície de resposta para um tempo de fermentação de 11 horas pelo mutante M13 de <i>Pseudomonas mendocina</i> FIPT 0597		74
Figura 17 - Superfície de resposta para um tempo de fermentação de 15 horas pelo mutante M13 de <i>Pseudomonas mendocina</i> FIPT 0597		75

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 - Curva padrão de alginato de sódio. Absorbância a 490 nm x concentração (g/l)	89
Anexo 2 - Regressões polinomiais para os tempos de fermentação de 5, 8, 11 e 15 horas	90
Anexo 2 (continuação) - Regressões polinomiais para os tempos de fermentação de 5, 8, 11 e 15 horas.	91

1. INTRODUÇÃO

Gomas, colóides, hidrocolóides, polímeros solúveis em água são algumas denominações para materiais que possuem a capacidade de tornar sistemas aquosos mais espessos e viscosos ou formar géis. Estes materiais são encontrados em exudados de plantas ou arbustos, extratos de plantas ou algas marinhas, farinha de grãos ou cereais, gomas de processos fermentativos e outros produtos naturais. Recentemente foram obtidas novas gomas modificadas quimicamente ou derivadas de gomas naturais. Algumas novas gomas são desenvolvidas através da síntese química produzindo novos polímeros que possuem propriedades hidrofílicas completamente novas e diferentes (Glicksman, 1982).

As propriedades adesivas destes compostos eram conhecidas há milhares de anos e o uso de gomas pode ser traçado voltando-se à alvorada, ao homem das cavernas. O primeiro homem da caverna expressava suas habilidades artísticas através de lamas coloridas nas paredes da sua caverna. Para melhorar a adesão da "tinta", gomas naturais eram adicionadas à sementes amassadas, sangue, ovos, leite de plantas e outros materiais. Subsequentemente o termo "têmpera" foi usado para referir-se a mistura de pigmento com cola ou clara de ovo ao invés de óleo (Glicksman, 1982).

Os egípcios no período 3000 à 2000 A.C. decoravam as paredes de suas casas e templos com desenhos executados com "têmpera". O uso de goma arábica continua até o presente em tintas

a base de água. Em adição a aderência, as gomas são também conhecidas pelas suas propriedades de espessamento, gelatinização e propriedades nutricionais em casos específicos (Glicksman, 1982).

Através dos séculos algumas secreções naturais de plantas foram descobertas, e o conjunto das gomas foi se ampliando para todo tipo de secreções exudadas, incluindo desta maneira materiais como: chiclete, borracha látex, resinas de diversas plantas e uma quantidade de outros materiais (Glicksman, 1982).

Com o tempo, a nomenclatura e a terminologia destes materiais tornaram-se mais e mais confusas, e somente após a segunda guerra mundial houve um grande esforço dos cientistas nesta área, para adotar uma terminologia uniforme. Hoje, para propósitos práticos, as "gomas" são divididas em duas categorias, (1) solúveis em água e (2) insolúveis em água. Chiclete, borracha, etc. são agora classificados como resinas e as "gomas" solúveis em água são designadas cientificamente de hidrocolóides. Gomas não são verdadeiros colóides, mas são antes polímeros com propriedades coloidais, que permanecem suspensos mesmo sob a influência da gravidade e não são visíveis através de observação com microscópio. De fato, gomas ou hidrocolóides formam soluções moleculares na maior parte dos casos (Glicksman, 1982).

Apesar da maioria dos hidrocolóides serem polissacarídeos, progressos no sentido de sistematizar a nomenclatura reduziram a terminação "an" para designar uma substância como sendo polissacarídeo. Logo o nome genérico de um derivado da glicose é "glican" para a arabinose "araban" e assim por diante. Nomes comuns tem mudado para esta forma como "carragenin" para "carragenan", outros entretanto, como são

bastante conhecidos como "pectin", "amilopectin", etc. persistem na nova terminologia (Glicksman, 1982).

Recentemente muitos trabalhos científicos descrevem a produção, composição, biosíntese e usos de gomas microbianas (Sanford, 1982). Sua produção é uma alternativa válida para suprir parte do consumo de polissacarídeos (Sutherland, 1986).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HIDROCOLÓIDES

Muitos hidrocolóides são polissacarídeos, ou seja, polímeros de açúcares simples. Os polissacarídeos são comparáveis a longas cadeias de monossacarídeos possuindo de uma centena a vários milhares de unidades. O peso molecular varia de 30.000 a 400.000.000 e os tipos de monossacarídeos que o constituem é pequeno, usualmente entre 1 e 6 e raramente acima de 10 (Sand, 1982).

Uma classificação dos polissacarídeos ou hidrocolóides comestíveis, baseada em sua origem é mostrada na tabela 1.

2.2. PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS HIDROCOLÓIDES

A utilidade e importância dos hidrocolóides são baseadas nas suas propriedades funcionais. Hidrocolóides são polímeros de cadeia longa que se dissolvem ou se dispersam em água, produzindo um efeito espessante e um aumento de viscosidade. Esta propriedade espessante é comum em todas as gomas e é a razão básica para todos os seus usos. O grau de espessamento varia entre as gomas. Algumas produzem viscosidades a baixas concentrações, usualmente próximas de 1%, diferindo no tipo de viscosidade e na característica do fluxo, que são importantes com relação a outros aspectos (Glicksman, 1982).

Tabela 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS HIDROCOLÓIDES COMESTÍVEIS

EXUDADOS -	Goma arábica, caraia, gati, tragacat.
EXTRATOS - Algas Marinhas:	Agar, alginatos, carragenas, <i>furcellaran.</i>
Plantas:	Pectina, arabinogalactana.
Animal:	Gelatina.
FARINÁCEOS - Sementes:	Guar, <i>locust bean.</i>
Cereais:	Amido, celulose microcristalina.
FERMENTADOS -	Dextrana, Xantana, <i>curdlan.</i>
QUIMICAMENTE MODIFICADOS -	
Derivados de celulose:	Metil- celulose, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, CMC (carbiximetilcelulose).
Outros derivados:	Amidos modificados PGA (propileno glicol alginato), <i>metoxyl pectin.</i>
SINTÉTICOS -	<i>Polyvinylpyrrolone PVP</i> ®, <i>Carboxyvinyl polimers</i> CARBOPOL ®, <i>Polyethylene oxide</i> <i>polymers POLYOX</i> ®.

FONTE: Glicksman (1982)

As características reológicas de soluções de polissacarídeos, melhora os sistemas de líquido-alimento, podendo serem relacionadas com as propriedades organolépticas do produto e deste modo à sua aceitabilidade. Desta forma as características reológicas das soluções de polissacarídeos servem de ajuda para a formulação específica de alimentos (Glicksman, 1982).

Embora as gomas propiciem viscosidade a soluções, algumas possuem a propriedade de formar géis. A gelatinização é um fenômeno envolvendo a associação de ligações cruzadas das cadeias do polímero, formando uma rede tridimensional e imobilizando a água na forma de uma estrutura firme e rígida que é resistente ao fluxo sob pressão. Em adição as propriedades de espessamento e gelatinização, os hidrocolóides possuem algumas propriedades funcionais que são usadas em aplicações e desenvolvimento de produtos alimentícios. Essas propriedades são mostradas na tabela 2 e são o fator chave para o sucesso ou fracasso de um produto alimentício. Em muitas aplicações são utilizadas mais de uma destas propriedades. No último quarto de século o uso e importância destes compostos têm crescido bastante (Glicksman, 1982).

O efeito físico destes materiais deve-se à interação dos polissacarídeos com os íons e moléculas presentes no meio e também a interações com eles mesmos. Desta forma polissacarídeos precisam interagir de forma apropriada e benéfica com proteínas, lipídeos, e outras moléculas comumente encontradas em alimentos, bem como interagir continuamente com moléculas de água. Através destas interações, os polissacarídeos realizam suas funções usuais, que

Tabela 2 - PROPRIEDADES FUNCIONAIS DOS HIDROCOLÓIDES

FUNÇÃO	EXEMPLO
- Adesivo	Coberturas de açúcar, glacê para cobertura de bolos.
- Agente de ligação	Alimento para animais
- Agente de encorpamento	Bebidas dietéticas
- Inibidor de cristalização	Sorvete, alimentos congelados, xaropes doces.
- Agente de clarificação	Vinho, cerveja.
- Agente de turvamento	Bebidas alcoólicas, licores.
- Agente de cobertura	Confeitos, rodela de cebola.
- Fibras dietéticas	Cereais, pão.
- Emulsificante	Temperos para saladas.
- Agente de encapsulação	Aromas em pó.
- Formador de filmes	Coberturas de proteção, embutidos.
- Agente de floculação	Vinho.
- Estabilizador de espuma	Cerveja.
- Agente de gelatinização	Pudins, sobremesas, confeitos.
- Moldagem	Balas de açúcar e de goma.
- Colóide de proteção	Emulsões de aroma.
- Estabilizante	Molhos para saladas, sorvete.
- Agente de suspensão	Leite achocolatado.
- Agente de expansão	Produtos processados de carne.
- Inibidor de sinerese	Alimentos congelados, queijos.
- Espessante	Geléias, maioneses, recheio de tortas.

FONTE: Glicksman (1982)

são o seu uso para produzir viscosidade, estabilidade a soluções, capacidade de suspensão, ação emulsificante e gelatinização. Quando utiliza-se uma combinação de gomas, há necessidade de serem compatíveis entre si e com os materiais biológicos presentes (Glicksman, 1982).

Morris (1990) apresenta uma revisão sobre o uso de polissacarídeos microbianos em alimentos tais como: o uso da xantana como agente espessante e de suspensão; o efeito sinérgico da combinação de goma xantana e galactomanana; "gellan gum" como agente de gelatinização; uso da combinação de gelatina e gelana como agente de encapsulação.

Reynolds (1990) reporta que agentes espessantes produzidos por microrganismos, já são considerados aceitáveis para usos em alimentos, discutindo também o efeito sinérgico entre polissacarídeos microbianos como xantana e gelana, suas características de gelatinização e encapsulação de ingredientes de alimentos.

Thom e Col. (1982) observaram que sistemas alginato-pectina apresentam maior capacidade de espessamento e gelatinização em pH baixo. Esta característica deve-se à interação entre as seqüências de poliguluronato e seqüências não modificadas de pectina.

Imeson e col. (1980) produziram fibras de uma solução de 2,0% de alginato e 6,0% de plasma de sangue de porco por extrusão. As fibras foram coaguladas em solução de cloreto de cálcio 5% e pH 4,0, a resistência das mesmas foi estudada e relacionada com a composição de ácidos gulurônico e manurônico do alginato. Essa mistura alginato-proteína tem potencial para conferir uma faixa de

textura em produtos alimentícios, incluindo produtos de carne.

2.3. POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Nos Estados Unidos o consumo total de gomas microbianas tem crescido aproximadamente 8% ao ano. Em alguns casos, as gomas microbianas têm tomado o mercado de outras gomas, derivados de petróleo e polímeros sintéticos. Atualmente há um interesse muito grande em novos polímeros naturais bem como na procura de gomas microbianas para aplicação em alimentos (Sandford, 1979).

As gomas introduzidas no mercado nos últimos anos são de origem microbiana, pois possuem propriedades e características funcionais que superam as de plantas e algas marinhas. Por outro lado os polissacarídeos de origem microbiana apresentam vantagens adicionais: sua produção não depende de condições climáticas e não necessitam ser colhidos, pode-se produzi-los em regiões onde não é possível a produção de gomas naturais; obtem-se maior uniformidade nas propriedades, pureza e características de qualidade, visto que sua biosíntese é em geral muito específica; é possível alterar potencialmente as características dos microrganismos produtores a fim de melhorar a produção ou produzir polissacarídeos com propriedades especiais; isto é praticamente impossível com as demais gomas naturais (Fenantes, 1985).

Embora quase todos os microrganismos vivos produzam polissacarídeos, bactérias e fungos são os mais facilmente adaptados à produção comercial em larga escala. Bactérias e fungos podem facilmente crescer como culturas puras em grandes fermentações, dispensando também procedimentos de purificação de alto custo e os polissacarídeos não ficam presos na célula.

Naturalmente, polissacarídeos de microrganismos patogênicos aos mamíferos devem ser dispensados (Sandford, 1982).

2.3.1. TIPOS DE POLISSACARÍDEOS

Microrganismos produzem três tipos distintos de polímeros: (1) polissacarídeos extracelulares, (2) polissacarídeos estruturais, e (3) intrapolissacarídeos. Na maioria dos casos os polissacarídeos extracelulares são solúveis em água e suas propriedades hidrocoloidais podem ser classificadas em dois tipos: (1) capsulares, que fazem parte da parede celular, e (2) lineares, que se acumulam fora da parede celular e difundem continuamente no meio de cultura. Os polissacarídeos produzidos na forma linear são polímeros de alta viscosidade com propriedades funcionais importantes, possuem um grande potencial de desenvolvimento industrial e podem ser produzidos em grande quantidade sob condições controladas em fermentadores (Glicksman, 1982).

São numerosas as classes de polissacarídeos de origem microbiana e alguns, cuja fonte comercial são plantas ou algas marinhas, podem ser produzidos por vários microrganismos. Os polissacarídeos microbianos podem ser agrupados de várias formas e é conveniente classificá-los de acordo com sua carga: ácidos, básicos ou neutros. Os microrganismos produtores de polissacarídeos extracelulares são encontrados em plantas, solo e moendas de açúcar (Sandford, 1982).

2.3.1.1. POLISSACARÍDEOS NEUTROS

Apesar dos polissacarídeos neutros serem numerosos,

existem poucos estudos avaliando suas possibilidades comerciais. Entre eles dois são sintetizados por fungos e os restantes por bactérias. Os polímeros fúngicos são Scleroglucana e Pullulana sintetizados pelos gêneros *Sclerotium* e *Aureobasidium pullulans* respectivamente. Os polímeros de origem bacteriana são: a Curdlana sintetizado por *Alcaligenes faecalis* variedade *myxogenes*, a Dextrana sintetizada por várias espécies de bactérias sendo a mais importante *Leuconostoc mesenteroides* (Sutherland - 1986) e um polissacarídeo sintetizado por *Methylobionas mucosa* e *Methylobionas methanolica* a partir do metanol (Lin, 1990).

2.3.1.2. POLISSACARÍDEOS IÔNICOS

Polissacarídeos iônicos são também numerosos e a estrutura e propriedades de muitos deles é conhecida, sendo que alguns deles possuem aplicação na indústria. Os polissacarídeos desta classe são de origem microbiana. Dentre eles a xantana é o polissacarídeo de maior aplicação industrial, sendo sintetizada por *Xanthomonas campestris* (Sutherland, 1986). A xantana possui boas características reológicas, sendo resistente a altas temperaturas e tendo a sua viscosidade pouco afetada por altas concentrações de sais e pelo pH (Tait, 1986).

O alginato sintetizado por *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas aeruginosa* diferenciou-se do alginato produzido por algas marinhas na quantidade de grupos O-acetil, resultando em polímeros que proporcionaram uma faixa bastante extensa de viscosidade (Sutherland, 1982).

A *Beijerinchia indica* produz um polissacarídeo semelhante a xantana e a sua viscosidade é estável numa faixa considerável

de pH, seu comportamento reológico é pseudoplástico e na presença de sais sua viscosidade é aumentada. *Arthrobacter viscosus* e *Arthrobacter stabilis* sintetizam um polímero cuja viscosidade é aumentada com a adição de sais, estável à altas temperaturas e em uma faixa de pH 5 a 10. A *Erwinia tahitica* produz um polissacarídeo que possui alta viscosidade em temperaturas abaixo de 60°C, em uma faixa de pH 4 a 10 seu comportamento reológico é pseudoplástico (Sutherland - 1986).

A *Pseudomonas elodea* produz um gel semelhante ao agar ou carragena, sendo recentemente comercializado sob a marca "Gelrite" (Jansson, 1983).

2.4. OBTENÇÃO E PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS POR MICROORGANISMOS

A capacidade dos microrganismos de produzirem gomas, já é conhecida há muito tempo. Estes polímeros quando extracelulares, são encontrados na forma de uma discreta cápsula ao redor da célula ou secretada como uma massa amorfa no meio circundante. Estes polissacarídeos microbianos possuem novas e únicas propriedades, para as quais vêm sendo descobertas uma ampla variedade de aplicações em alimentos, fármacos, e em outras áreas (Glicksman, 1982).

A primeira goma microbiana importante foi a dextrana, isolada do suco da beterraba ou vinho na metade do século XIX e identificada como carboidrato. Estas dextranas foram os primeiros polissacarídeos a serem produzidos. Nos últimos anos muitas gomas biosintéticas úteis, têm sido desenvolvidas em vários laboratórios que conduzem pesquisas nesta área (Glicksman, 1982).

2.4.1. GOMAS MICROBIANAS COMERCIALMENTE UTILIZADAS

A mais importante goma biosintética é a xantana. Este polímero só recentemente foi comercializado e sua utilização em alimentos foi autorizada em 1969 pelo Food and Drug Administration (FDA). Foram desenvolvidas uma grande variedade de novas aplicações, que permitiram a substituição de outras gomas tradicionais pela xantana (Glicksman, 1982).

A dextrana, conhecida há mais de 100 anos, tem sido sugerida para algumas aplicações em alimentos, mas é empregada exclusivamente na área farmacêutica. Novas gomas sintéticas desenvolvidas no Japão, curdlana e pululana, têm interessante aplicação em alimentos, mas não possuem autorização nos Estados Unidos como aditivo alimentar. Muitos outros polímeros microbianos têm sido produzidos e avaliados para comercialização, mas é duvidoso que sejam aprovados para o uso em alimentos. Entretanto muitas destas gomas são atóxicas, inofensivas e podem ser usadas em alimentos. Há necessidade porém de testes extensivos e estudos nutricionais requeridos pelo FDA para aprovação do uso em alimentos, o que significa efetivamente que poucas gomas venham a ser desenvolvidas para a aplicação em alimentos. No Japão onde a regulamentação restritiva é menos rigorosa, algumas das novas gomas microbianas já têm sido utilizadas em alimentos (Glicksman, 1982).

2.4.2. PROCESSO FERMENTATIVO

O meio de cultura para produção de polissacarídeos microbianos requer normalmente:

- 1 - Uma fonte de carbono (glicose, sacarose, amido).
- 2 - Uma fonte de nitrogênio (NH_4^+ , NO_3^- , extrato de levedura e proteína).
- 3 - Vitaminas e íons metálicos.

Normalmente os nutrientes necessários são diferentes para cada microorganismo e os controles de pH, agitação e temperatura precisam ser otimizados (Glicksman, 1982).

Os polissacarídeos microbianos são obtidos normalmente por métodos de fermentação em batelada ou por fermentação contínua. Anteriormente a produção em larga escala são realizados estudos sobre a bioquímica e a fisiologia da célula (Sandford, 1982).

2.4.3. SEPARAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

Visto que muitas gomas são viscosas e hidrófilas, a remoção da água é normalmente efetuada pela adição de um não-solvente, como álcool isopropílico com posterior secagem do precipitado através de "spray-drying", após a pasteurização do meio de fermentação. Compostos quaternários são usados com sucesso em laboratório para separar polissacarídeos iônicos de neutros. Uma pequena quantia de sais quaternários de amônio permanece, resultando em um produto inaceitável para fins alimentares (Sandford, 1982). Pode-se utilizar também sais complexos de cálcio e alumínio para precipitar polissacarídeos (Sutherland, 1986).

2.5. ALGINATO MICROBIANO

2.5.1. CARACTERÍSTICAS GERAIS

O alginato microbiano é semelhante ao ácido algínico que é bastante conhecido por ser uma goma comercialmente importante, com propriedades viscoelásticas e de gelatinização usada em indústrias de alimentos, têxteis, fármacos e de papel (Sandford, 1982). O ácido algínico é um polímero regular de resíduos de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico. A quantidade relativa de cada ácido varia de acordo com as diferentes espécies de algas das quais são obtidos (King, 1983).

As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Azotobacter vinelandii* demonstram secretar um polissacarídeo semelhante ao ácido algínico de algas marinhas (Banerjee, 1983; Pindar, 1975). Para comercialização, o biopolímero da *P. aeruginosa* deve ser descartado por ela estar associada a condições patogênicas em humanos (Sandford, 1982; Fyfe, 1980).

O alginato microbiano mostra propriedades viscoelásticas semelhantes ao alginato extraído de algas. Amostras de alginato com quantidades maiores de ácido gulurônico formam géis mais firmes na presença de cálcio (Sandford, 1982).

McAvoy e Col. (1989) isolaram dezessete cepas mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* em meio PIA Difco 0927-01, produtoras de alginato, de pacientes que não apresentavam fibrose cística. O alginato produzido forma um gel viscoso ao redor da célula. A variação do conteúdo de ácido urônico foi de 18 a 77% em relação ao peso de carboidrato total, isolados das cepas N5 e N10. Em duas

amostras de polissacarídeo foram encontradas glicose, galactose, manose, xilose e ramnose.

