

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO
PRODUZIDO POR *Beijerinckia* sp ISOLADA DO SOLO
CULTIVADO COM CANA-DE-AÇÚCAR DA REGIÃO DE
RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO - BRASIL**

Claire Tondo Vendruscolo

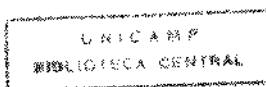
Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
Orientadora

*Este exemplar corresponde
a recopiar final da tese
defendida por Claire
Tondo Vendruscolo e
aprovada pela Comissão
Julgadora em 20.01.95*

Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
Título de Doutor em Ciência de Alimentos

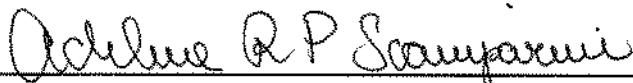
Adilma R P Scamparini

Campinas - 1995

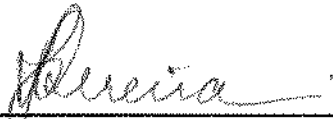


**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO
PRODUZIDO POR *Beijerinckia* sp ISOLADA DO SOLO
CULTIVADO COM CANA-DE-AÇÚCAR DA REGIÃO DE
RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO - BRASIL**

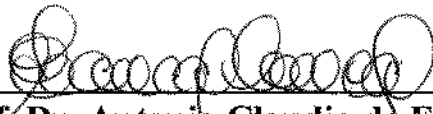
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
Orientador



Prof. Dr. José Luiz Pereira



Prof. Dr. Antônio Cláudio de França Corrêa



Dra. Sonia Couri



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho



Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore



Profa. Dra. Helia Harumi Sato

Dedico:

Aos meus amores João e Luisa

Ao meu pai e minha mãe

Aos meus irmãos A. Carlos, Beta e Clóvis

Aos meus cunhados Bia, Beth, Julia e Caren

AGRADECIMENTOS

A Deus, autor e doador da vida, pela perfeição de sua criação e pela fidelidade do Amor com que, incondicionalmente, tem nos amado. A Ele seja dada Honra e Glória.

A todos das minhas duas famílias Tondo e Vendruscolo que, com amor e amizade, me acompanharam no longo percurso de desenvolvimento deste trabalho.

A minha muito querida orientadora Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini, que soube suportar as incompatibilidades e contornar com sabedoria os problemas ao longo do percurso. Pela sua amizade e compreensão, minha gratidão.

Ao professor Dr. José Luiz Pereira, pelo carinho e dedicação com que auxiliou neste trabalho.

À UFPel e CAVG pela oportunidade que me proporcionaram de aumentar meus conhecimentos. Com agradecimento especial, aos meus colegas da área de Alimentos : Maria Erenilda S. P. Mello, Agapito Franco, Juan Berasain Moreira, Abrelino Carlos de Oliveira, Francisco Del Pino, Rosane Nardes e Iara Nora da Silva. E também a minha procuradora e amiga Elizabeth Del Ponte Santos.

A prof.^a Dr.^a Elisa Cléia Minioni, ao Dr. Ernest Poetsch e Dr. Sherman Leonad que foram meus incentivadores primeiros na área da pesquisa, meu carinho especial

O meu reconhecimento a minha terapeuta Edwige Rabello, por ter me mostrado que em uma situação por mais dolorosa que seja, pode-ser sentida de varias formas : chorar, rir e ainda aprender muito para o resto de nossas vidas; além de perceber que não é necessário ser perfeito para ser bom o bastante.

À UNICAMP, pelos recursos que proporcionaram o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro

Ao RHAE, pelo recurso concedido .

O meu agradecimento muito especial aos que colaboraram comigo nesta caminhada, aqui citados por ordem alfabética : DAWOOD, E. C, JACOBUSI, R., MACHADO, H. D., MARIUZZO, D. M., MAZIERO, G. C., MIA, N. T., MUNHOZ, M. P., POMPEU NETO, L. B., e VOLPATO, A. M.

Aos amigos e colegas também por ordem alfabética : Adilson, Adriana, Angela, Ana Paula, Cícera, Chico, Fábio , Franceli, Glauco ,Igor, Iriani, Ivani, Jardete, João , Luciana, Lucio, Luis, Marcela, Marcos, Mauro, Maria Onilda, Pricila, Rosa e Rose.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram o bom desenvolvimento deste trabalho, pessoas que aprendi a amar e que, por serem amigas, muito contribuíram para meu aperfeiçoamento pessoal e profissional, e hoje são parte da minha vida.