Skjak-Braek e Col. (1976) investigaram a estrutura seqüencial e a acetilação de alginatos biosintetizados por *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* e *P. mendocina* através de ressonância magnética nuclear. Concluíram que os grupos O-acetil estão exclusivamente associados com o ácido D-manurônico e o grau de acetilação varia de 4 a 57%, dependendo da proporção deste ácido no polímero. A inexistência de ácidos gulurônicos consecutivos nas quatro espécies de *Pseudomonas* faz com que sejam diferentes dos sintetizados por *Azotobacter vinelandii*.

2.5.2. PRODUÇÃO

Até agora não foi realizada uma produção em grande escala de alginato microbiano. A seqüência de passos pelo qual o alginato microbiano é biosintetizado já foi estabelecida pela caracterização de cada uma das reações enzimáticas. Estes estudos indicam que em *A. vinelandii* forma-se principalmente o ácido poli-D-manurônico e há uma epimerização parcial dos resíduos D-manurônicos à L-gulurônicos (Horan, 1983). A epimerização dos resíduos D-manurônicos a L-gulurônicos foi influenciada por associações intermoleculares e sua formação é função da concentração de Ca^{++} e da concentração do polímero (Annison, 1986b).

Estudos comparando fermentação em batelada e contínua mostram a vantagem das culturas contínuas, que evitam altas taxas de consumo de oxigênio observadas em culturas de fermentação em

batelada. Uma séria limitação na produção de alginato microbiano a partir de *A. vinelandii* é a produção de uma liase que causa a degradação do polissacarídeo, resultando em perda de viscosidade. A adição de enzimas proteolíticas previne a perda de viscosidade durante o processo fermentativo (Horan, 1983; Annison, 1986a; Brivonese, 1989).

Alginatos sintetizados por *Pseudomonas* são isentos de seqüências de ácido poligulurônico. Pouco é conhecido sobre a influência das condições de crescimento na produção de alginato microbiano, fator importante para sua potencial aplicação como alternativa ao alginato extraído de algas marinhas. É possível produzirem-se polímeros com propriedades reológicas específicas para aplicações particulares, pois, a concentração de ácidos gulurônico e manurônico pode ser previamente controlada através de mudanças das condições de crescimento empregadas (Sandford, 1982; Deretic, 1987).

A tensão de oxigênio dissolvido (T.O.D.) é crítica para a produção de alginato por *A. vinelandii*. A baixas T.O.D. o microrganismo acumula o composto intracelular β -polihidroxibutirato, e altas T.O.D. resultam em altas taxas de respiração. Conseqüentemente a conversão eficiente da fonte de carbono em alginato em culturas contínuas tem bons resultados somente com o controle acurado da T.O.D.. O efeito da T.O.D. na produção de alginato por *Pseudomonas* parece ser pouco crítica e tem um valor aproximado a 20% da saturação de ar (Sandford, 1982; Annison, 1986a).

Govan e col. (1981), isolaram cepas mucóides produtoras de alginato das espécies de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* e *P. mendocina* na freqüência de 1 em 10^8 através de seleção por

resistência a carbenicilina. O espectro infravermelho do polissacarídeo extracelular, mostra que o mesmo é semelhante a um alginato acetilado produzido por *Azotobacter vinelandii* e variantes mucóides de *Pseudomonas aeruginosa*. De dez espécies de *Pseudomonas* investigadas, foram isolados mutantes das três citadas, e o fato de não terem sido isolados mutantes das restantes, não é uma evidência de que não existam.

Hacking e col. (1983) estudaram a produção do polissacarídeo sintetizado pelos microrganismos isolados a partir da *Pseudomonas mendocina* NCBI 10541, através de seleção por resistência à carbenicilina. Os microrganismos isolados foram identificados como "C7" e "muc 18" e os microrganismos obtidos por mutagênese a partir da cepa "muc 18", foram identificados como U1 (NCIB 11687) e U3 (NCIB 11688). O exopolissacarídeo foi identificado como sendo alginato com a proporção de 1:2 de ácido manurônico e gulurônico. As cepas perdem a habilidade de produzir grande quantia de alginato, mas podem ser isolados com posterior mutagênese, mutantes bastante estáveis que produzem maior quantidade do polissacarídeo. Altas concentrações de polissacarídeo (20 g/l) foram obtidas em cultura contínua com limitação de nitrogênio, partindo-se de uma concentração inicial de 5% (p/v) de glicose. Como ocorre com o alginato biosintetizado por outras bactérias, o polímero é acetilado e possui propriedades reológicas similares ao alginato extraído de algas pardas. Uma liase está presente nas culturas, com atividade suficiente para fazer com que os polímeros apresentem baixo peso molecular e pouca viscosidade. Esta degradação foi evitada com a incorporação de uma enzima proteolítica no meio de cultura sem efeitos adversos, na bactéria ou no rendimento de produção. Para o estudo da síntese de

alginato, a *Pseudomonas mendocina* apresenta vantagens sobre o *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas aeruginosa* em termos de rendimento, estabilidade da cepa e ausência de patogenicidade conhecida.

Anderson e col. (1987) estudaram a rota metabólica de biosíntese do alginato microbiano a partir de glicose e frutose por *A. vinelandii* e *P. mendocina*. Estes pesquisadores incorporaram açúcares marcados na síntese, o que resultou em produtos significativamente diferentes para cada tipo de substrato utilizado. O alginato foi biosintetizado principalmente a partir da degradação dos produtos da glicose, ao passo que, a maior parte do polímero produzido por frutose foi montado com unidades de hexose intactas. Uma possível causa para a limitada síntese de alginato de moléculas não degradadas de glicose é que uma das enzimas necessárias, glicose-fosfato-isomerase, foi sujeita à inibição por 6-fosfogluconato, metabólito envolvido no catabolismo de açúcares pela via Entner-Doudoroff em ambos microrganismos. O alginato sintetizado a partir de glicose contém somente 3 dos 6 átomos de carbono, logo a eficiência de conversão é limitada a aproximadamente 50%, quando obtida pela *P. mendocina* U1 sob condições ótimas de crescimento em cultura contínua.

Senga e col. (1989) investigaram o efeito das condições de crescimento na produção de alginato por cepas mucóides de *Pseudomonas mendocina* U1 e muc 18, usando fermentação em batelada e contínua com pH controlado. Em fermentação em batelada, o alginato é produzido durante as fases de crescimento exponencial e estacionária e uma concentração de 20 g/l foi obtida a partir de um meio com uma concentração inicial de 50 g/l de glicose. Em culturas contínuas, com taxa de diluição $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$ e com

limitação de nitrogênio, foi obtido um bom rendimento; mais de 60% da glicose foi convertida em alginato (63% e 64% para os mutantes MUC 18 e U1, respectivamente). Aumentando a taxa de diluição acima de $0,1 \text{ h}^{-1}$ decresceu a conversão de glicose a alginato e a concentração de biomassa permaneceu constante. A T.O.D. ótima para produção de alginato em culturas contínuas foi de aproximadamente 40 mm Hg. Com menores T.O.D. não produziu-se alginato, mas foi liberado acetato no meio de cultura. Quando a fonte de carbono foi limitada, a produção de alginato diminuiu.

Brivonese e Sutherland (1989), em um estudo, investigaram alguns fatores que influenciam a secreção de ácido algínico e a acumulação de poli- β -hidroxibutirato (PHB) através da cepa mucóide de *Azotobacter vinelandii* em fermentação em batelada. O maior rendimento, 6,0-7,5 g/l foi rotineiramente obtido em meio fosfato-nitrogênio, tendo como fonte de carbono glicose (4% p/v) em *shaker* a 280 rpm. Neste caso o acúmulo de PHB alcançou o máximo de 30% da massa seca celular. A 120 rpm o rendimento de alginato foi somente 1,4 g/l e o PHB constitui 40%, refletindo a limitação de oxigênio. Observaram também, que a presença de fosfato inorgânico torna-se importante para o crescimento em meios com poucos sais e livres de nitrogênio e resultam em pouca produção de alginato. A produção não foi melhorada com adição de fontes de nitrogênio como glutamato e nitrato. Sob outras condições otimizadas, diferentes peptonas determinam diferentes rendimentos de alginato, e quando a glicose foi trocada por sacarose o crescimento e a produção de alginato foram reduzidos.

Mian e col. (1978) estudaram a produção de polissacarídeos de *Pseudomonas aeruginosa* em meio de cultura com limitação de carbono e nitrogênio em processos fermentativos em

batelada e contínuo, utilizando diferentes meios de fermentação, temperatura de 30 °C, pH 7,0 e a concentração de oxigênio aproximadamente 20% da saturação. Nos processos fermentativos em batelada a taxa máxima de síntese de exopolissacarídeo ocorreu durante a fase de crescimento exponencial. O rendimento máximo de conversão de substrato a exopolissacarídeo foi de 48%. Em fermentação contínua o rendimento máximo foi obtido quando a concentração de nitrogênio foi limitada. A maior produção de exopolissacarídeo foi de 11,3 g/l, partindo-se de uma solução 2% (p/v) de substrato.

2.5.3. APLICAÇÕES

As aplicações do alginato microbiano são usualmente as mesmas do alginato extraído de algas, as quais incluem entre outras o uso como estabilizador de emulsões, agente de gelatinização, espessante, estabilizador de espuma e agente de suspensão (Sandford, 1982).

2.5.4. TOXICOLOGIA

Dados nutricionais e toxicológicos não foram até agora avaliados. O alginato microbiano é bastante semelhante ao alginato produzido por algas que é utilizado em muitos alimentos, e pode vir a ser utilizado como uma nova biogoma nos estudos de alimentação animal (Sandford, 1982).

2.6. PSEUDOMONAS QUE PRODUZEM OUTROS TIPOS DE POLISSACARÍDEOS

Williams e Wimpenny (1977) estudaram a produção de exopolissacarídeos de *Pseudomonas* NCIB 11264, em um processo de fermentação em batelada com limitação de nitrogênio, excesso de carbono e pH acima de 6,0. Os pesquisadores realizaram experimentos com uma variedade de substratos e os resultados demonstraram que a composição do exopolissacarídeo não depende da fonte de carbono, que a sua produção foi iniciada durante a fase de crescimento exponencial, sendo máxima após o término desta fase. O rendimento na conversão de glicose em exopolissacarídeo foi de 30%. A produção máxima de exopolissacarídeo está na faixa de 5-6 g/l, partindo-se de um meio de fermentação com 2% (p/v) de glicose.

Foram também estudadas por Williams e Wimpenny (1978) as condições de produção de exopolissacarídeo de *Pseudomonas* NCIB 11264 num processo de fermentação contínua. Os resultados obtidos foram melhores, levando-se em consideração o rendimento de produção de exopolissacarídeo, comparativamente ao experimento em batelada. Os resultados demonstraram que a produção de exopolissacarídeo foi influenciada pela composição do meio, sendo que a produção é máxima sob limitação de nitrogênio e excesso de carbono à temperatura de $30 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 7,0 \pm 0,1$. A produção de polissacarídeos não foi alterada quando houve limitação de fosfato, mas depende da taxa de diluição. O processo foi mantido em estado estacionário por mais de 500 horas, para observar-se a deterioração da cultura ou desenvolvimento de mutantes, sendo que as alterações foram pouco significativas. A eficiência de conversão de glicose, utilizada no processo fermentativo foi de

Williams e col. (1979) estudaram a composição e propriedades reológicas do exopolissacarídeo sintetizado pela *Pseudomonas* NCIB 11264. O polímero possui comportamento reológico pseudoplástico e não apresenta características tixotrópicas, formando géis na presença de alguns cátions trivalentes. Os exopolissacarídeos são compostos de glicose e galactose na razão molar de $7,45 \pm 0,68 : 1$, piruvato (5-9%) e acetato (3-4%). Algumas propriedades físicas do exopolissacarídeo são semelhantes as da xantana.

Manresa e col. (1987) estudaram a influência de diferentes fontes de carbono, da temperatura e da concentração de fosfato na produção de um polissacarídeo de *Pseudomonas* sp GSP 910. Uma boa produção de polissacarídeo ocorreu em um meio contendo 2% (p/v) de sacarose, alta concentração de fosfato (80 mM/l) e 0,5 g/l de nitrogênio. O exopolissacarídeo obtido apresentou valores de viscosidade maiores em soluções aquosas diluídas do que a xantana, é estável a diferentes temperaturas, nas faixas de pH de 2-12 e na presença de sais monovalentes. Na presença de CaCl_2 (0,5% p/v) forma um gel firme na faixa de pH de 3 a 5, onde a produção foi de 6,16 g/l partindo-se de uma solução de 2% de sacarose. A proporção relativa de carboidratos no polímero foi: ácido glucorônico 8,8%, glicose 27,08%, galactose 56,8% e grupos O-acetil 6,32%.

Congregado e col. (1985) estudaram a produção de exopolissacarídeo de *Pseudomonas* sp ESP-5028, em meios de cultura com altas razões C/N, em uma faixa de pH de 6-8 a 25°C. Foram utilizadas várias fontes de carbono, sendo que em meio com galactose houve o maior rendimento, 7,65 g/l de exopolissacarídeo

partindo-se de uma solução de 2% (p/v). Outras fontes de carbono, glicose, sacarose e lactose empregadas na mesma concentração apresentaram rendimentos de 7,0, 6,9, e 6,3 g/l respectivamente. O polímero formado constitui-se de glicose, galactose e ácido urônico na razão molar aproximada de 3:2:5, sua composição não foi influenciada pela fonte de carbono e sua viscosidade em solução aquosa com 1% do polímero foi de 1600 cP.

Marqués e col. (1985) estudaram a produção e as propriedades reológicas de um exopolissacarídeo sintetizado por *Pseudomonas* sp ESP-5028 em fermentação em batelada. A produção de exopolissacarídeo dependeu da concentração de fosfato e foi máxima na temperatura de 28 °C e pH 7,0 (controlado durante a fermentação com adição de KOH). O polímero obtido tem comportamento reológico pseudoplástico e boa termoestabilidade, foi pouco afetado pelo pH e por altas concentrações de sais, possui excelente estabilidade e sua viscosidade foi de 1.700 cP em solução aquosa com 1% de polissacarídeo. A produção de polissacarídeo foi de 9 g/l partindo-se de uma solução de 2% (p/v) de substrato.

Christensen e col. (1985) determinaram as características químicas e físicas de dois exopolissacarídeos produzidos por *Pseudomonas* sp NCMB 2021, em um processo de fermentação em batelada. Um exopolissacarídeo foi produzido na fase estacionária e após a fase exponencial, em solução aquosa apresenta baixa viscosidade. O outro exopolissacarídeo foi produzido somente durante a fase exponencial, sendo composto de glicose, galactose, ácido glucorônico e ácido galacturônico na razão molar de 1,00:0,81:0,42:0,32 respectivamente, apresentando em solução aquosa alta viscosidade. Este polímero em altas concentrações

forma géis, sendo precipitado com alguns cátions monovalentes.

Read e Costerton (1987) purificaram e caracterizaram exopolissacarídeos produzidos por *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*. Neste estudo determinaram a composição química e biosíntese dos polímeros. Os exopolissacarídeos são sintetizados durante todas as fases de crescimento. O exopolissacarídeo sintetizado pela *P. putida* é composto de glicose, galactose e piruvato na razão molar de 1:1:1; já o sintetizado pela *P. fluorescens* possui a mesma composição mas a razão molar de seus constituintes foi de 1:1:0,5. Quando o crescimento foi limitado pela retirada da fonte de carbono, a produção de exopolissacarídeo cessou, já quando foi limitada pela retirada de nitrogênio a produção de exopolissacarídeo continuou por algum tempo.

Kang e col. (1982) estudaram o polissacarídeo extracelular produzido por uma nova espécie de *Pseudomonas*, que após 3 dias de incubação produziu uma grande quantia do polímero linear cuja composição química foi de: 46% de glicose, 30% de ramnose, 21% de ácidos urônicos e 3% de grupos O-acetil. O polissacarídeo PS-60 produziu um gel firme, quebradiço e claro. Exibiu excelentes características frente à temperatura, não foi afetado por uma série de enzimas e é uma boa alternativa como agente de gelatinização.

Jansson e Sutherland (1983) estudaram a estrutura do polissacarídeo "gellan gum" elaborado por *Pseudomonas elodea*, concluindo que é constituído de unidades de tetrassacarídeos, dos quais 25% possuem grupos O-acetil.

Miles e col. (1984) investigaram a estrutura física e química do polissacarídeo "gellan gum" sintetizado por *Pseudomonas elodea*, em solução na forma de gel. Determinaram que as

propriedades mecânicas dos géis dependem da natureza e concentração dos cátions e do grau de acetilação do polímero, que os grupos acetil inibem a cristalização de determinadas regiões na cadeia e é possível que isto explique a dramática mudança induzida nas propriedades dos polímeros não acetilados. Determinaram também que a estrutura secundária é preservada em solução aquosa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS.

- Mesa Rotatória Psycrotherm marca NEW BRUNSWICK
- Centrifuga Refrigerada marca INCIBRÁS modelo SPIN IV
- Banho Maria marca FANEN modelo 145
- Câmara de Fluxo Laminar marca VECO modelo FL2093
- Balança Analítica marca SARTORIUS
- Balança Semi-analítica marca MARTE modelo AM 5500
- Estufa a Vácuo marca FANEN modelo 099/A-1
- pHmetro marca METROHN HERISAU modelo E 516
- Autoclave marca FABBE-PRIMAR modelo 103
- Espectrofotômetro U.V/Vis. marca MICRONAL mod. B382
- Cronômetro Digital marca CASIO
- Fermentador de 1 litro marca FERMENTATION DESIGN

3.2. REAGENTES

- Peptona marca DIFCO
- Glicerina P.A. marca MERCK
- Cloreto de magnésio hexa-hidratado P.A. marca MERCK
- Sulfato de potássio P.A. marca MERCK
- Gluconato de sódio marca GRUPO QUIMICA
- Sacarose marca ECIBRA
- Glicose marca ECIBRA

- Lactose marca ECIBRA
- Triptose marca DIFCO
- KH_2PO_4 P.A. marca BAKER ANALYZED
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A. marca BAKER ANALYZED
- Sulfato de manganês marca ECIBRA
- Sulfato de ferro P.A. marca BAKER ANALYZED
- Cloreto de cálcio P.A. marca BAKER ANALYZED
- Na_2HPO_4 P.A. marca BAKER ANALYZED
- Ác. Cítrico marca ECIBRA
- Ext. Levedura marca DIFCO
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ P.A. marca BAKER ANALYZED
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A. marca BAKER ANALYZED
- $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A. marca BAKER ANALYZED
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ P.A. marca BAKER ANALYZED
- H_3BO_3 P.A. marca ECIBRA
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A. marca BAKER ANALYZED
- Carbenicilina marca PFEIZER
- β -galactose marca MAXILAT
- Glicose Enz-Color marca BIO DIAGNÓSTICA
- Invertase marca MILES
- H_2SO_4 P.A. marca MERCK
- Fenol P.A. marca MERCK
- Álcool etílico P.A. marca MERCK
- Agar-Agar marca BIOBRÁS
- Cloreto de sódio P.A. marca ECIBRA
- EDTA marca VETEC
- Alginato de sódio tipo VII marca SIGMA

3.3. MICRORGANISMO

A *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597, cedida pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, foi utilizada para se obterem mutantes produtores de polissacarídeo.

3.3.1. MEIO PARA ISOLAMENTO.

O meio utilizado para o isolamento de microrganismo foi o mesmo utilizado por Govan e col. (1981). A composição do mesmo segue abaixo:

MEIO A.

Peptona	20 g/l
Glicerina	20 ml/l
MgCl ₂ . 6H ₂ O	30 g/l
K ₂ SO ₄	10 g/l

O pH foi ajustado a 7,0 e suplementado com 2% de agar quando utilizado em placas de Petri.

3.3.2. ISOLAMENTO DE MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICO

A cultura foi reativada a partir do tubo inclinado, inoculando-a em tubo de ensaio contendo meio A e agitada em *shaker* à 150 rpm por 12 horas a 30°C. Para proceder o isolamento dos mutantes de *Pseudomonas mendocina*, o antibiótico carbenicilina foi pesado e dissolvido em água destilada previamente esterilizada (Govan e col., 1981).

As células em fase de crescimento exponencial foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio A e diferentes

concentrações de antibiótico que variaram na faixa de 100 a 2000 µg/ml, incubadas sob agitação em *shaker* a 150 rpm por 24 horas a 30°C. Os microrganismos que resistiram a mais alta concentração de antibiótico foram repicados em placa de Petri com o meio de cultura A sem antibiótico. As placas de Petri foram incubadas por um período de 72 horas a 30°C e as colônias mucóides produtoras de polissacarídeo, puderam ser então facilmente reconhecidas pela sua aparência lustrosa. Estas colônias foram separadas e inoculadas em tubos de ensaio contendo meio A e incubadas nas mesmas condições. A partir destas células, pela técnica de esgotamento, isolaram-se mutantes produtores de polissacarídeos, que foram inoculados em tubos com meio B, inclinados, incubados a 30°C por 24 a 36 horas e após mantidos em geladeira (Neder, 1968).

3.4. METODOLOGIA DE FERMENTAÇÕES

3.4.1. MEIO DE MANUTENÇÃO

O meio para manutenção e para reativação do microrganismo foi o mesmo utilizado por Manresa e col. (1988). A composição segue abaixo:

MEIO B	
Sacarose	20,0 g/l
Triptose	2,0 g/l
KH ₂ PO ₄	2,0 g/l
MgSO ₄ . 7H ₂ O	2,7 g/l
MnSO ₄	10 mg/l
FeSO ₄	10 mg/l
CaCl ₂	10 mg/l

O pH foi ajustado a 7,0 e o meio foi suplementado com 2% de agar quando utilizado em tubos inclinados.

3.4.2. MEIO DE FERMENTAÇÃO

O meio usado para otimizar o processo fermentativo foi também utilizado nos ensaios preliminares e está descrito abaixo. A adição de nitrogênio foi feita na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sua concentração variou de 260 à 1610 mg/l. A glicose foi esterilizada separadamente e sua concentração no meio de cultura foi igual a 20 g/l. O meio foi similar ao utilizado por Jayasuriya (1955) e Hacking e col. (1983).

MEIO C.

KH_2PO_4	2,72 g/l
Na_2HPO_4	11,36 g/l
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,3 g/l
Ác. Cítrico	0,8 g/l
CaCl_2	0,3 g/l
Ext. Levedura	0,08 g/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,1 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 mg/l
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,28 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg/l
H_3BO_3	0,06 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,6 mg/l

3.4.3. PRÉ-FERMENTAÇÃO

Os processos de pré-fermentação foram realizados

utilizando-se o meio C em tubos de ensaio e Erlenmeyers de 250 ml agitados em *shaker* a 150-180 rpm por 12 - 15 horas a uma temperatura de 30°C. O preparo de cada inóculo foi feito nas diferentes formas descritas abaixo.

3.4.3.1. INÓCULO 1

A partir do tubo com meio A inclinado, a cultura foi passada a outro tubo contendo meio B. Os tubos de ensaio foram agitados em *shaker* à 150 rpm por 12 horas a 30°C, sendo este inóculo utilizado nos experimentos em Erlenmeyers.

3.4.3.2. INÓCULO 2

Nos experimentos realizados em fermentadores de bancada o procedimento foi semelhante ao anterior. A pré-fermentação, (8% do volume da fermentação) aproximadamente 50 ml, foi realizada em Erlenmeyers de 250 ml, agitados em *shaker* a 150 rpm por 15 horas a 30°C.

3.4.4. FERMENTAÇÃO

O processo fermentativo foi realizado em Erlenmeyers (fase inicial) e em fermentadores de bancada de 1 litro.

3.4.4.1. FERMENTAÇÃO EM ERLENMEYERS.

Nas experiências iniciais foi utilizado o meio de cultura C variando-se a fonte de carbono (Glicose, gluconato de sódio,

sacarose, lactose) e sua concentração. Após inoculação os Erlenmeyers foram agitados em shaker a 150-180 rpm por 24 horas a 30°C.

3.4.4.2. FERMENTAÇÃO EM FERMENTADORES DE BANCADA

O meio C foi utilizado em todos os processos fermentativos realizados nos fermentadores de bancada.

O meio de cultura foi esterilizado em autoclave no conjunto do fermentador de bancada, por 15 minutos a 121°C. O tempo de fermentação foi de 24 horas para o primeiro conjunto de experimentos e de 15 horas para o segundo. O volume ocupado no fermentador de bancada foi de 640 ml. A temperatura de 30°C foi mantida constante por um banho de água termostatizado. Foram utilizados mini-compressores de aquário para gerar ar comprimido, cuja vazão foi controlada por rotâmetros. Para homogeneizar o meio foi utilizada agitação com agitadores magnéticos.

3.5. ANÁLISES EFETUADAS

3.5.1. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO

3.5.1.1. SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS

As amostras de caldo fermentado foram centrifugadas em centrífuga refrigerada de 6000-12000 rpm por 15-40 minutos. Para facilitar a separação das células, foram adicionados 2,0 ml de NaCl 5M e 2,0 ml de EDTA 0,5M a pH 7,0 para 100 ml do meio de cultura conforme Hacking e Col. (1983). O sobrenadante foi

separado para determinação da concentração de substrato e produto e o centrifugado foi separado para determinação da concentração celular.

3.5.1.2. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA LACTOSE

Uma alíquota do sobrenadante de cada amostra contendo lactose foi submetida à hidrólise por ação da enzima β -galactosidase (5000 NLU) para liberação de glicose. Ao sobrenadante (0,5 ml) foi adicionado 1,0 ml de tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 6,5 e 0,5 ml de solução de β -galactosidase diluída 1:10. A mistura foi levada em banho de água a 37°C por 30 minutos (conforme sugere o manual técnico da β -galactosidase) para completar a reação de hidrólise. Esta glicose foi determinada e convertida em termos de concentração de lactose.

3.5.1.3. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA SACAROSE

Uma alíquota do sobrenadante de cada amostra contendo sacarose foi submetida à hidrólise por ação da enzima invertase para liberação da glicose. Ao sobrenadante (0,5 ml) foi adicionado 1,0 ml de tampão fosfato de potássio 0,5 M, pH 5,2 e 0,5 ml de solução de invertase diluída 1:10. A mistura foi levada a banho de água a 50°C por 20 minutos para completar a reação de hidrólise. Esta glicose foi determinada e convertida em termos de concentração de sacarose.

3.5.1.4. DETERMINAÇÃO DE GLICOSE

A determinação da concentração de glicose (Dahlqvist, 1964) foi feita conforme procedimento do manual técnico do reagente Glicose Enz-color. A 2,5 ml de uma solução de glicose enz-color, foi adicionado 0,01 ml da amostra do caldo contendo glicose e levada para um banho de água a 37°C por 20 minutos. Após a formação de uma coloração rosa, a absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 510 nm. A leitura foi comparada com a de uma solução padrão de glicose (0,1%) e os cálculos de concentrações foram feitos da seguinte forma:

$$\text{Concentração de glicose (g/l)} = \frac{\text{Abs(amostra)}}{\text{Abs(padrão)}}$$

3.5.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO

A uma alíquota de sobrenadante (0.1 ml) obtido após a centrifugação de cada amostra do meio de cultura, foram adicionados 3 volumes de etanol para precipitar o polissacarídeo, conforme descrito por Govan e col. (1921).

Para determinação do polissacarídeo foi feita uma adaptação ao método de fenol-sulfúrico descrito por Martelli e Panek (1968). O precipitado foi cuidadosamente lavado com etanol, sendo posteriormente adicionados 1 ml de água e 1 ml de solução de fenol 5%. A mistura foram adicionados rapidamente 5 ml de H₂SO₄ concentrado e os tubos foram mantidos por 15 minutos à temperatura

ambiente, sendo logo após agitados. Adicionaram-se 5 ml de água e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. A absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 490 nm. Para determinar a concentração do polissacarídeo utilizou-se uma solução de concentração conhecida de alginato de sódio. A correlação obtida é mostrada no anexo 1.

3.5.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A massa celular do meio centrifugado (item 3.5.1.1.) foi ressuspensa em água destilada, novamente centrifugada e seca em estufa a vácuo a temperatura de 62°C até peso constante.

3.5.4. DETERMINAÇÃO DE pH

Foram realizadas em potenciômetro.

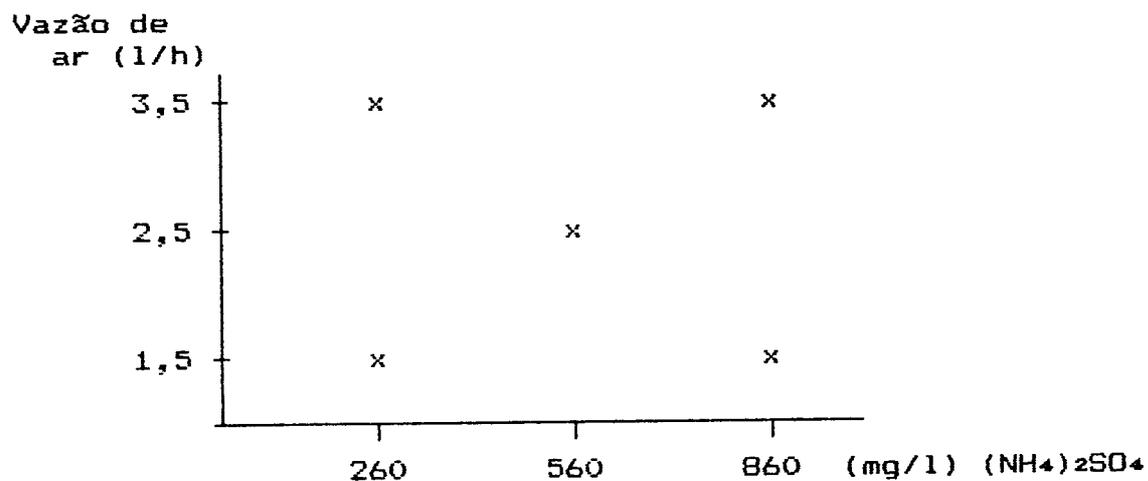
3.6. MÉTODO ESTATÍSTICO PARA OTIMIZAÇÃO DA VAZÃO DE AR E CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO

O delineamento experimental de metodologia de superfície de resposta, descrito por Box e col. (1988) foi utilizado com a finalidade de estudar o efeito de duas variáveis sobre o processo. Estas variáveis são: (1) concentração de nitrogênio na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e (2) vazão de ar.

3.6.1. PRIMEIRO CONJUNTO DE EXPERIMENTOS

As variáveis para o primeiro conjunto de experimentos foram estudadas em 3 níveis, codificados como 1, 2 e 3 que são mostrados abaixo. Cada nível é representado por um ponto (X,Y), onde "X" representa o nível de concentração de nitrogénio e "Y" o nível de vazão de ar.

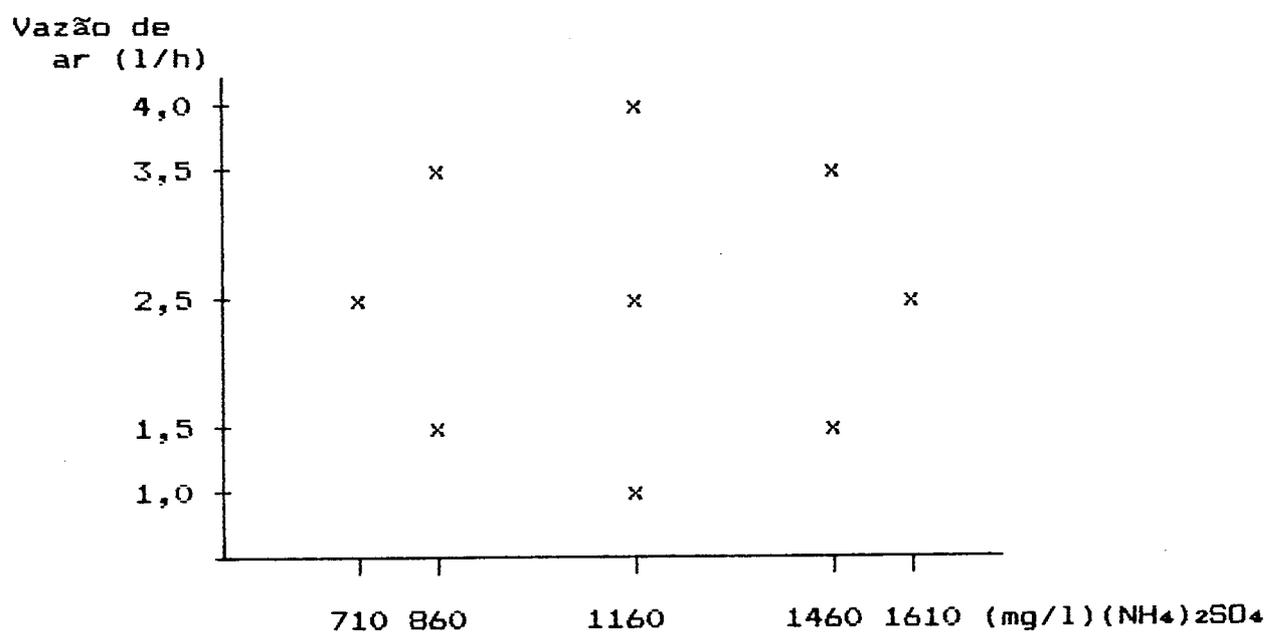
VARIÁVEL	NIVEL		
	1	2	3
X - Conc. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mg/l)	260	560	860
Y - Vazão de ar (l/h)	1,5	2,5	3,5



3.6.2. SEGUNDO CONJUNTO DE EXPERIMENTOS

As variáveis para o segundo conjunto de experimentos são estudadas em 5 níveis que são mostrados abaixo:

VARIÁVEL	NÍVEL				
	1	2	3	4	5
X - Conc. de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (mg/l)	710	860	1160	1460	1610
Y - Vazão de ar (l/h)	1,0	1,5	2,5	3,5	4,0



Os níveis (2,2) e (2,4) são coincidentes com os níveis (3,1) e (3,3) do primeiro conjunto de experimentos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MICRORGANISMO

4.1.1. SELEÇÃO POR RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICO

A partir da *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597, usando-se o antibiótico carbenicilina foram isoladas duas cepas mutantes produtoras de polissacarídeo.

A tabela 3 mostra os resultados obtidos no isolamento dos microrganismos resistentes ao antibiótico.

TABELA 3: Seleção de mutantes de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 resistentes a Carbenicilina

[Antibiótico]	Sol. estoque ¹	Meio 2A ²	H ₂ O	Cresc. ³
µg/ml	(ml)	(ml)	(ml)	
0 ⁴	0,0	1,0	1,0	-
100	0,05	1,0	0,95	+
200	0,1	1,0	0,9	+
500	0,25	1,0	0,75	+
1000	0,5	1,0	0,50	-
2000	1,0	1,0	0,0	-

¹Solução estoque = 4000 µg/ml carbenicilina

²Meio 2A = Meio A concentrado duas vezes

³Crescimento = + apresentou / - não apresentou

⁴Tubo controle

A cultura do tubo contendo 500 µg/ml de antibiótico foi inoculada em placas de Petri. Em duas destas placas foram detectadas colônias, uma em cada placa, apresentando cor amarelada e um aspecto lustroso característico de cepas mucóides.

Estas duas culturas isoladas a partir do crescimento em tubo com 500 µg/ml de antibiótico foram tratadas conforme descrito no item 3.3.2..

Os mutantes obtidos estão depositados na Coleção de Culturas Tropical sob os seguintes números:

- CCT 2244: - *Pseudomonas mendocina* M02
- CCT 2245: - *Pseudomonas mendocina* M13

Hacking e col. (1983) também isolaram duas cepas mutantes (muc 18 e C7), resistentes ao antibiótico carbenicilina.

4.2. FERMENTAÇÃO

4.2.1. ENSAIOS EM ERLLENMEYERS

Foram realizados uma série de experimentos em Erlenmeyers, para a escolha de um dos microrganismos selecionados, o substrato a ser utilizado e sua concentração.

4.2.1.1. EFEITO DO TIPO DE SUBSTRATO

Neste conjunto de experimentos iniciais foi observada a capacidade de consumo de substrato (glicose, sacarose, gluconato de sódio comercial e lactose) dos mutantes M02 e M13 e da cepa

selvagem.

O meio C foi utilizado nestes experimentos com uma concentração de 1,30 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e tamponado com fosfato (KH_2PO_4 1,36 g/l e Na_2HPO_4 5,68 g/l). Todos os ensaios (tabelas 4 a 7) foram realizados conforme descrito no item 3.4.4.1..

A tabela 4 mostra os dados referentes à fermentação tendo como substrato a glicose e os resultados são médias de análises feitas em duplicata.

TABELA 4: Avaliação da fermentação de glicose em Erlenmeyers por *P. mendocina* FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13.

	pH (*)	[Sf] (*)	$\Delta S(\%)$
Cepa selvagem	6,75	39,29	9,70
Mutante M02	3,35	29,93	31,20
Mutante M13	3,50	18,19	58,20

* valores após 24 horas de fermentação.

$\Delta S(\%) = [(S_0 - S_f) / S_0] * 100 \rightarrow$ variação percentual de consumo

$S_0 =$ concentração inicial de glicose = 43,53 g/l

$S_f =$ concentração final de glicose (g/l)

pH inicial = 6,8

Foi possível observar que a cepa selvagem não possui uma boa capacidade para metabolizar glicose, consumindo menos de 10% do substrato; já os mutantes M02 e M13 apresentaram um razoável consumo de substrato, associado a uma queda acentuada do pH, o que

causou a inibição do crescimento e dificultou a síntese do polissacarídeo. O meio de cultura dos mutantes M02 e M13 apresentou-se mais viscoso em comparação ao da cepa selvagem.

A tabela 5 mostra os dados referentes à fermentação tendo como substrato a sacarose e os resultados são médias de análises em duplicata.

TABELA 5: Avaliação da fermentação de sacarose em Erlenmeyers por *P. mendocina* FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13.

	pH (*)	[Sf] (*)	ΔS(%)
Cepa selvagem	6,7	38,15	17,80
Mutante M02	5,15	14,83	68,10
Mutante M13	5,30	10,53	77,30

* valores após 24 horas de fermentação.

$\Delta S (\%) = [(S_0 - S_f) / S_f] * 100 \rightarrow$ variação percentual de consumo

$S_0 =$ concentração inicial de sacarose = 46,42 g/l

$S_f =$ concentração final de sacarose (g/l)

pH inicial = 6,9

Foi possível observar que a cepa selvagem não possui uma boa capacidade para metabolizar sacarose, consumindo menos de 20% do substrato; já os mutantes M02 e M13 apresentaram consumo razoável de substrato, sendo que o mutante M13 apresentou uma menor queda de pH. Os meios de cultura dos mutantes M02 e M13 apresentaram viscosidade maior quando comparados com a cepa selvagem.

A tabela 6 mostra os dados referentes a fermentação tendo como substrato a lactose e os resultados apresentados são a média de análises feitas em duplicata.

TABELA 6: Avaliação da fermentação de lactose em Erlenmeyers por *P. mendocina* FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13.

	pH (*)	[Sf] (*)	ΔS(%)
Cepa selvagem	7,15	49,05	4,50
Mutante M02	5,55	38,94	24,20
Mutante M13	6,80	45,70	11,10

* valores após 24 horas de fermentação.

$\Delta S (\%) = [(S_o - S_f) / S_f] * 100$ → variação percentual de consumo

S_o = concentração inicial de lactose = 51,39 g/l

S_f = concentração final de lactose (g/l)

pH inicial = 6,9

Foi possível observar que a cepa selvagem não possui uma boa capacidade para metabolizar lactose, consumindo menos de 5% do substrato; já o mutante M02 apresentou um maior consumo de substrato, associado a uma queda maior do pH quando comparado com o mutante M13, que tem uma menor capacidade de metabolizar lactose. Os meios de cultura não apresentaram aumento de viscosidade, quando comparados entre si.

A tabela 7 mostra os dados referentes à fermentação tendo como substrato o gluconato de sódio comercial.

TABELA 7: Avaliação da fermentação de gluconato em Erlenmeyers por *P. mendocina* FTPT 0597 e seus mutantes M02 e M13.

	pH (final)
Cepa selvagem	7,60
Mutante M02	7,65
Mutante M13	8,05

pH inicial = 6,8

Foi possível observar que os mutantes M02 e M13 apresentaram crescimento, observado pela turvação do meio. No caso dos mutantes M02 e M13 houve um aumento da viscosidade do meio de cultura quando comparado ao da cepa selvagem, o que indicou um consumo maior de substrato; e para todas as culturas observou-se um aumento no pH, o que está associado ao tipo de substrato utilizado.

Os experimentos que utilizaram glicose, sacarose e gluconato e os mutantes M02 e M13 apresentaram meios viscosos no final da fermentação, comparativamente à cepa selvagem.

Comparando-se as tabelas 4, 5 e 6, observa-se que a cepa selvagem não possui boa capacidade para metabolizar os substratos utilizados, característica esta observada por Hacking e col. (1983) para o tipo selvagem de *P. mendocina* NCIB 10541. Os mutantes M02 e M13 tem melhor capacidade para metabolizar glicose, sacarose e lactose, em ordem decrescente, estando associada a queda de pH do meio. A tabela 4 mostra uma maior queda de pH e

menor consumo de substrato para os mutantes M02 e M13 quando comparados com a tabela 5.

Os resultados obtidos indicaram que seria necessário fazer-se um conjunto de experimentos utilizando-se uma concentração menor de substrato, em um meio mais fortemente tamponado, devido à grande queda do pH durante a fermentação e à dificuldade de separar as células por centrifugação.

A cepa selvagem foi descartada e os ensaios posteriores (tabelas 8 a 10) foram realizados somente com os mutantes em meio C, com uma concentração de 0,34 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tamponado com fosfato (KH_2PO_4 2,72 g/l Na_2HPO_4 11,36 g/l) em Erlenmeyers conforme descrito no item 3.4.4.1.

A tabela 8 mostra os resultados médios das análises feitas em duplicata do experimento realizado com glicose como fonte de carbono.

TABELA 8: Avaliação da fermentação de glicose em Erlenmeyers pelos mutantes M02 e M13 de *P. mendocina* FTPT 0597.

	pH(*)	C.C. ¹ (*)	[Sf](*)	ΔS (%)
Cepa M02	3,75	1,1	0,23	99,00
Cepa M13	6,05	ND	0,24	99,00

¹ - Concentração celular aproximada (g/l).