Que Deus abençoe a todos.

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos.....	
Índice.....	
Índice de Tabelas.....	
Índice de Figuras.....	
Resumo.....	
Summary.....	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. Introdução.....	5
3.2. Biopolímeros produzidos por microrganismos.....	6
3.3 Ocorrência de <i>Beijerinckia</i> no solo.....	13
3.4 Síntese do biopolímero.....	14
3.5 Cinética do processo fermentativo.....	15
3.6 Condições de produção de biopolímero.....	16
3.6.1 Influência de nutrientes.....	16
3.6.1.1 Na produção de células.....	17
3.6.1.2 Na produção de biopolímero.....	18
3.6.2 Influência do pH.....	19
3.6.3 Influência da temperatura.....	20
3.6.4 Influência da aeração.....	21
3.7 Meios utilizados na produção de biopolímero.....	23
3.7.1 Dextrana.....	23
3.7.2 Xantana.....	24
3.7.3 Curdulana.....	25
3.7.4 Zanflo.....	25
3.7.5 Gelana.....	25

3.7.6 Welana.....	26
3.7.7 Succinoglucana.....	26
3.7.8 "Glycocalys".....	26
3.7.9 Polissacarídeos produzidos por outras cepas de Pseudomonas.....	27
3.7.10 Biopolímero produzido por <i>Beijerinckia</i>	28
3.8 Composição dos biopolímeros.....	28
3.9 Métodos usados na determinação da composição de biopo- límero.....	33
3.10. Recuperação e purificação do biopolímero.....	35
3.11 Reologia.....	38
3.11.1 Medidas das propriedades reológicas.....	39
3.11.1.1 Viscosidade.....	39
3.11.1.2 Formação de gel.....	41
3.11.2 Fatores que influenciam as características reo- lógicas.....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
4.1 Materiais.....	48
4.1.1 Material permanente.....	48
4.1.2 Material de consumo.....	49
4.1.3 Microrganismo utilizado.....	49
4.1.4 Composição do meio de isolamento.....	50
4.1.5 Composição do meio de enriquecimento.....	50
4.1.6 Composição dos meios de produção de células.....	50
4.1.7 Composição do meio de produção de biopolímero	50
4.2 Métodos.....	53
4.2.1 Isolamento da bactéria.....	53

4.2.1.1 Isolamento das bactérias das da terra cultivada com cana-de-açúcar.....	53
4.2.1.2 Isolamento das bactérias do caldo de cana e água de lavagem de diferentes ponto da usina de açúcar e álcool.....	53
4.2.1.3 Isolamento das bactérias da cana de açúcar.....	54
4.2.2 Obtenção de cultura pura.....	54
4.2.3 Manutenção e propagação do microrganismo.....	55
4.2.4 Reativação das células.....	55
4.2.5 Seleção da bactéria.....	55
4.2.6 Identificação.....	56
4.3 Cinética de crescimento celular.....	56
4.3.1 Curva padrão de crescimento celular.....	56
4.3.2 Cinética do crescimento da cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i>	57
4.3.2.1 Determinação da quantidade de sacarose utilizada.....	57
4.3.2.2 Cinética do crescimento no Meio IV, contendo 2% de sacarose.....	59
4.4 Preparação do inóculo.....	60
4.5 Produção de biopolímero.....	60
4.5.1 Produção de biopolímero na fase de pré-seleção das linhagens.....	60
4.5.1.1 Influência do meio de fermentação.....	60
4.5.1.2 Influência do meio de produção de células.....	61
4.5.1.3 Influência do pH do meio de fermentação na produção do biopolímero.....	61
4.5.1.4 Influência da concentração e tipo de açúcar...	61
4.5.1.5 Influência da temperatura.....	62
4.5.1.6 Influência do volume de meio.....	65
4.5.1.7 Influência do volume de células no meio de produção de biopolímero.....	65
4.6 Recuperação do biopolímero.....	66