ND - Não determinado

* - Valores após 24 horas de fermentação.

ΔS (%) = $[(S_0 - S_f) / S_f] * 100$ → variação percentual de consumo

S_0 = concentração inicial de glicose = 22,97 g/l

S_f = concentração final de glicose (g/l)

pH inicial = 7,0

Como pode ser observado, com relação ao primeiro experimento, cujos resultados são apresentados na tabela 4, os mutantes apresentaram um sensível acréscimo no consumo de substrato e devido ao tamponamento mais forte do meio houve um menor decréscimo do pH, no caso do mutante M13 o pH manteve-se numa faixa bastante estreita. Não foi possível separar de forma eficaz as células do meio de fermentação para o mutante M13 nas condições descritas no item 3.5.1.1., devido a alta viscosidade do meio fermentado.

A tabela 9 mostra a média dos resultados das análises feitas em duplicata do experimento realizado com sacarose como fonte de carbono.

TABELA 9: Avaliação da fermentação de sacarose em Erlenmeyers pelos mutantes M02 e M13 de *P. mendocina* FTPT 0597.

	pH(*)	C.C. ¹ (*)	[Sf](*)	ΔS(%)
Mutante M02	5,65	1,3	6,49	72,90
Mutante M13	6,25	ND	4,24	82,30

¹ - Concentração celular aproximada (g/l)

ND - Não determinado

* - Valores após 24 horas de fermentação.

ΔS (%) = $[(S_0 - S_f) / S_f] * 100$ → variação percentual de consumo

S₀ = concentração inicial de sacarose = 23,95 g/l

S_f = concentração final de sacarose (g/l)

pH inicial = 7,0

Como pode ser observado, com relação ao primeiro experimento cujos resultados são apresentados na tabela 5, os mutantes apresentam uma pequena diferença no consumo de substrato e um menor decréscimo do pH, no caso da mutante M13 o pH teve menor variação. Não foi possível separar de forma eficaz as células do meio de fermentação para o mutante M13, nas condições descritas no item 3.5.1.1., devido a alta viscosidade do meio.

A tabela 10 mostra os resultados médios das análises feitas em duplicata do experimento realizado com lactose como fonte de carbono.

TABELA 10: Avaliação da fermentação de lactose em Erlenmeyers pelos mutantes M02 e M13 de *P. mendocina* FTPT 0597.

	pH(*)	C.C. ¹ (*)	[Sf](*)	ΔS(%)
Mutante M02	6,80	0,5	16,16	24,10
Mutante M13	7,20	0,2	19,53	8,30

¹ - Concentração celular aproximada (g/l)
 * - Valores após 24 horas de fermentação.
 $\Delta S (\%) = [(S_0 - S_f) / S_f] * 100$ → variação percentual de consumo
 S_0 = concentração inicial de lactose = 21,30 g/l
 S_f = concentração final de lactose (g/l)
 pH inicial = 7,0

Como pode ser observado, com relação ao experimento cujos resultados são apresentados na tabela 6, os mutantes não possuem uma boa capacidade para metabolizar a lactose, as variações no consumo de substrato foram pequenas e o pH não apresentou um

decréscimo semelhante devido ao tamponamento mais forte do meio.

Foi observado, nessa segunda série de experimentos, que a glicose e a sacarose são os melhores substratos para o processo fermentativo, uma vez que houve um maior consumo destes. Foi observada também uma maior viscosidade (não medida) no final das fermentações, indicando que houve uma maior produção de polissacarídeo, o mutante M13 mostrou ser mais eficaz para metabolização destes açúcares e o meio fermentado apresentou uma viscosidade maior, o que dificultou a separação das células, por outro lado, o meio fermentado pelo mutante M02 não apresentou dificuldades para separar as células. Como consequência de ter ocorrido um maior consumo de substrato e menor redução de pH, optou-se por trabalhar com o mutante M13.

4.2.1.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

Foram realizados experimentos com quatro diferentes concentrações de substrato, utilizando o mutante M13 e como fonte de carbono glicose e sacarose. O meio C com uma concentração de 0,34 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi tamponado com fosfato (KH_2PO_4 2,72 g/l Na_2HPO_4 11,36 g/l) e os experimentos foram realizados em Erlenmeyers conforme descrito no item 3.4.4.1.

A tabela 11 mostra os resultados médios das análises feitas em duplicata do experimento realizado em Erlenmeyer, utilizando, a cepa mutante M13 e glicose como fonte de carbono.

TABELA 11: Fermentação de glicose em Erlenmeyers pelo mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597.

[So]g/l	[Sf]g/l	ΔS(%)	pH(final)	[P]g/l	Y _{P/S}
26,76	7,12	73,40	3,8	8,4	0,43
20,07	4,21	79,02	4,9	8,2	0,52
13,38	0,03	99,78	6,2	5,5	0,41
6,69	0,00	100,00	6,85	1,4	0,21

$\Delta S (\%) = [(S_o - S_f) / S_f] * 100 \rightarrow$ variação percentual de consumo

S_o = concentração inicial de glicose

S_f = concentração final de glicose

P = Concentração do produto

Y_{P/S} = Taxa de bioconversão (produto/substrato)

pH inicial = 7,0

Como pode ser observado, os resultados indicam que o mutante M13 apresentou bons rendimentos de bioconversão de glicose em polissacarídeo, a na concentração inicial de 6,69 g/l apresentou o menor rendimento, o que pode estar associado a degradação do produto por uma liase secretada no meio de cultura, conforme observações de Hacking e col. (1983). O melhor rendimento de bioconversão foi obtido para uma concentração de 20,07 g/l de glicose.

A tabela 12 mostra os resultados médios das análises feitas em duplicata do experimento realizado em Erlenmeyer utilizando o mutante M13 e sacarose como fonte de carbono.

TABELA 12: Fermentação de sacarose em Erlenmeyers pelo mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597.

[So]g/l	[Sf]g/l	$\Delta S(\%)$	pH(final)	[P]g/l	Y _{P/S}
29,93	11,71	60,88	4,25	7,16	0,40
22,45	4,66	79,24	5,83	5,72	0,32
14,96	0,09	99,40	6,05	3,02	0,29
7,48	0,00	100,00	6,55	1,40	0,19

$\Delta S (\%) = [(So - Sf) / Sf] * 100 \rightarrow$ variação percentual de consumo
 So = concentração inicial de sacarose
 Sf = concentração final de sacarose
 P = concentração de produto
 Y_{P/S} = taxa de bioconversão (produto/substrato)
 pH inicial = 7,0

Como pode ser observado, os resultados indicam que a cepa M13 apresentou bons rendimentos de bioconversão de sacarose em polissacarídeo. Nas concentrações iniciais de 7,48 e 14,96 g/l o microrganismo apresentou os menores rendimentos, o que pode estar associado a degradação do produto por uma liase secretada no meio de cultura. O melhor rendimento de bioconversão foi obtido para uma concentração de 29,93 g/l de sacarose.

Tanto sacarose como glicose poderiam ser utilizados para o estudo do processo fermentativo em fermentadores de bancada. Pela facilidade de análise e principalmente pela maior eficiência na separação de células das amostras do meio fermentado, o substrato escolhido para realizar os experimentos foi a glicose numa concentração de 20g/l.

4.2.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS EM FERMENTADORES DE BANCADA

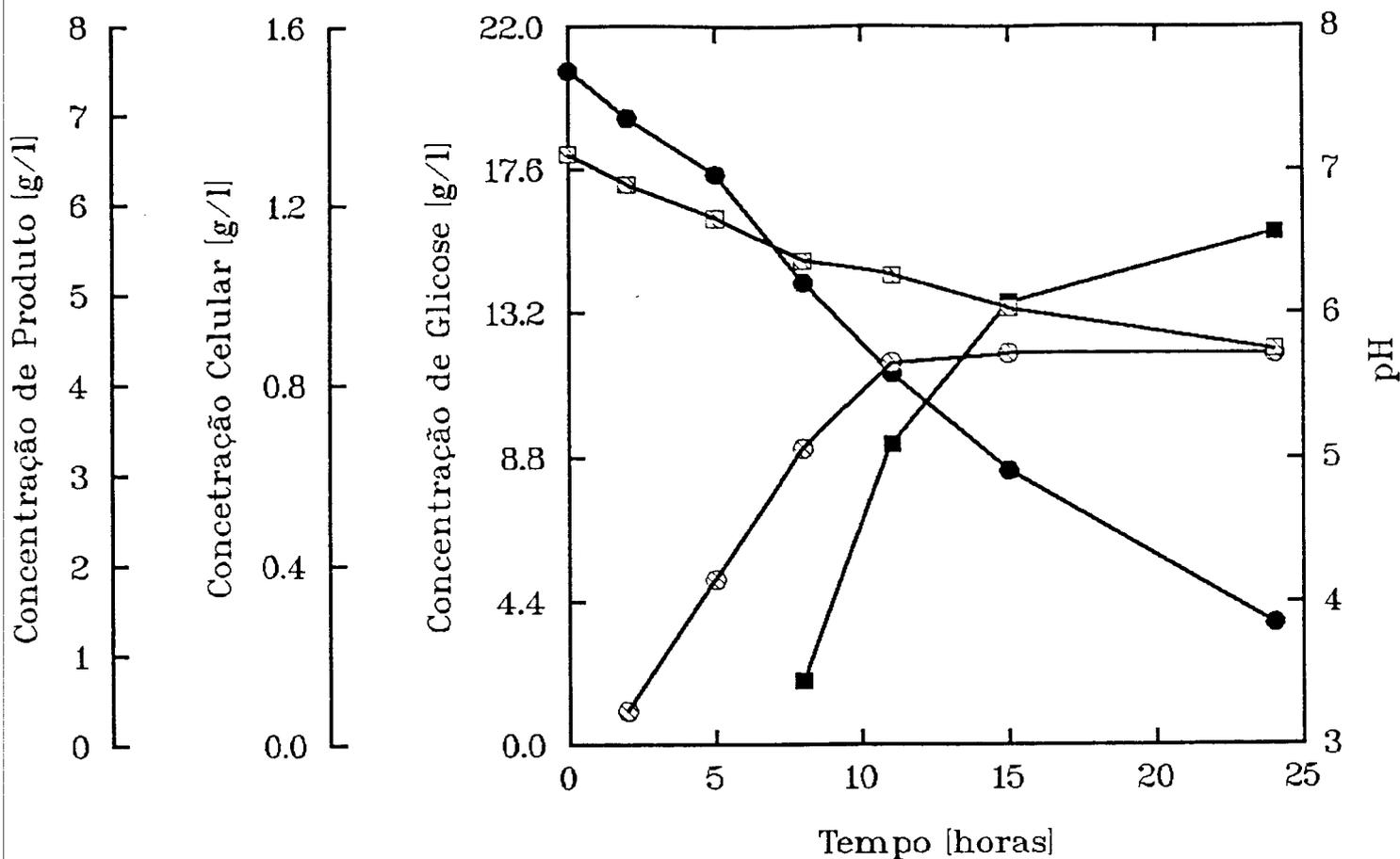
A etapa de passagem do experimento para fermentadores de bancada apresentou algumas dificuldades. A primeira delas foi de suprir oxigênio ao microrganismo. Foram necessárias pequenas vazões de ar da ordem de 1,0 a 4,0 litros por hora, pois acima desta faixa havia a formação de uma grande quantidade de espuma, o que fazia com que parte do meio de cultura saísse do fermentador pela saída de gases, e nessas condições também o polissacarídeo não era sintetizado, comprometendo desta forma o experimento.

Nos experimentos foram utilizados cerca de 65% do espaço útil do fermentador e as demais condições do experimento são descritas no item 3.4.4.2..

4.2.2.1. RESULTADOS REFERENTES AO PRIMEIRO CONJUNTO DE PONTOS.

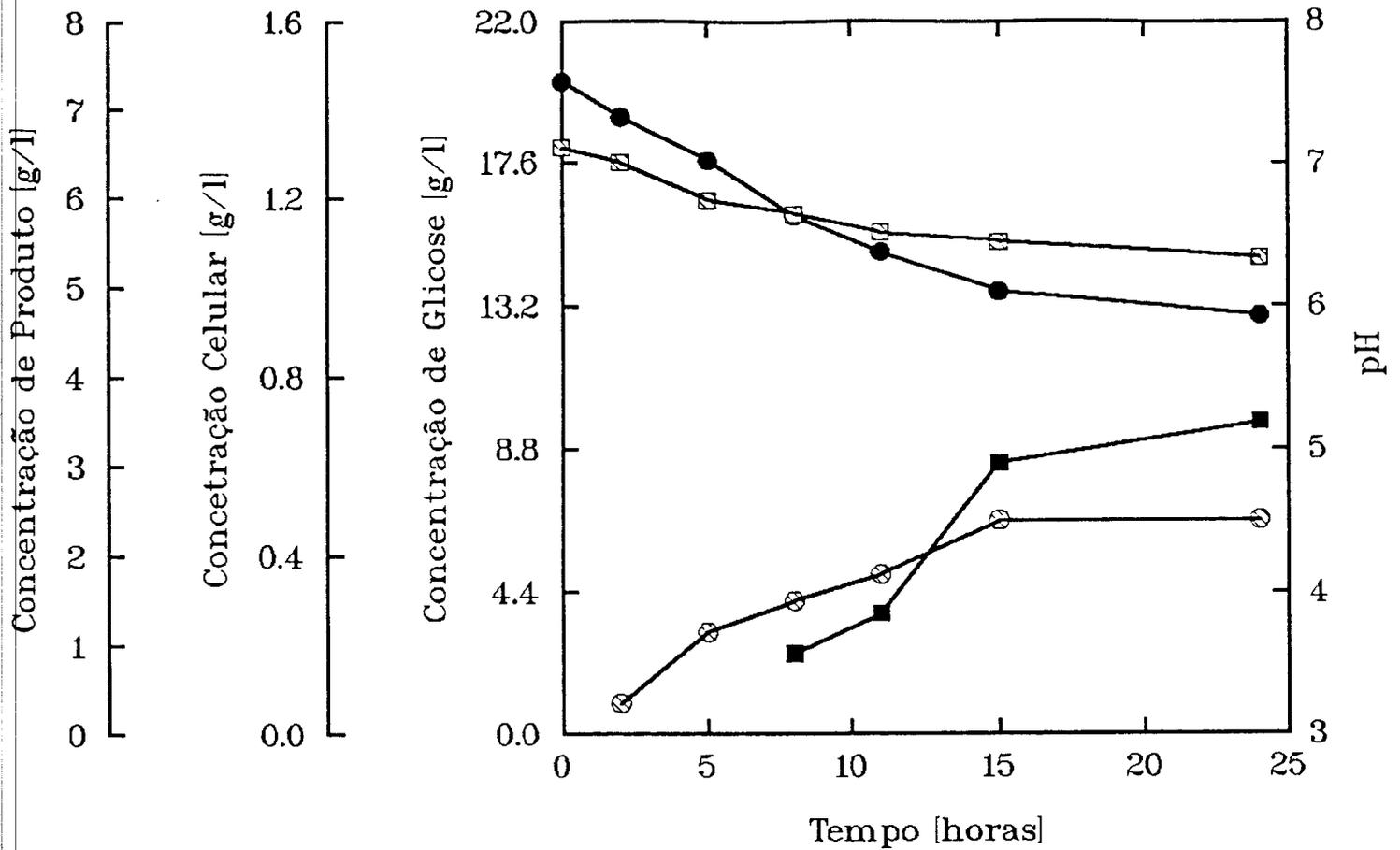
O delineamento dos experimentos realizados para este conjunto de pontos é detalhado no item 3.6.1.

Os resultados apresentados nas Figuras 1 a 5 mostram as curvas de consumo de substrato, concentração de polissacarídeo, concentração celular e pH, referentes ao processo fermentativo realizado pela cepa mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597, utilizando o meio C com glicose como fonte de carbono. A Figura 6 apresenta as taxas percentuais de bioconversão ($Y_{P/S} \times 100$) para os 5 pontos estudados nestes experimentos.



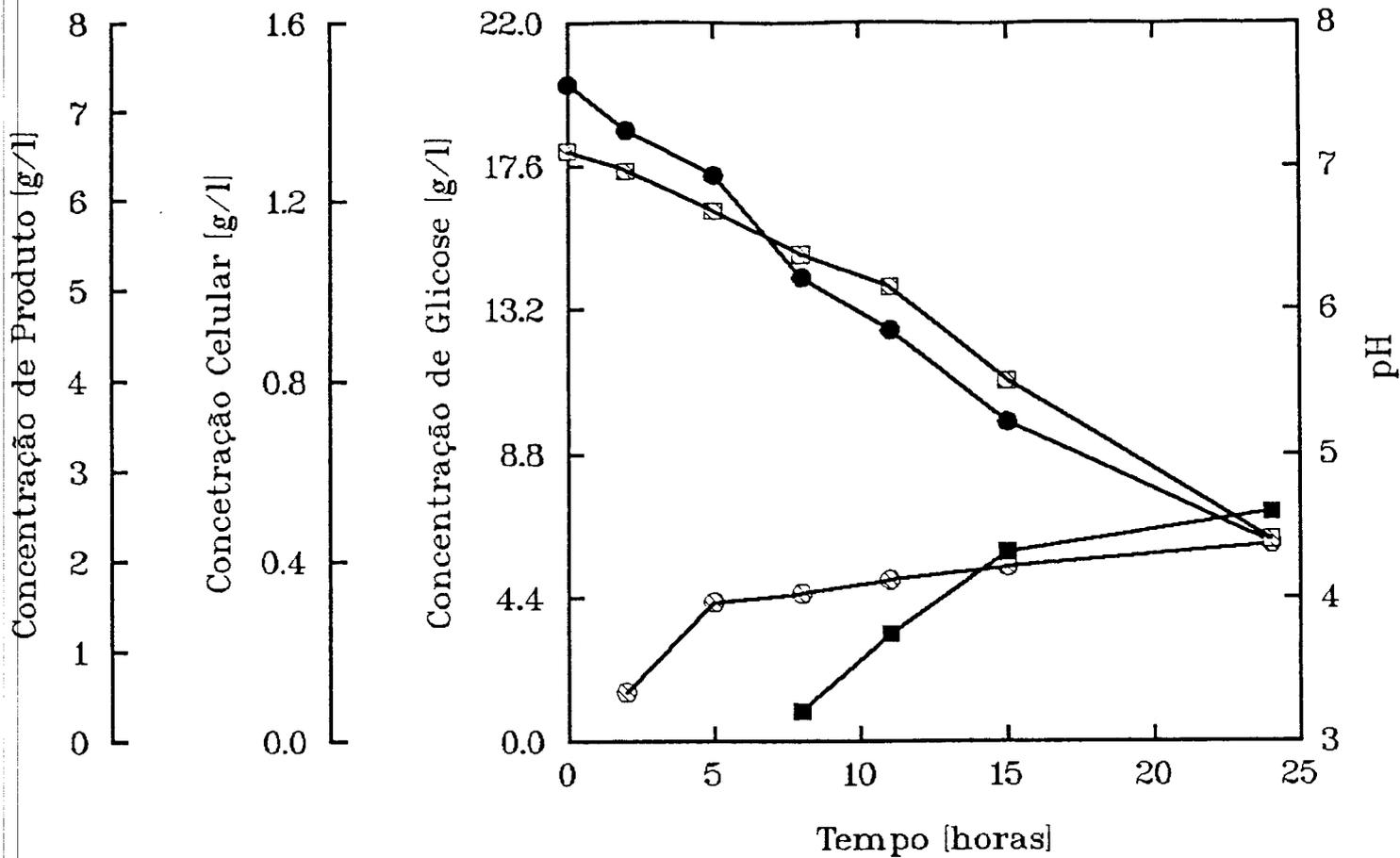
- pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

FIGURA 1: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 12 experimentos no nível (2,2), 560 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar.



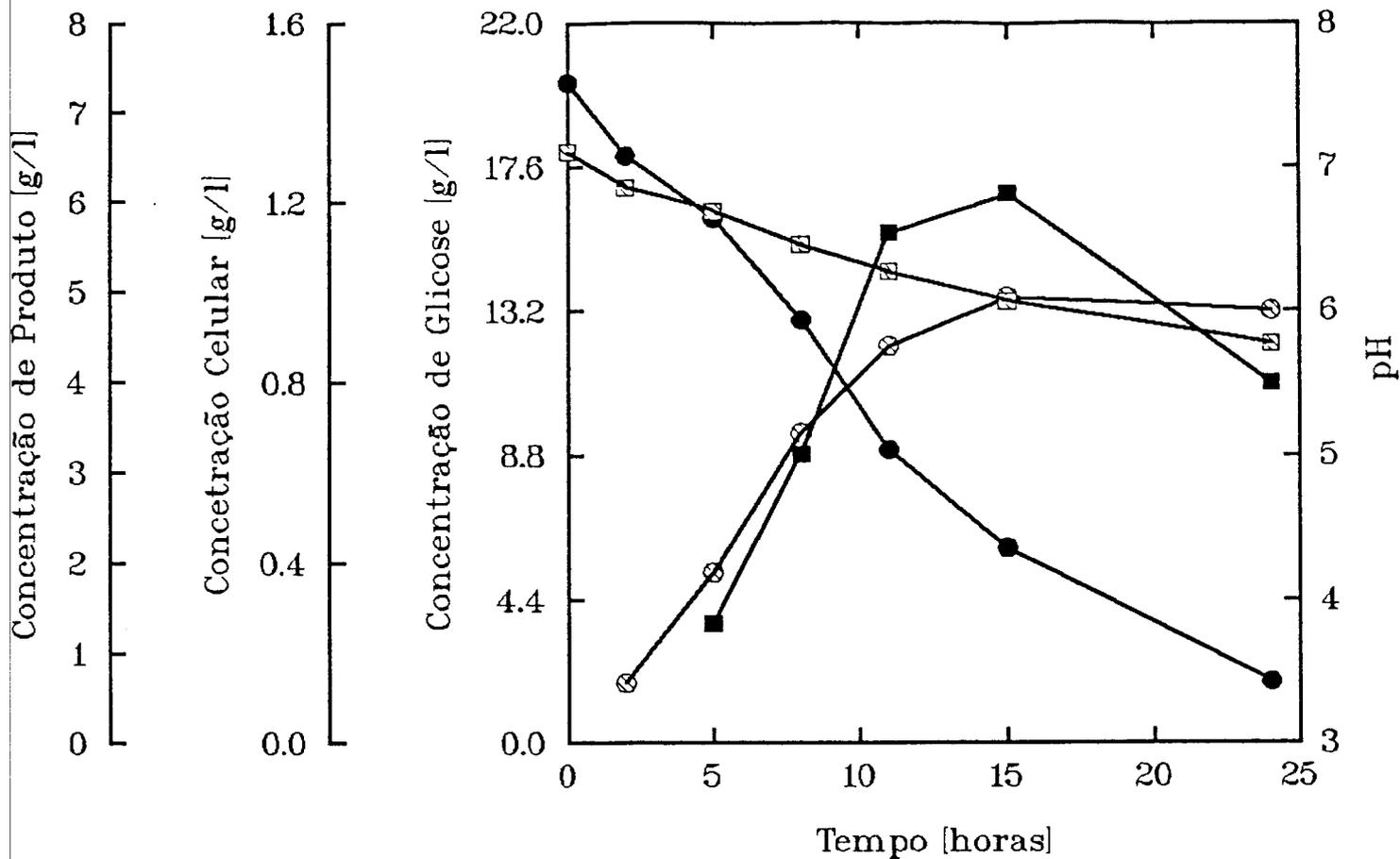
- pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊙ Concentração Celular

FIGURA 2: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (1,1), 260 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,5 l/h de ar.48



- pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

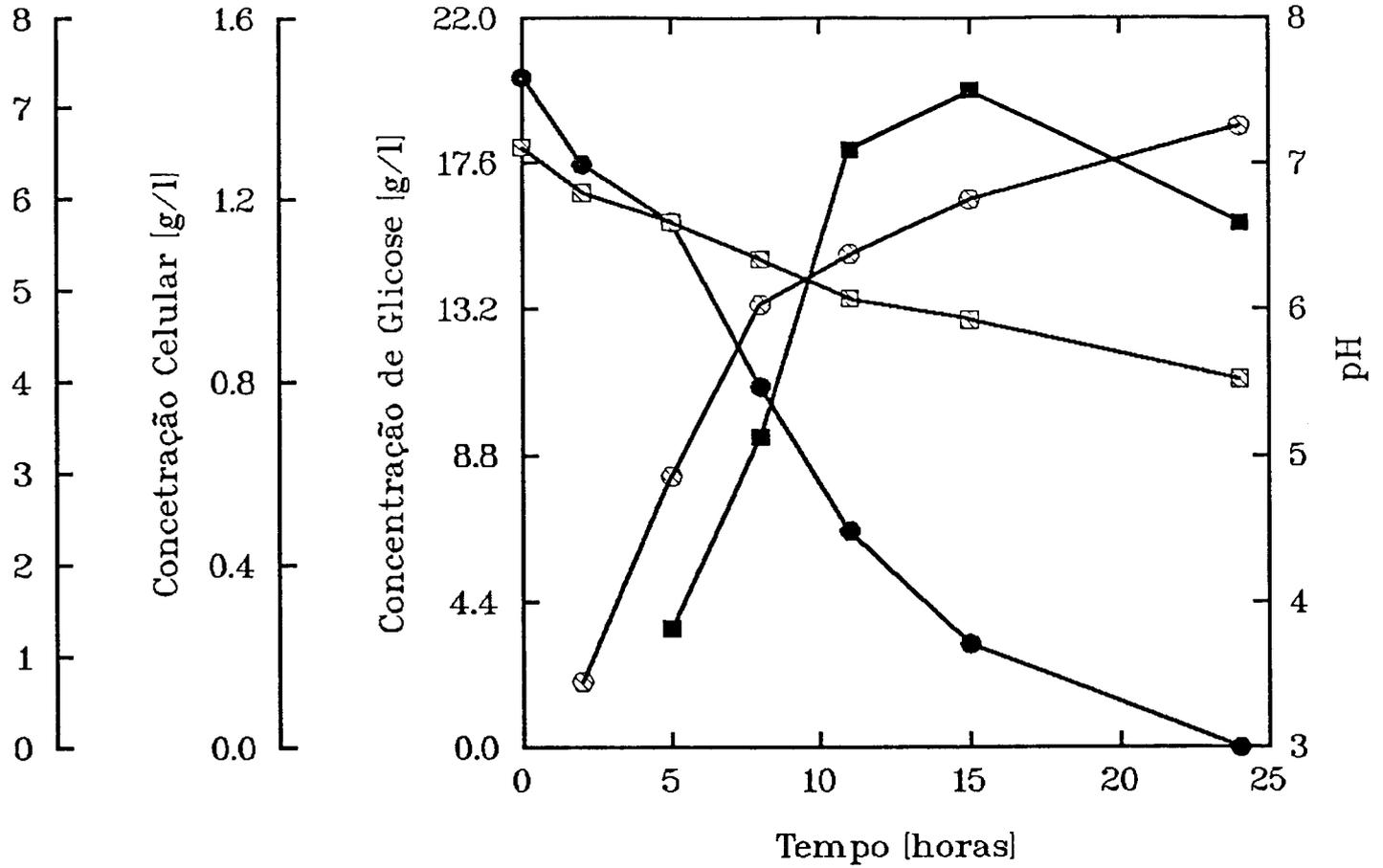
FIGURA 3: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (1,3), 260 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3,5 l/h de ar.49



- ⊠ pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊙ Concentração Celular

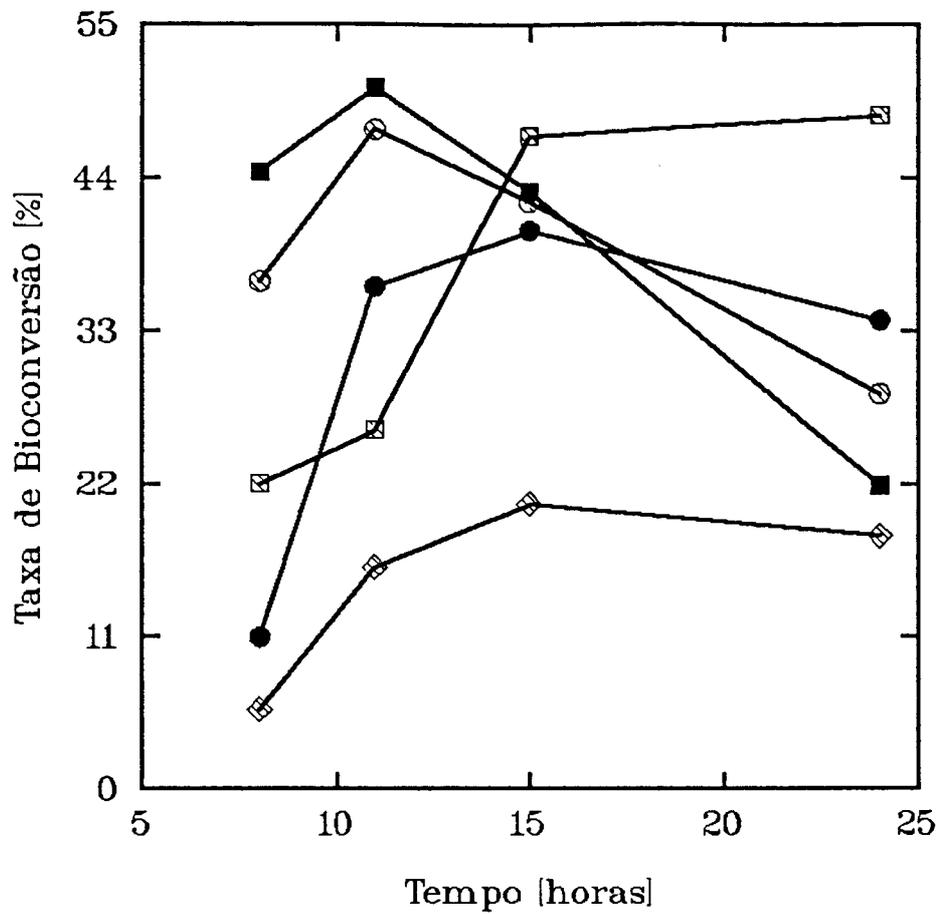
FIGURA 4: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (3,1), 860 mg/l de $(NH_4)_2SO_4$ e 1,5 l/h de ar.

Concentração de Glicose [g/l]



- pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

FIGURA 5: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (3,3), 860 mg/l de $(NH_4)_2SO_4$ e 3,5 l/h de ar.



- Eficiência no Ponto (2,2)
- ⊘ Eficiência no Ponto (3,3)
- Eficiência no Ponto (3,1)
- ⊠ Eficiência no Ponto (1,1)
- ◇ Eficiência no Ponto (1,3)

FIGURA 6: Taxa de bioconversão (Y_p/s) de glicose pela cepa mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597, para os níveis (2,2), (1,1), (1,3), (3,1) e (3,3).

Na figura 1, relativa ao nível (2,2) (560 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 20,62 e a final de 3,74 g/l, perfazendo um consumo de 81,86% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 diminuindo até a 5,75 na 24^a hora de fermentação; a concentração celular ficou estável a partir da 15^a hora de fermentação em 0,87 g/l e a concentração de polissacarídeo na 24^a hora foi de 6,29 g/l, tendo uma taxa de bioconversão de 0,37.

Na figura 2, relativa ao nível (1,1) (260 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração média inicial de glicose foi de 20,1 e a final de 12,9 g/l, perfazendo um consumo de 36,04% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 e diminuiu a 6,34 na 24^a hora de fermentação; a concentração celular ficou estável a partir da 15^a hora de fermentação em 0,48 g/l e a concentração de polissacarídeo na 24^a hora foi de 3,50 g/l, tendo uma taxa de bioconversão de 0,48. Comparando estes resultados com os da figura 1, observa-se que a baixa concentração de nitrogênio associada com uma baixa vazão de ar, certamente dificultou o consumo do substrato e o crescimento da cultura, comprometendo a produção do biopolímero.

Na figura 3, relativa ao nível (1,3) (260 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 20,1 e a final de 6,07 g/l, perfazendo um consumo de 69,81% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 e diminuiu a 4,41 na 24^a hora de fermentação; a concentração celular na 24^a hora de fermentação foi de 0,44 g/l e a concentração de polissacarídeo na 24^a hora foi de 2,56 g/l, tendo

uma taxa de bioconversão de 0,18. A queda mais acentuada do pH, associada a uma baixa taxa de biosíntese sugere que o microrganismo sob estas condições tenha dificuldades para sintetizar o polissacarídeo, e ao mesmo tempo faz com que o crescimento celular seja menor que aquele obtido nos experimentos da figura 1.

Na figura 4, relativa ao nível (3,1) (860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 20,17 e a final de 1,90 g/l, perfazendo um consumo de 90,50% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 e diminuiu a 5,77 na 24^a hora de fermentação; a concentração celular foi de 0,96 g/l na 24^a hora de fermentação e a concentração de polissacarídeo atingiu um máximo de 6,10 g/l na 15^a hora, diminuindo para 4,00 g/l na 24^a hora de fermentação, tendo uma taxa de bioconversão de 0,43 e 0,22 em 15 e 24 horas respectivamente.

Na figura 5, relativa ao nível (3,3) (860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 20,17 g/l e a final de 1,90 g/l, perfazendo um consumo de 90,50% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 e diminuiu a 5,52 na 24^a hora de fermentação; a concentração celular foi de 1,36 g/l na 24^a hora de fermentação e a concentração de polissacarídeo atingiu um máximo de 7,20 g/l na 15^a hora, diminuindo para 5,75 g/l na 24^a hora de fermentação tendo uma taxa de bioconversão de 0,42 e 0,28 em 15 e 24 horas respectivamente, comportamento este observado também nos tempos equivalentes da figura 4.

Na figura 6, comparam-se as taxas percentuais de bioconversão ($Y_p/s \times 100$), dos experimentos mostrados nas figuras

1 a 5. Pode-se observar que o nível (1,1) mostrado na figura 2 apresenta para um tempo de 24 horas uma boa taxa de bioconversão, associado a um baixo consumo de substrato, não possuindo portanto as condições ideais para a obtenção do produto. O nível (1,3) mostrado na figura 3, apresenta uma taxa de bioconversão mais baixa que no nível (1,1), associada a uma queda acentuada do pH e pouca formação de produto, não possuindo também boas condições de biosíntese. Em contrapartida os níveis (2,2), (3,1) e (3,3) mostrados respectivamente nas figuras 1, 4 e 5, possuem boas taxas de bioconversão em tempos menores de fermentação e apresentam também um bom consumo de substrato, sendo que no nível (3,3) observa-se um consumo total do substrato em 24 horas de fermentação. A cepa mutante sob estas condições tem boas taxas de bioconversão e consumo de substrato, pode-se também observar que a produção do biopolímero não está associada ao crescimento celular, ocorrendo durante a fase exponencial e estacionária, concordando com as observações de Senga e col. (1989), que obtiveram uma taxa de bioconversão igual a 0,4 quando utilizaram 50 g/l de glicose em fermentação em batelada e cepa mucoide U1 de *Pseudomonas mendocina*.

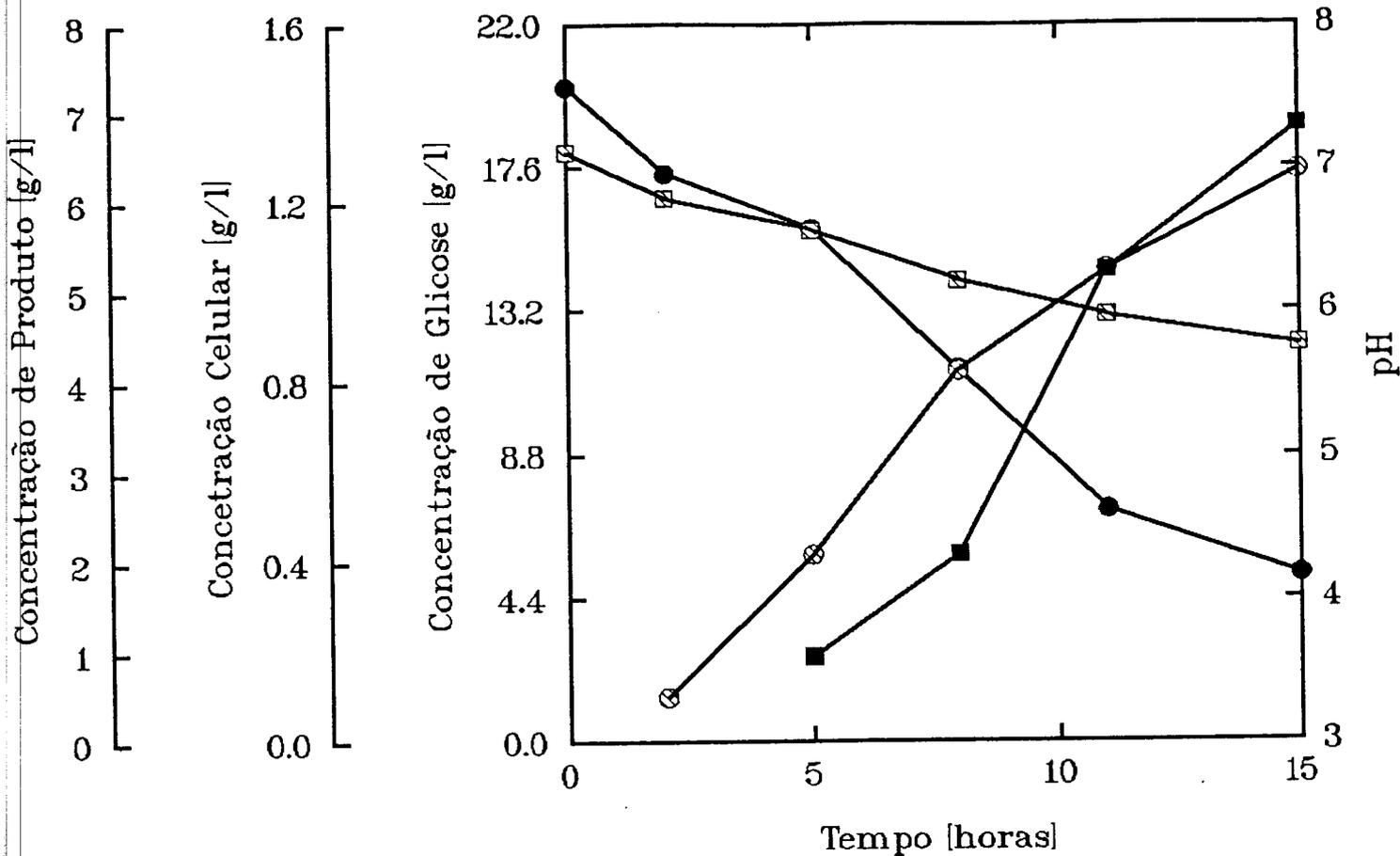
A degradação do biopolímero, observada com mais evidência nas figuras 4 e 5, está associada a presença de uma liase secretada pelo mutante, conforme observação de Hacking e Col. (1983).

A partir destes experimentos, verificou-se que é possível reduzir o tempo de fermentação para 15 horas e aumentar a concentração de nitrogênio, com o objetivo de aumentar a produção do polissacarídeo.

4.2.2.2. RESULTADOS DO SEGUNDO CONJUNTO DE PONTOS

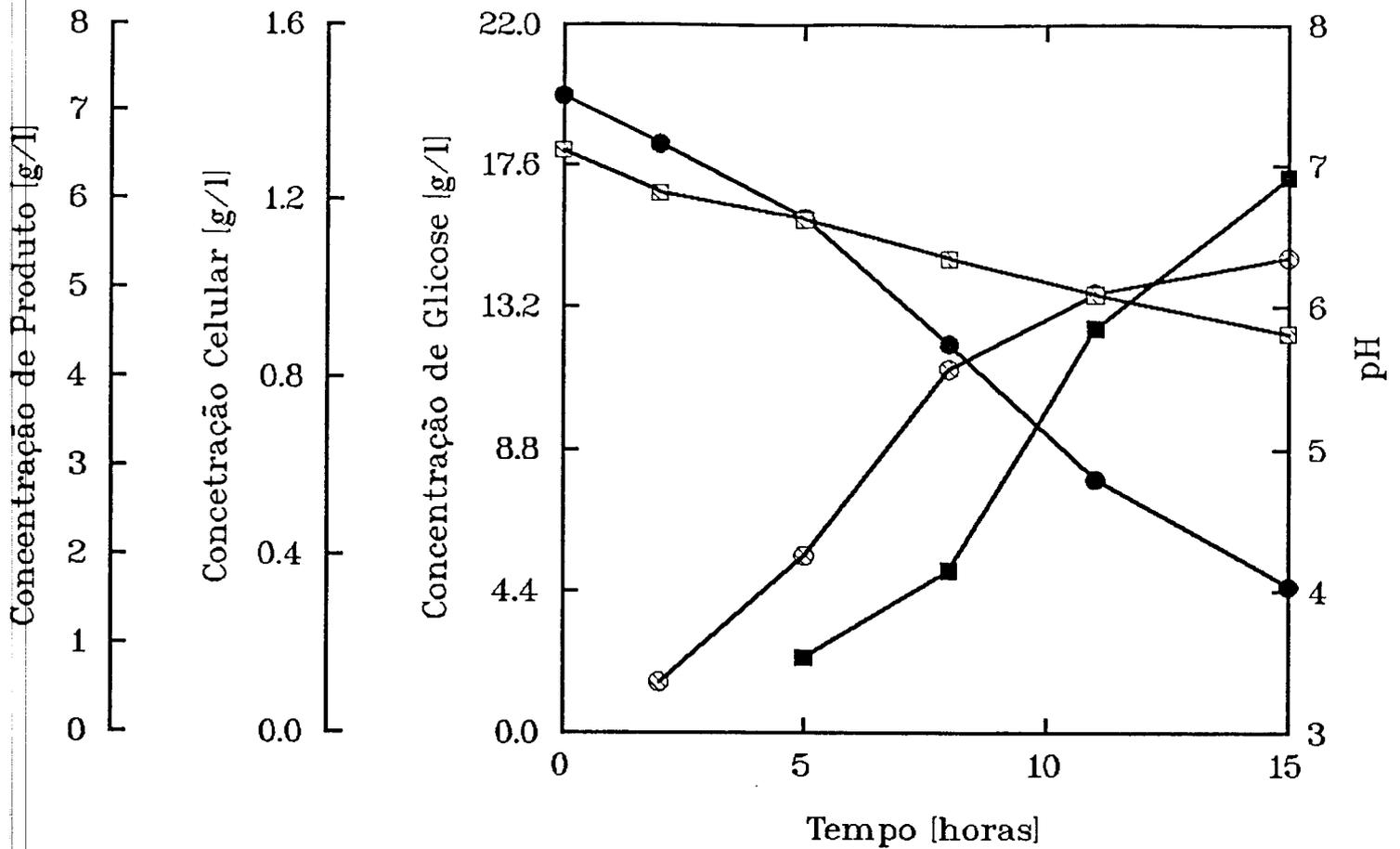
O delineamento dos experimentos realizados para este conjunto de pontos é detalhado no item 3.6.2.

Os resultados apresentados nas Figuras 7 a 13 mostram as curvas de consumo de substrato, concentração de polissacarídeo, concentração celular e pH, referentes aos processos fermentativos realizados pelo mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597, utilizando o meio C descrito no item 3.4.2. e glicose como fonte de carbono.



- ⊠ pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

FIGURA 7: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 4 experimentos no nível (3,3), 1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar.



- pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

FIGURA 8: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (1,3), 710 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar.

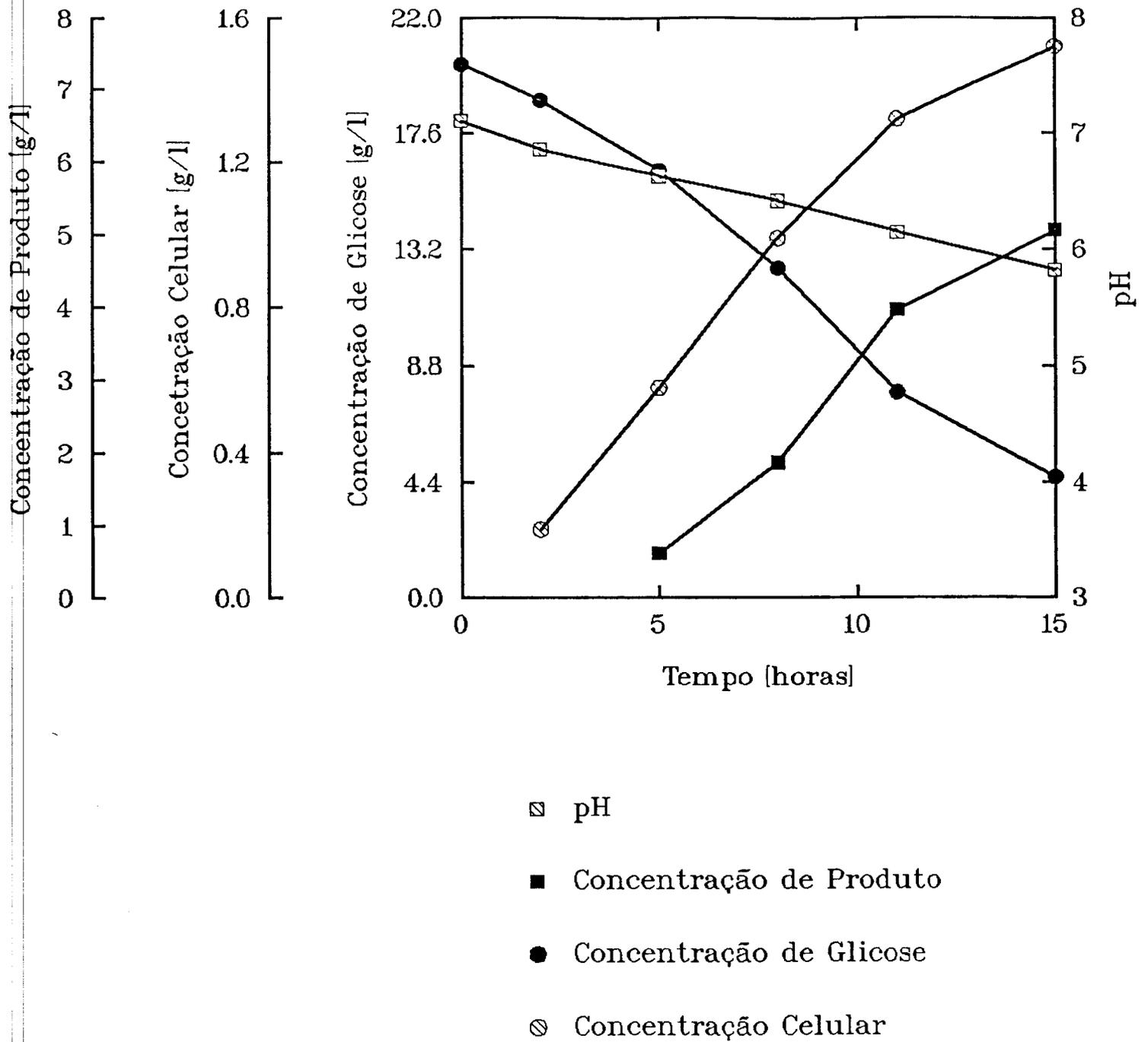
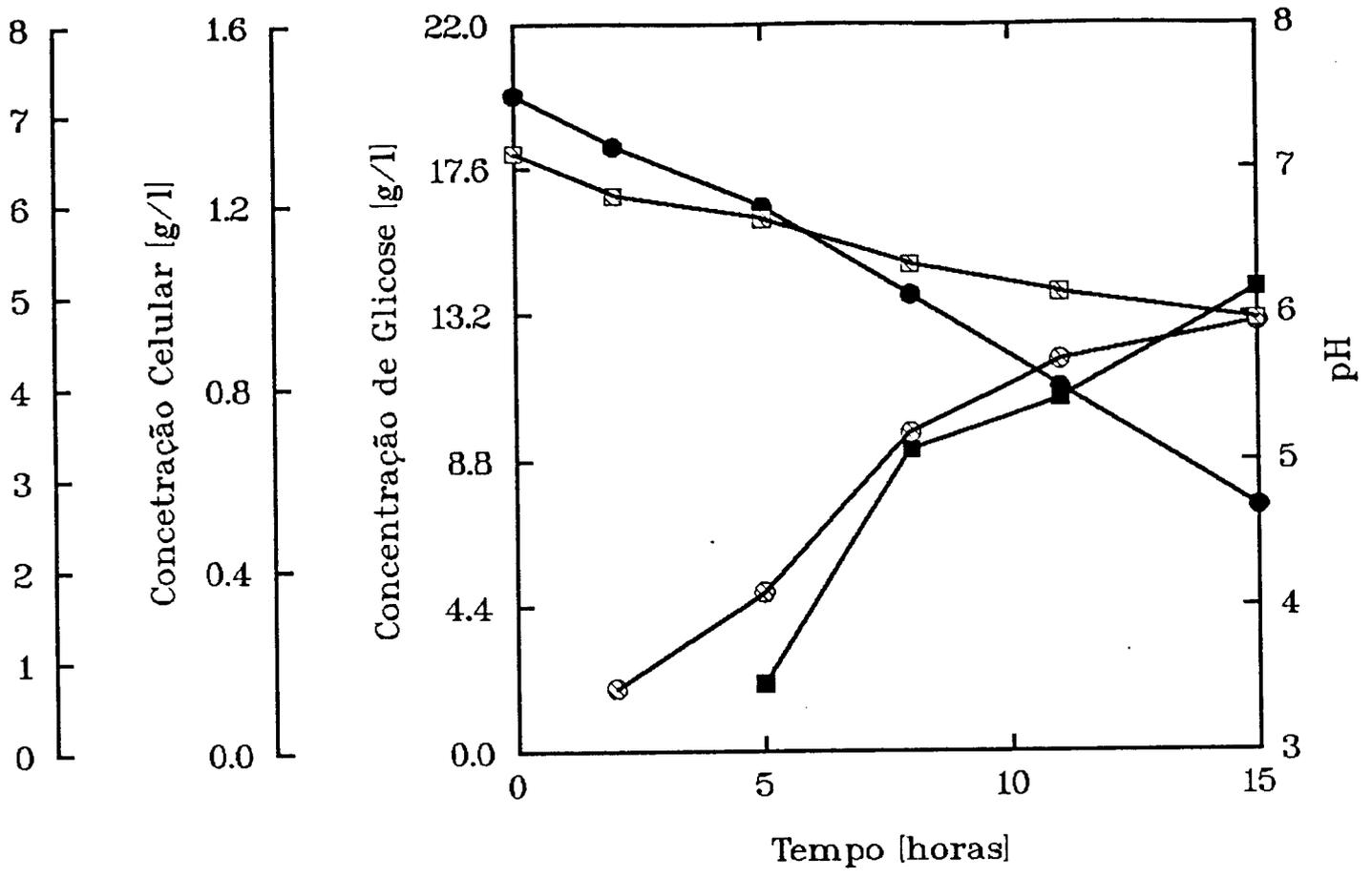


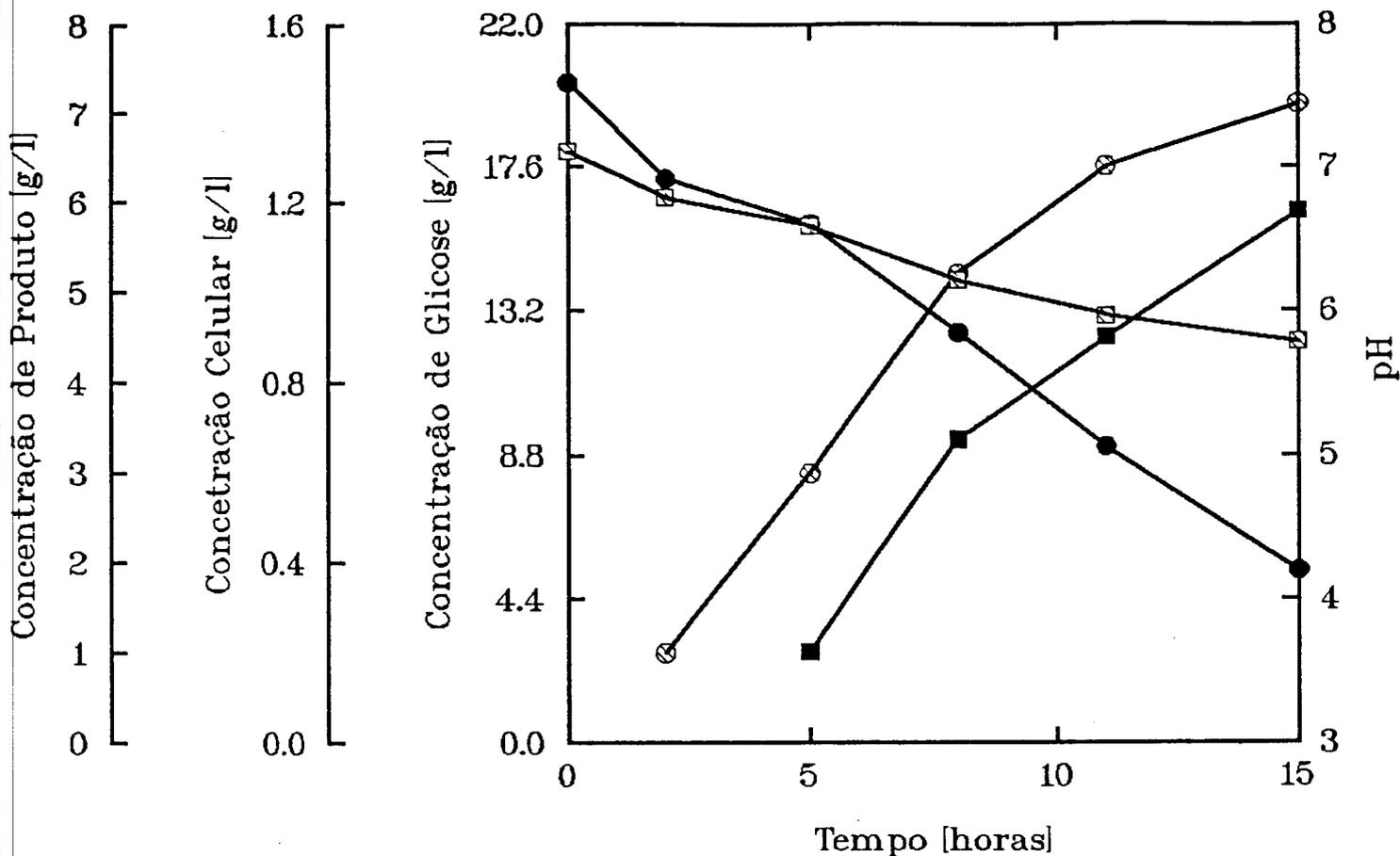
FIGURA 9: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (5,3), 1610 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar.

Concentração de Produto [g/l]



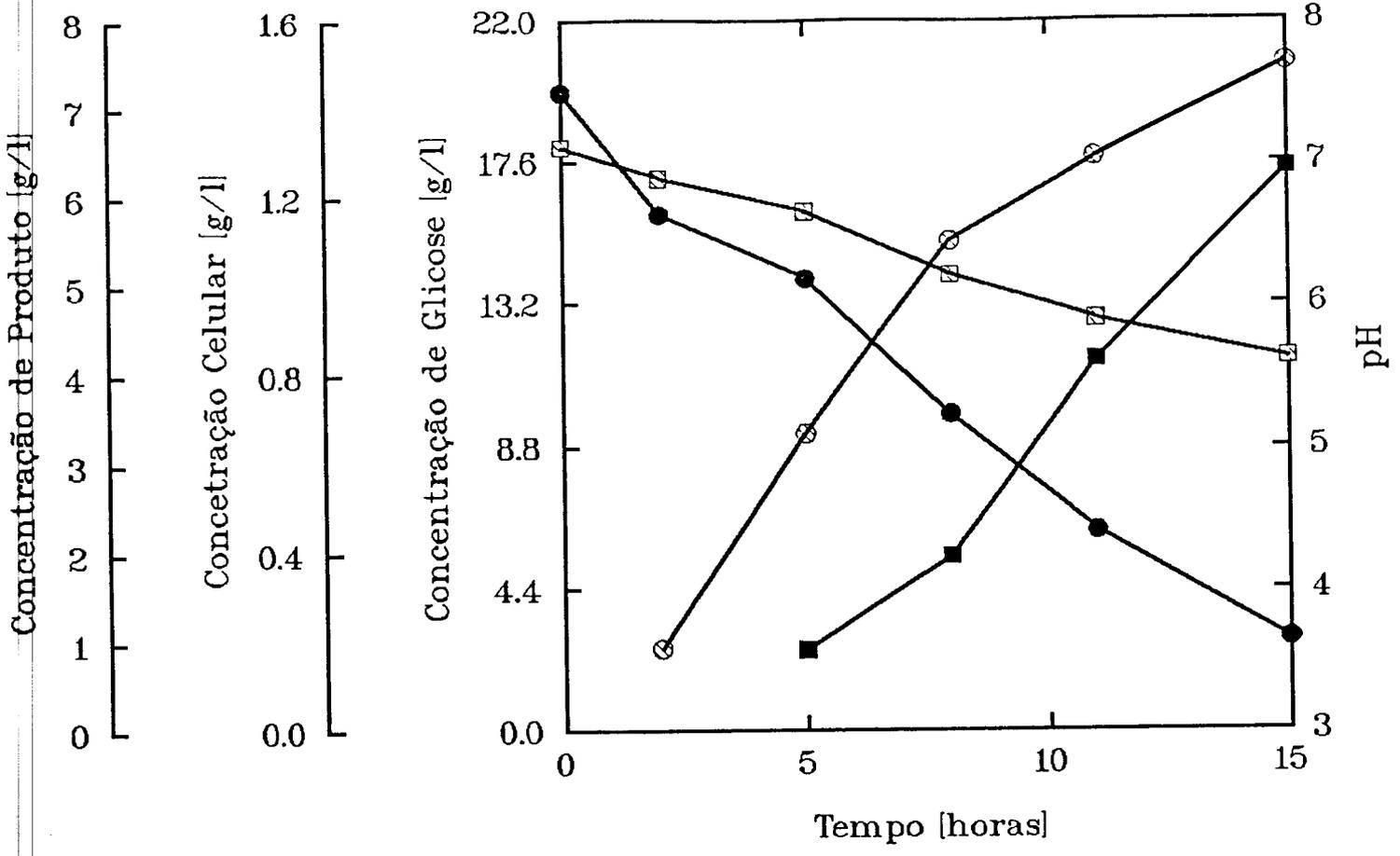
- pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

FIGURA 10: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (3,1), 1160 mg/l de $(NH_4)_2SO_4$ e 1,0 l/h de ar.



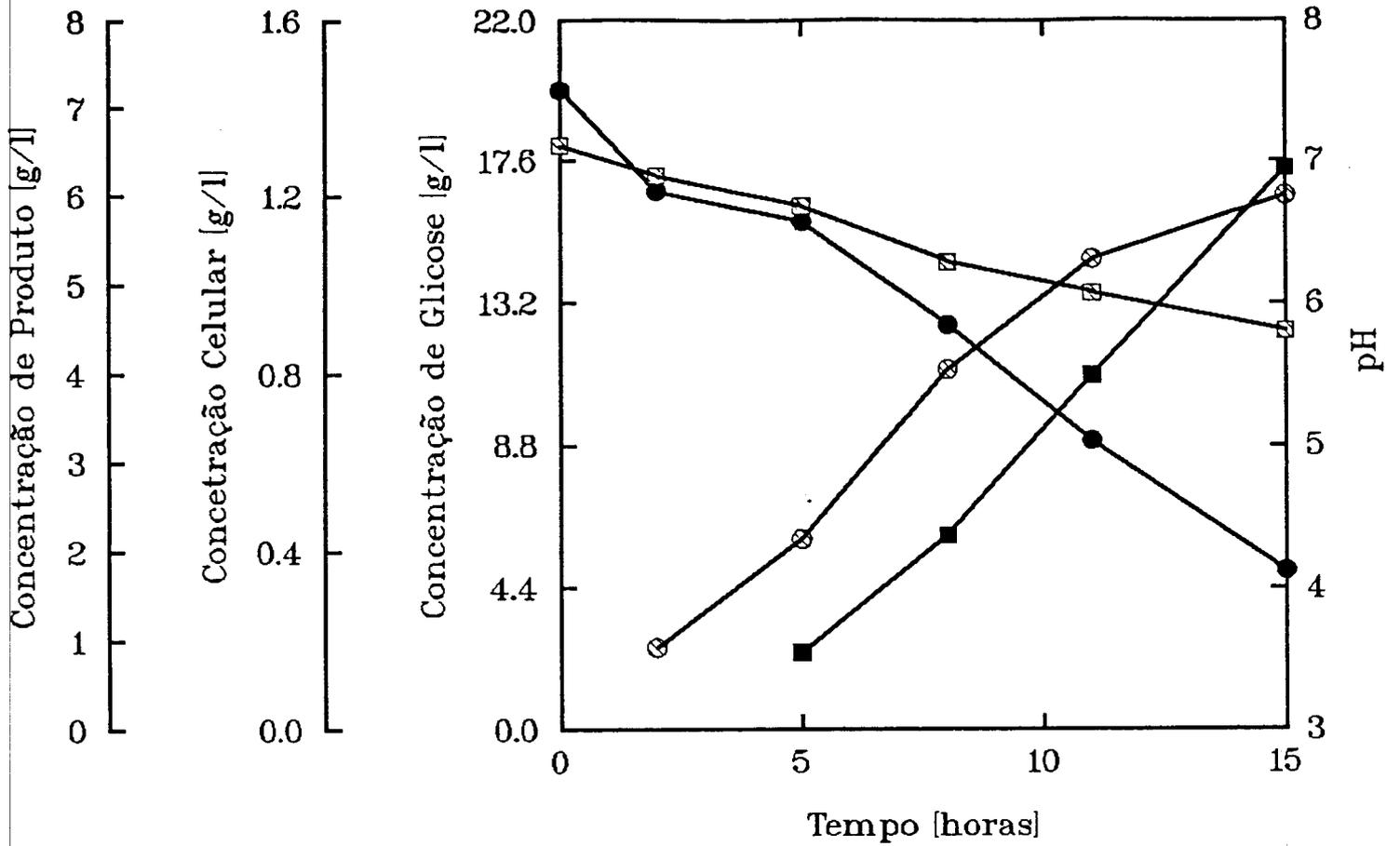
- pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

FIGURA 11: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (3,5), 1160 mg/l de $(NH_4)_2SO_4$ e 4,0 l/h de ar.61



- pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

FIGURA 12: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (4,4), 1460 mg/l de $(NH_4)_2SO_4$ e 3,5 l/h de ar.



- ◻ pH
- Concentração de Produto
- Concentração de Glicose
- ⊗ Concentração Celular

FIGURA 13: Fermentação de glicose por mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 em fermentador de bancada. Média de 2 experimentos no nível (4,2), 1460 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,5 l/h de ar.

Na figura 7, relativa ao nível (3,3) (1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 20,07 e a final de 5,11 g/l, perfazendo um consumo de 74,54% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 diminuindo até 5,77, a concentração celular foi de 1,27 g/l e a concentração de polissacarídeo foi de 6,86 g/l, apresentando uma taxa de bioconversão de 0,46 na 15^a hora de fermentação. A cepa mutante sob estas condições mostrou boas taxas de bioconversão e consumo de substrato.

Na figura 8, relativa ao nível (1,3) (710 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 19,75 e a final de 4,53 g/l perfazendo um consumo de 77,06% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 e diminuindo até 5,81, a concentração celular foi de 1,07 g/l e a concentração de polissacarídeo foi de 6,26 g/l, apresentando uma taxa de bioconversão de 0,41 na 15^a hora de fermentação. As condições neste nível são semelhantes as dos níveis da figura 7.

Na figura 9, relativa ao nível (5,3) (1610 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 2,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 20,22 e a final de 4,60 g/l perfazendo um consumo de 77,25% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 diminuindo até 5,82, a concentração celular foi de 1,52 g/l e a concentração de polissacarídeo foi de 5,06 g/l apresentando uma taxa de bioconversão de 0,32 na 15^a hora de fermentação. A cepa mutante sob estas condições apresentou taxas de bioconversão menores e um consumo de substrato semelhante aos das Figuras 7 e

8.

Na figura 10, relativa ao nível (3,1) (1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,0 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose de 19,82 e a final de 7,38 g/l perfazendo um consumo de 62,76% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 diminuindo até 5,96; a concentração celular foi de 0,94 g/l e a concentração de polissacarídeo foi de 5,07 g/l apresentando uma taxa de bioconversão de 0,41 na 15^a hora de fermentação. A cepa mutante sob estas condições mostrou boas taxas de bioconversão e um menor consumo de substrato quando comparado com os níveis anteriores.

Na figura 11, relativa ao nível (3,5) (1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 4,0 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 20,18 e a final de 5,26 g/l perfazendo um consumo de 73,93% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 diminuindo até 5,79; a concentração celular foi de 1,44 g/l e a concentração de polissacarídeo foi de 5,90 g/l apresentando uma taxa de bioconversão de 0,39 na 15^a hora de fermentação. A cepa mutante sob estas condições mostrou boas taxas de bioconversão e consumo de substrato.

Na figura 12, relativa ao nível (4,4) (1460 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 19,75 e a final de 2,85 g/l perfazendo um consumo de 85,57% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 diminuindo até 5,62; a concentração celular foi de 1,52 g/l e a concentração de polissacarídeo foi de 6,32 g/l apresentando uma taxa de bioconversão de 0,37 na 15^a hora de fermentação. A cepa mutante sob estas condições mostrou boas taxas de

bioconversão e apresenta o maior consumo de substrato comparativamente aos níveis anteriores.

Na figura 13, relativa ao nível (4,2) (1460 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 1,5 l/h de ar), os resultados médios obtidos foram: a concentração inicial de glicose foi de 19,78 e a final de 4,93 g/l perfazendo um consumo de 75,08% do substrato; o pH inicial foi de 7,10 diminuindo até 5,81; a concentração celular foi de 1,26 g/l e a concentração de polissacarídeo foi de 6,31 g/l apresentando uma taxa de bioconversão de 0,42 na 15^a hora de fermentação. A cepa mutante sob estas condições apresenta características semelhantes ao nível (4,4) mostrado na figura 12.

As taxas de bioconversão obtidas por Sengha e col. (1989) para o mutante U1 de *Pseudomonas mendocina*, foram da ordem de 40% sob limitação de nitrogênio em culturas em batelada, taxas estas semelhantes as obtidas pelo mutante M13.

Segundo Anderson e col. (1987) a taxa de bioconversão é limitada a aproximadamente 50%, sendo obtida para o mutante U1 em cultura contínua, os resultados confirmam estas observações, pois as taxas de bioconversão ficaram na faixa de 32 a 46%.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O conjunto dos experimentos realizados segundo o item 3.6.2. e os níveis (1,3) e (3,3) do item 3.6.1. foram submetidos a análise pelo método de superfície de resposta (Box e col., 1988).

As figuras 14, 15, 16 e 17 mostram as superfícies de resposta para os tempos de 5, 8, 11 e 15 horas de fermentação respectivamente.

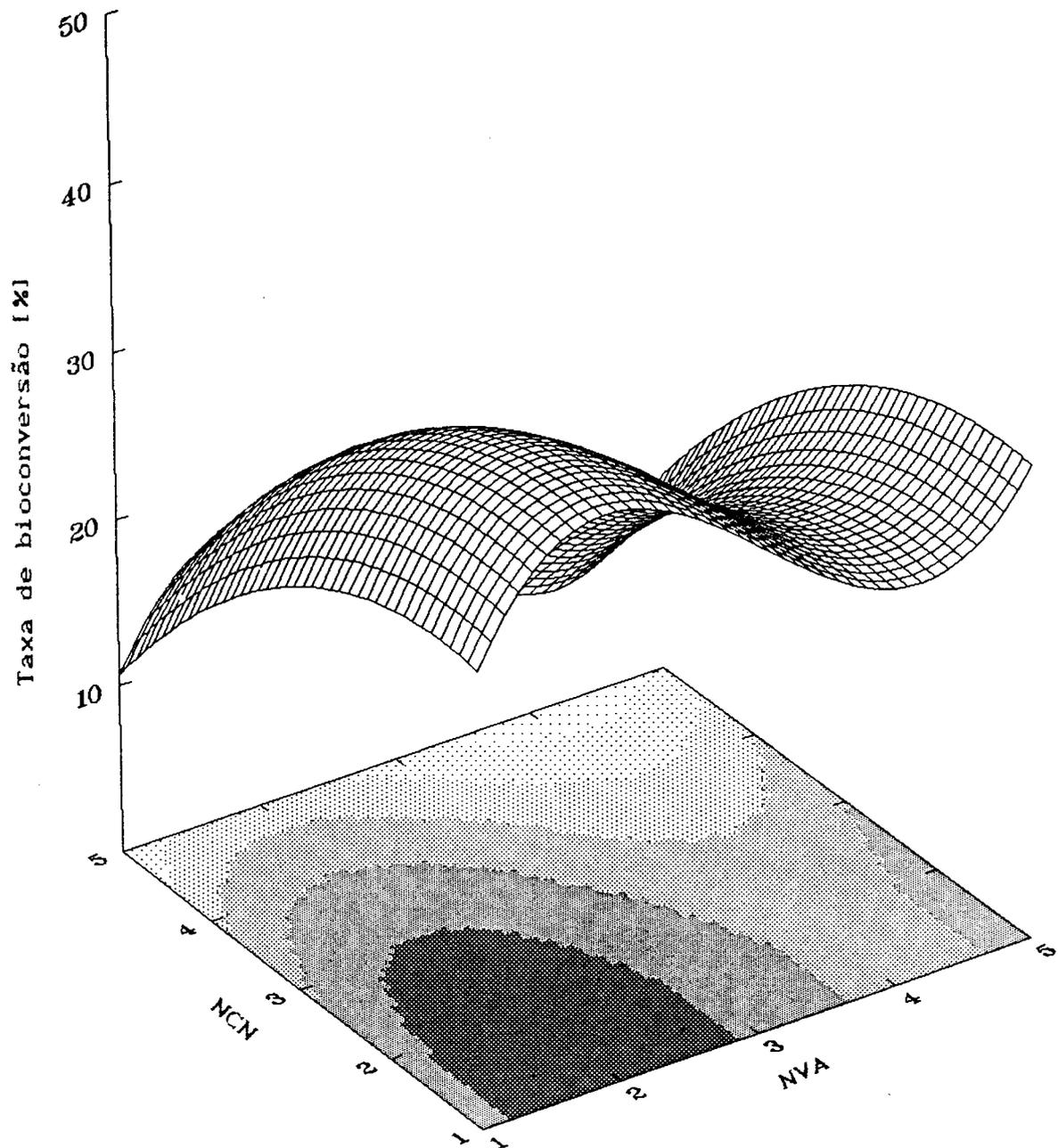


FIGURA 14 : Superfície de resposta para um Tempo de Fermentação de 5 horas pelo mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597.
 NCN - Nível de concentração de nitrogênio
 NVA - Nível de vazão de ar

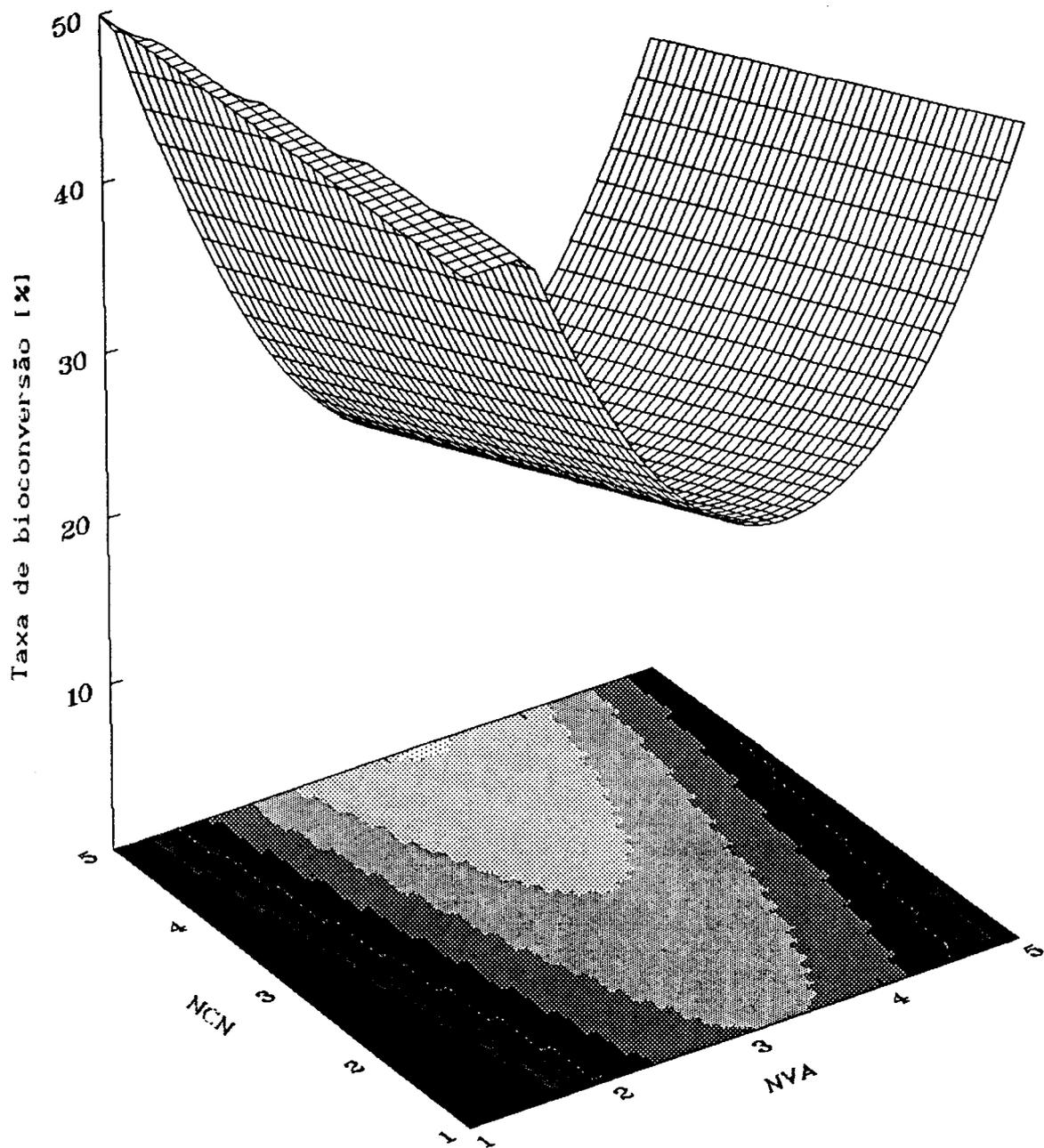


FIGURA 15 : Superfície de resposta para um Tempo de Fermentação de 8 horas pelo mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597.
 NCN - Nível de concentração de nitrogênio
 NVA - Nível de vazão de ar

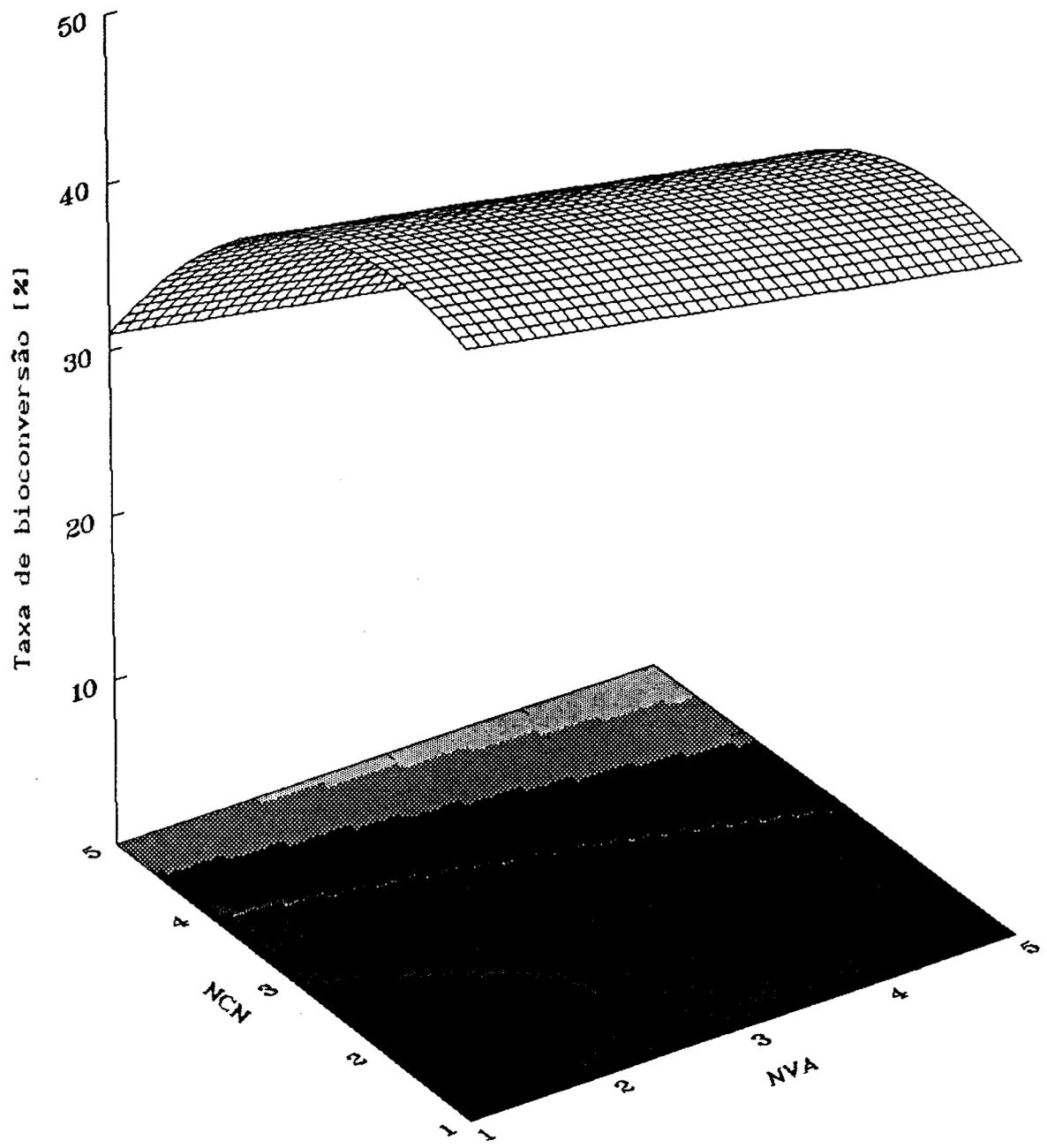


FIGURA 16 : Superfície de resposta para um Tempo de Fermentação de 11 horas pelo mutante M13 de *P. mendocina* FTPT 0597.
 NCN - Nível de concentração de nitrogênio
 NVA - Nível de vazão de ar

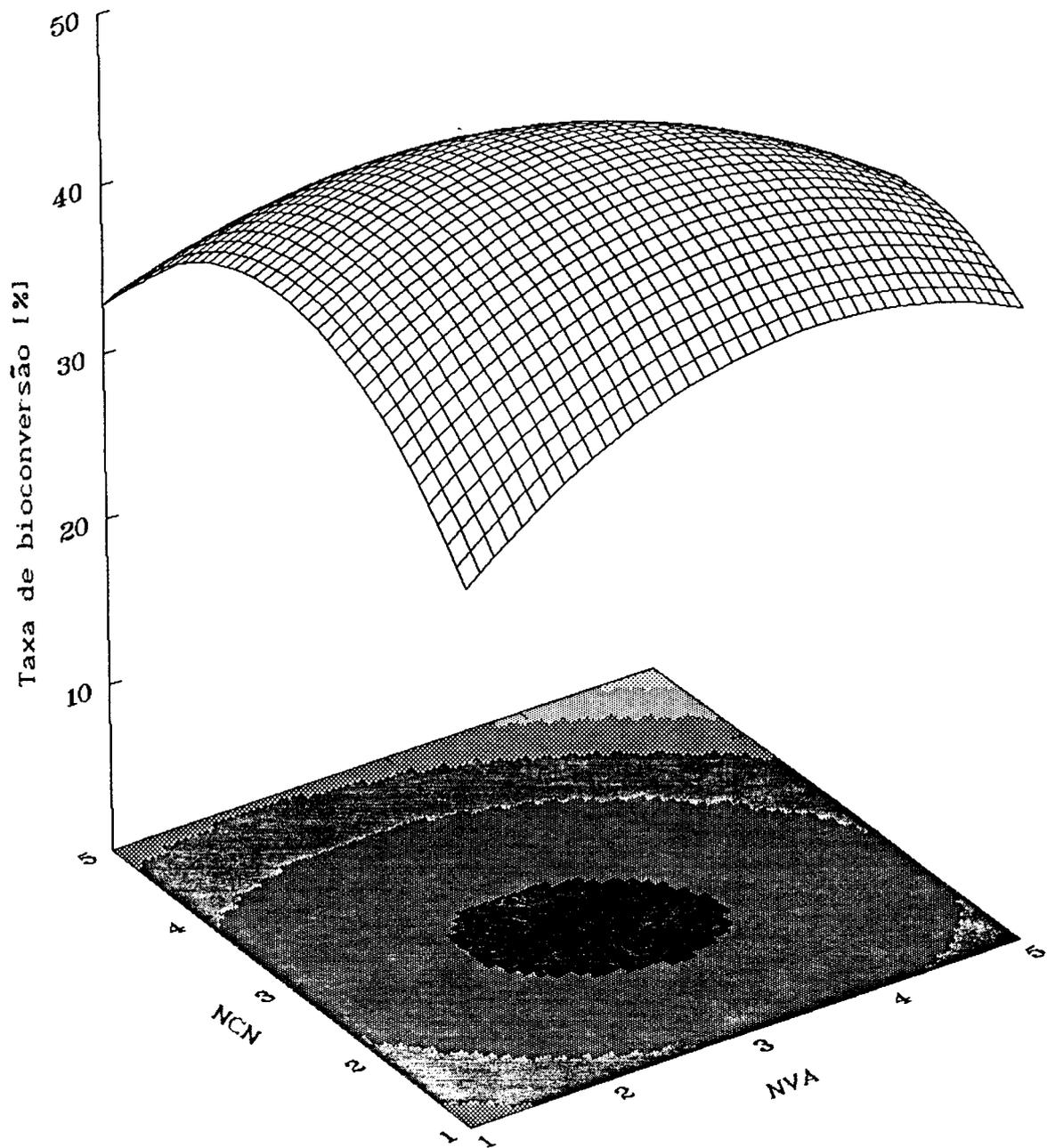


FIGURA 17 : Superfície de resposta para um Tempo de Fermentação de 15 horas pelo mutante de *P. mendocina* FTPT 0597.
 NCN - Nível de concentração de nitrogênio
 NVA - Nível de vazão de ar

Objetivando determinar a região de maior taxa de bioconversão ($Y_P/S \times 100$), abordou-se o problema avaliando-se os resultados em cada tempo específico, visto que, pela existência de correlação entre as observações dadas as concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ e vazão de ar, conclusões estatísticas ficam prejudicadas.

Pela Tabela 13 percebe-se que a taxa de bioconversão percentual ($Y_P/S \times 100$) média de glicose em produto, é maior para os tempos de 11 e 15 horas.

Tabela 13: Taxa de bioconversão média de glicose em biopolímero pela cepa mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597.

Tempo (horas)	Y_P/S (%)
5	23.29
8	30.90
11	39.07
15	39.63

Foram feitas regressões polinomiais visando ajustar os modelos às observações, de tal sorte que se obtivesse o maior grau de explicação possível a cada tempo específico.

Conclusões a respeito das produtividades médias, considerando-se os efeitos das concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e de vazão de ar, foram obtidas via testes de comparação entre as médias dos tratamentos, onde tratamento significa fonte de variação no modelo proposto.

Para o tempo de 5 horas de fermentação, obteve-se uma maior taxa de bioconversão ao nível de concentração de 860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ou seja, a diferença entre sua taxa de bioconversão média com relação aos demais níveis foi estatisticamente significativa. O efeito na taxa de bioconversão média obtido ao nível de 1,5 l/h de ar foi significativamente maior em relação a taxa de bioconversão dos demais níveis.

Para os resultados obtidos ao tempo de 8 horas de fermentação pode-se dizer que, aos níveis de concentração de 860 e 1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obteve-se uma maior taxa de bioconversão média com relação aos demais. Nestes níveis as taxa de bioconversão médias não são significativamente diferentes ($t=0,10$; $GL=16$; $0,178 < Y_{P/S} < 0,235$). A taxa de bioconversão média obtida com uma vazão de ar de 1 l/h é significativamente superior as demais. Comparando-se, por exemplo, as taxas de bioconversão médias dos experimentos realizados com vazões de ar de 1 e 5 l/h, pode-se chegar a estas conclusões ($t=-1,96$; $GL=16$; $0,059 < Y_{P/S} < 0,089$). Sendo t a estatística "t de student" utilizada para comparar as médias entre os tratamentos e GL são os graus de liberdade (Box e col., 1988)

Para os resultados obtidos ao tempo de 11 horas de fermentação pode-se dizer que a taxa de bioconversão média foi significativamente maior ao nível de 860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Considerando-se o efeito combinado entre vazão de ar e concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a taxa de bioconversão média obtida aos níveis de 860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e vazão de ar de 1,5 l/h foi significativamente maior que todos os outros efeitos combinados, a menos do obtido com a combinação de 860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e vazão de ar de 3,5 l/h, onde a diferença não foi significativa, ($t=1,02$; $GL=15$; $0,177 < Y_{P/S} < 0,234$).

Considerando-se os resultados observados para o tempo de 15 horas de fermentação, pode-se dizer que a taxa de bioconversão média aos níveis de concentração de 860 e 1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são significativamente maiores do que a obtida com os níveis mais altos de concentração. Com uma vazão de ar de 1,5 l/h foi obtida uma taxa de bioconversão média significativamente maior do que as obtidas a vazões maiores.

As regressões polinomiais ajustadas para os tempos 5, 8, 11 e 15 horas de fermentação encontram-se no anexo 2.

5. CONCLUSÕES

- 1 - As cepas mutantes M02 e M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 produzem polissacarídeos, sendo que a M13 foi a que apresentou as melhores taxas de bioconversão.
- 2 - As cepas mutantes não necessitam da presença de antibiótico no meio de fermentação para continuarem a produzir o polissacarídeo.
- 3 - Quando são utilizadas glicose e sacarose como fonte de carbono a cepa M02 apresenta um menor consumo de substrato e um decréscimo maior do pH quando comparada ao consumo de substrato e variação de pH da cepa M13.
- 4 - Nos experimentos realizados em Erlenmeyers a glicose e a sacarose foram os melhores substratos e o mutante M13 apresentou para os mesmos as melhores taxas de bioconversão (52% para a glicose e 40% para a sacarose, partindo-se de concentrações iniciais de 20,07 e 29,93 g/l, respectivamente).
- 5 - As melhores taxas de bioconversão foram de 0,46 para concentrações de 1160 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e vazões de ar de 1,5 l/h e 0,42 para concentrações de 860 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e vazões de ar de 2,5 l/h na 15^a hora de fermentação para os experimentos realizados em fermentadores de bancada.

6 - A cepa mutante M13 de *Pseudomonas mendocina* FTPT 0597 apresenta vantagens em relação aos outros microrganismos produtores de polissacarídeos, pois não necessita um controle rigoroso da tensão de oxigênio dissolvido como o *Azotobacter vinelandii* e não apresenta patogenicidade conhecida aos mamíferos como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa*.

6. SUGESTÕES

1 - Estudar as características químicas e reológicas do polissacarídeo obtido através do processo fermentativo.

2 - Estudar a influência na produtividade de outras fontes de nitrogênio, carbono e micronutrientes.

3 - Estudar ampliação de escala e separação de células do meio de cultura.

4 - Estudar a influência de enzimas proteolíticas sobre as características do polissacarídeo.

7. BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, A.J.; HACKING, A.J. e DAWES, E.A. (1987)
" Alternative Pathways for the Biosynthesis of Alginate
from Fructose and Glucose in *Pseudomonas Mendocina* and
Azotobacter vinelandii." *Journal of General
Microbiology*. 133: 1045-1052.
- ANNISON, G. e COUPERWHITE, I. (1986a) "Effect of Limiting
Substrate Concentration, Growth Rate and Aeration on
Alginate Composition and Production by *Azotobacter
vinelandii* in Continuous Culture ". *Food Hydrocolloids*.
1(2): 101-111.
- ANNISON, G. e COUPERWHITE, I. (1986b) "Influence of Calcium
on Alginate Production and Composition in Continuous
Culture of *Azotobacter vinelandii*". *Appl. Microbiol.
Biotechnol.* 25: 55-61.
- BANERJEE, P. C.; VANAGS, R. I.; CHAKRABARTY, A. M. e
MAITRA, P. K. (1983) "Alginate Acid Synthesis in
Pseudomonas aeruginosa Mutants Defective in Carbohydrate
Metabolism". *J. of Bacteriology*. 155(1): 238-245.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. e HUNTER, J. S. (1988).
*Statistics for Experiments, An Introduction to Design,
Data Analysis, and Model Building*. John Wiley & Sons Ed.
New York.
- BRIVONESE, A. C. e SUTHERLAND, I. W. (1989) " Polymer
production by a mucoid stain of *Azotobacter vinelandii*

in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30: 97-102.

CHRISTENSEN, B.E.; KJOSBAKKEN, J. e SMIDSRØD, O. (1985) "Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. "Applied and Environmental Microbiology. 50(4): 837-845.

CONGREGADO, F.; ESTANOL, I.; ESPUNY, M.J.; FUSTÉ, M.C.; MANRESA, M.A.; MARQUÉS, A.M.; GUINEA, I. e SIMON-PUJOL, M.D. (1985) " Preliminary studies on the production and composition of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp EPS-5028." Biotechnology Letters. 7(12): 883-888.

DAHLQVIST, A. (1964) "Method for assay of intestinal disaccharidases". Analytical Biochemistry. 7: 18-25.

DERETIC, V.; GILL, J.F. e CHAKRABARTY, A.M. (1987) "Alginate biosynthesis: A model system for gene regulation and function in *Pseudomonas*" BioTechnology. 5: 469-477.

FENANTES, E.G. (1985), "Polisacáridos microbianos." In: Prospectiva de la Biotecnología en Mexico. R. Q. (compilador), FJBS-CONACYT, México. p. 65-92.

FYFE, J.A.M. e GOVAN, J.R.W. (1980). " Alginate Synthesis in Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*: a Chromosomal Locus Involved in Control". J. of General Microbiology. 119: 443-450.

GLICKSMAN, M. (1982). " Comparative properties of hydrocolloids." In: Food Hydrocolloids. Ed. Glicksman, M. CRC PRESS, Florida. v. I, cap. 1, p. 3-18.

- GLICOSE enz-color Pinhais. Piraraquara, Bio Diagnóstica Ind. Química Clínica, s.d. 2p. (Catálogo)
- GOVAN, J.R.W.; FYFE, J.A.M. e JARMAN, T.R. (1981) "Isolation of Alginate-producing Mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*". *Journal of General Microbiology*. 125: 217-220.
- HACKING, A. J.; TAYLOR, I. W. F.; JARMAN, T. R. e GOVAN, J. R. W. (1983) "Alginate Biosynthesis by *Pseudomonas mendocina*". *Journal of General Microbiology*. 129: 3473-3480.
- HORAN, N. J.; JARMAN, T. R. e DAWES, E. A. (1983). "Studies on Some Enzymes of Alginic Acid Biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* Grown in Continuous Culture". *J. of General Microbiology*. 129: 2985-2990.
- IMESON, A. P.; MITCHELL, J. R. e LEDWARD, D. A. (1980) "Rheological properties of Spinning Dopes and Spun Fibres Produced from Plasma-Alginate mixture". *J. Fd. Technol.* 15: 319-327.
- JANSSON, E.; LINDBERG, B. e SANDFORD, P.A. (1983) "Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*." *Carbohydrate Research*. 124: 135-139
- JAYASURIYA, G. C. N. (1955). "The Isolation and Characteristics of an Oxalate-decomposing Organism". *J. Gen. Microbiol.* 12: 419-428.
- KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKO, T. e COTTRELL, W. (1982). "Agar-Like Polysaccharide Produced by *Pseudomonas* Species: Production and

- Basic Properties". Applied and Environmental Microbiology. 43(5): 1086-1091.
- KING, A.H. (1983). "Seaweed extracts" In: Food Hydrocolloids.. Ed. Glicksman, M. CRC PRESS, Florida. v. II, cap. 6, p. 115-190.
- LIN, C.S. e LIM, H.C. (1990). " A kinetic model and steady-state analysis for polysaccharide production by *Methylobionas mucosa*" Journal of Biotechnology. 16: 137-152.
- MANRESA, A.; ESPUNY, M.J.; GUINEA, J. e COMELLES, F. (1987). "Characterization and production of a new polymer from *Pseudomonas* sp GSP-910." Appl. Microbiol. Biotechol. 26: 347-351.
- MARQUÉS, A.M.; ESTANOL, I.; ALSINA, J.M.; FUSTÉ, C.; SIMON-PUJOL, D.; GUINEA, J. e CONGREGADO F. (1986) "Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp strain ESP-5028" Applied and Environmental Microbiology. 52(5): 1221-1223.
- MARTELLI, H.L. e PANEK, A.D. (1968) "Parte Analítica" In: Bioquímica Experimental. Ed. Ao Livro Técnico. cap. 9 p. 104-106.
- MAXILAT LX 5000: aplicação; hidrólise de lactose em leite. Delft, Gist- Brocades nv, 1980. 1p. (Technical data sheet Mil-03/80-03.En03) [Catálogo]
- McAVOY, M.J.; NEWTON, V.; PAULL, A.; MORGAN, J.; GACESA, P. e RUSSELL, N. J. (1989) " Isolation of Mucoid Strains of *Pseudomonas aeruginosa* from Non-Cystic-Fibrosis Patients and Characterisation of

- the Structure of their Secreted Alginate". J. Med. Microbiol. 28: 183-189.
- MIAN, F.A.; JARMAN, T.R. e RIGHELATO, R.C. (1978) "Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*" Journal of Bacteriology. 134(2): 418-422.
- MILES, M.J.; MORRIS, V.J. E O'NEIL, M.A. "Gellan gum" In: Gums and Stabilisers for the Food Industry 2. Application of Hydrocolloids. Ed. Phillips, G. O.; Wedlock, D. J. e Williams, P. A. Pergamon Press p. 485-498.
- MORRIS, V. (1990). "Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food systems." Food Biotechnology. 4(1) 45-57.
- NEDER, R.N. (1968). "Introdução a Microbiologia" Instituto Zimotécnico Prof. Jaime Rocha de Almeida. ESALQ-USP, Piracicaba SP.
- PINDAR, D. F. e BUCKE, C. (1975). "The Biosynthesis of Alginate Acid by *Azotobacter vinelandii*". Biochemical Journal. 152: 617-622.
- READ, R.R. e COSTERTON, J.W. (1987) "Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*" Can. J. Microbiol. 33: 1080-1090.
- REYNOLDS, C. (1990). "Carbohydrates with functional for use in foods." Voedingmiddelentechnologie. 23(22) 37-40.
- SAND, R. (1982). "Comparative properties of hydrocolloids." In: Food Hydrocolloids. Ed. Glicksman, M. CRC PRESS, Florida. v. I, cap. 2, p. 19-46.

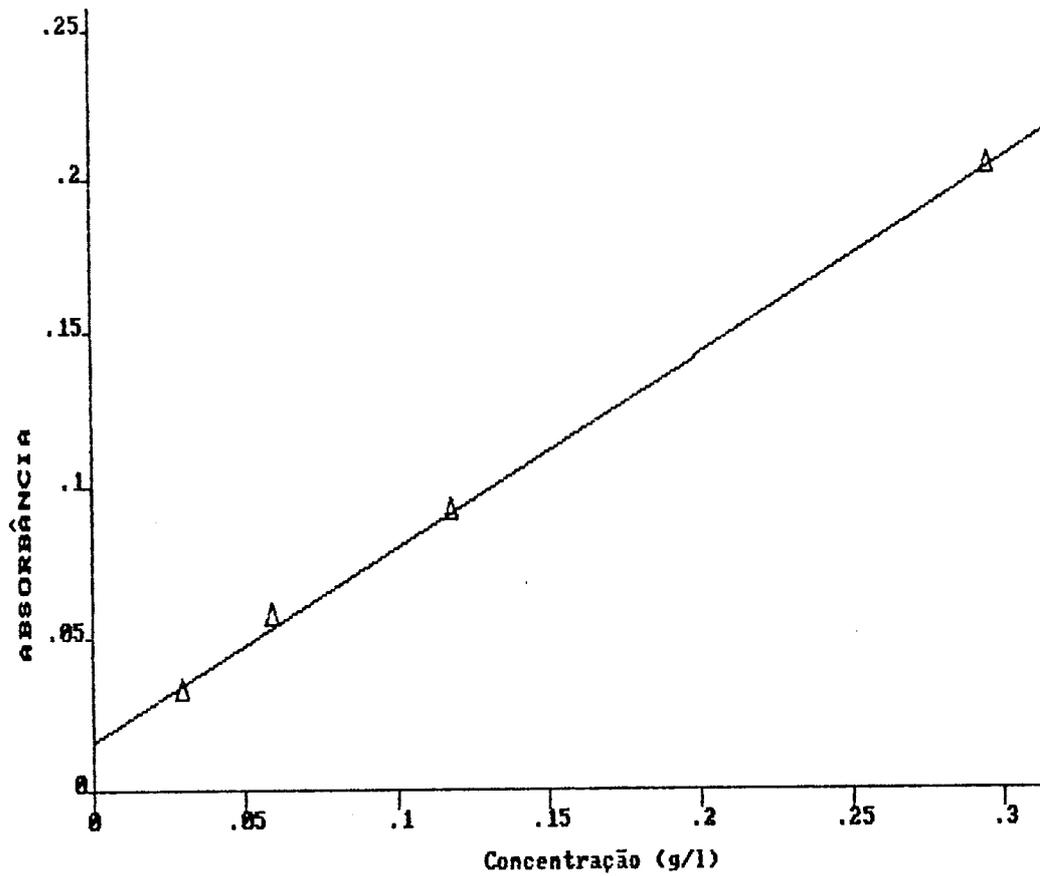
- SANDFORD, P.A. (1979). "Exocellular microbial polysaccharides" *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 36: 265-313.
- SANDFORD, P.A. (1982). "Fermentation (biosynthetic) gums" In: *Food Hydrocolloids..* Ed. Glicksman, M. CRC PRESS, Florida. v. I, cap. 8, p. 167-202.
- SENGHA, S. S.; e ANDERSON, A. J.; Hacking, A. J. e Dawes, E. A. (1998) "The production of Alginate by *Pseudomonas mendocina* in Batch and Continuous Culture". *Journal of General Microbiology.* 135: 795-804.
- SKJAK-BRAEK, G.; GRASDALEN, H. e LARSEN, B. (1986). "Monomer Sequence and Acetylation Pattern in some Bacterial Alginates". *Carbohydrate Research.* 154: 239-250.
- SUTHERLAND, I.W. (1986). "Extracellular Polysaccharides". In: *Biotechnology.* Ed. Rehm, H.J. e Reed, G., cap. 3 p. 531-574, 1986.
- TAIT, M.I.; SUTHERLAND, I.W. e CLARKE-STURMAN, A.J. (1986) "Effect of Growth Conditions on the Production, Composition and Viscosity of *Xanthomonas campestris* Exopolysaccharide" *Journal of General Microbiology.* 132: 1483-1492.
- THOM, D.; DEA, I. C. M.; MORRIS, E. R. e POWELL, A. D. (1982). "Interchain Associations of Alginate and Pectins". *Prog. Food Nutr. Sci.* 6: 97-108.
- WILLIAMS, A.G., e WIMPENNY, J.W.T. (1977) "Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in batch culture". *Journal of General Microbiology.* 102: 13-21.
- WILLIAMS, A.G., e WIMPENNY, J.W.T. (1978) " Exopolysac-

charide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in continuous culture". *Journal of General Microbiology*. 104: 47-57.

WILLIAMS, A.G.; WIMPENNY, J.W.T. e LAWSON, C.J. (1979)
" Preliminary Studies on the Composition and Rheological Properties of the extracellular polysaccharide Synthesized by *Pseudomonas* PB1 (NCIB 11264)". *Biochimica et Biophysica Acta*. 585: 611-619.

B. ANEXO

Anexo 1 - Curva padrão de alginato de sódio. Absorbância a 490 nm
x concentração (g/l).



$$X \text{ (g/l)} = 1,57 * \text{ABS} - 0,0016$$

Anexo 2 - Regressões polinomiais para os tempos de fermentação de 5, 8, 11 e 15 horas.

Tempo 5 horas

VAR: RESP N: 20 MULTIPLE R: .778 SQUARED MULTIPLE R: .605
 ADJUSTED SQUARED MULTIPLE R: .422 STANDARD ERROR OF ESTIMATE: 6.879

VARIABLE	COEFFICIENT	STD ERROR	STD COEF	TOLERANCE	T	P(2 TAIL)
CONSTANT	-46.803	30.558	0.000	.	-1.532	0.150
CONC	61.021	24.923	7.577	0.003	2.448	0.029
TROS	43.017	24.923	5.341	0.003	1.726	0.108
CONC*						
CONC	-22.819	9.016	-17.421	0.001	-2.531	0.025
TROS*						
TROS	-16.266	9.016	-12.418	0.001	-1.804	0.094
TROS*						
TROS	1.770	0.993	7.113	0.002	1.782	0.098
CONC*						
CONC	2.393	0.993	9.618	0.002	2.410	0.031

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
REGRESSION	941.403	6	156.900	3.316	0.033
RESIDUAL	615.193	13	47.323		

Tempo 8 horas

RESP VAR: Y N: 20 MULTIPLE R: .904 SQUARED MULTIPLE R: .817
 ADJUSTED SQUARED MULTIPLE R: .783 STANDARD ERROR OF ESTIMATE: 5.411

VARIABLE	COEFFICIENT	STD ERROR	STD COEF	TOLERANCE	T	P(2 TAIL)
CONSTANT	98.681	8.041	0.000	.	12.273	0.000
CONC	-2.532	1.104	-0.245	1.000	-2.292	0.036
LITROS	-40.684	5.061	-3.939	0.048	-8.038	0.000
LITROS*						
LITROS	6.232	0.823	3.710	0.048	7.570	0.000

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
REGRESSION	2091.730	3	697.243	23.815	0.000
RESIDUAL	468.435	16	29.277		

Anexo 2 (continuação) - Regressões polinomiais para os tempos de fermentação de 5, 8, 11 e 15 horas.

Tempo 11 horas

VAR: RESP N: 20 MULTIPLE R: .906 SQUARED MULTIPLE R: (.821)
 ADJUSTED SQUARED MULTIPLE R: .774 STANDARD ERROR OF ESTIMATE: 3.186

VARIABLE	COEFFICIENT	STD ERROR	STD COEF	TOLERANCE	T	P(2 TAIL)
CONSTANT	0.991	9.333	0.000	.	0.106	0.917
CONC	57.806	11.449	9.699	0.003	5.049	0.000
CONC*						
CONC	-20.570	4.167	-21.219	0.001	-4.937	0.000
CONC*						
TROS	-0.458	0.213	-0.329	0.509	-2.153	0.048
CONC*						
CONC*						
CONC	2.109	0.460	11.455	0.002	4.587	0.000

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
REGRESSION	700.291	4	175.073	17.251	0.000
RESIDUAL	152.231	15	10.149		

Tempo 15 horas

DEP VAR: Y N: 20 MULTIPLE R: .923 SQUARED MULTIPLE R: (.852)
 ADJUSTED SQUARED MULTIPLE R: .799 STANDARD ERROR OF ESTIMATE: 1.850

VARIABLE	COEFFICIENT	STD ERROR	STD COEF	TOLERANCE	T	P(2 TAIL)
CONSTANT	11.141	7.483	0.000	.	1.489	0.159
CONC	14.650	2.776	3.991	0.019	5.277	0.000
LITROS	10.783	2.776	2.937	0.019	3.884	0.002
CONC*						
CONC	-2.218	0.321	-3.715	0.037	-6.905	0.000
LITROS*						
LITROS	-1.372	0.321	-2.298	0.037	-4.273	0.001
CONC*						
LITROS	-1.082	0.654	-1.263	0.018	-1.655	0.120

ANALYSIS OF VARIANCE

SOURCE	SUM-OF-SQUARES	DF	MEAN-SQUARE	F-RATIO	P
REGRESSION	275.509	5	55.102	16.094	0.000
RESIDUAL	47.931	14	3.424		