4.6.1 Recuperação do biopolímero natural.....	66
4.6.2 Recuperação do biopolímero desacetilado.....	66
4.7 Determinação dos constituintes do biopolímero.....	66
4.7.1 Purificação do biopolímero.....	66
4.7.2 Hidrólise total do biopolímero.....	67
4.7.3 Identificação dos produtos da hidrólise.....	
total do biopolímero.....	67
4.8 Comportamento reológico de solução de biopolímero.....	68
4.8.1 Viscosidade do caldo de fermentação.....	68
4.8.2 Viscosidade aparente de soluções aquosas.....	68
4.8.3 Curvas reológicas de soluções aquosa.....	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1 Identificação do microrganismo.....	70
5.2 Cinética de crescimento celular.....	74
5.3 Seleção do microrganismo.....	78
5.4 Determinação dos parâmetros de produção de biopolímero pelas cepas 7070 e 9102AA'.....	79
5.4.1 Influência do meio de fermentação.....	80
5.4.2 Influência do meio de produção de células.....	81
5.4.3 Efeito do pH na produção de biopolímer pelas cepas 7070 de <i>Beijerinckia</i>	82
5.4.4 Influência da concentração e tipo de açúcar.....	85
5.4.5 Influência do volume de meio.....	86
5.4.6 Influência da temperatura de fermentação.....	87
5.4.7 Influência da quantidade de células no meio de produção de biopolímero	97
5.5 Determinação dos constituintes do biopolímero B-27.....	98

5.6 Reologia de soluções aquosas do biopolímero.....	
produzido pela cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp.....	99
5.6.1 Viscosidade.....	99

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Dependência de G' (---), G'' (-.-) e η^* (___) com a frequência (ω) para a) um gel forte 2% de agar ; b) uma solução concentrada 5% p/v de carragena ; c) uma solução diluída 5% p/v de dextrana.	44
Figura 2. Fluxograma da produção de células da cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp, no Meio IV, contendo 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8;0,9; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 % de sacarose..	58
Figura 3. Fluxograma adotado na produção de células da cepa de 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp, no meio IV, contendo 2% de sacarose.	59
Figura 4. Fluxograma adotado na produção do biopolímero com a cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp, a partir de glicose nas temperaturas de fermentação 15, 20, 24, 27 e 30° C.....	63
Figura 5. Fluxograma adotado na produção do biopolímero com a cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp, a partir de sacarose nas temperaturas de fermentação de 15, 20, 24, 27 e 30° C.....	64
Figura 6. Colônias da cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp	73
Figura 7. Colônias da cepa 9102AA' <i>Beijerinckia</i> sp	73

Figura 8. Quantidade de células secas (g/l) obtidas nas concentrações de sacarose de 0,1 a 5,0% no meio III de produção de células com a cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp	75
Figura 9. Curva Padrão de Crescimento Celular de <i>Beijerinckia</i> cepa 7070	76
Figura 10. Cinética do crescimento da cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp	77
Figura 11. Quantidade de biopolímero obtido pela cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> em meio VIII, contendo sacarose 50 g/l fermentada por 96 horas a 27 C e 200 rpm em pH de 5,8 a 7,0.	84
Figura 12. Quantidade em (g/l) de biopolímero obtido com a cepa 7070 com o meio VIII, contendo glicose ou sacarose, fermentada nas temperaturas 15, 20, 24, 27 e 30° C.	90
Figura 13. Quantidade de biopolímero (g/l) e pH obtidos no final das fermentações em meio VIII com a cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp, nas temperaturas de 15, 20, 24, 27 e 30°C.	92
Figura 14. Quantidade de biopolímero (g/l) e quantidade de células secas (g/l) obtidas as fermentações em meio VIII com a cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> , nas temperaturas de 15,20,24 e 30° C.	93
Figura 15. Viscosidade aparente (cP) do caldo de fermentação , das fermentações em meio VIII com a cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp, nas temperaturas 15, 20, 24, 27 e 30 °C	94

Figura 16. Quantidade de biopolímero (g/l) e açúcar residual (g/l) obtidos nas fermentações em meio VIII com a cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> , nas temperaturas de 15, 20 24,27 e 30° C	96
Figura 17. Cromatograma.....	98
Figura 18. Comportamento reológico de soluções a 6% de biopolímero obtido nas fermentações em meio VIII, contendo glicose a 15,20, 24, 27 e 30 °C, determinado em reômetro Haake a 25° C	100
Figura 19 Viscosidade vs. Taxa de Deformação da solução aquosa com 6% de biopolímero obtidos nas fermentações a 15, 20, 24, 27 e 30 °C e meio VIII, contendo licose. As curvas foram determinadas em reômetro Haake a 25°C	101
Figura 20 Comportamento reológico de soluções a 6% de biopolímero obtido nas fermentações em meio VIII, contendo sacarose a 15, 20,24, 27 e 30 C, determinado em reômetro Haake a 25 °C.	102
Figura 21 Viscosidade vs. Taxa de eformação de solução aquosa de biopolímeros obtidos nas fermentações a 15,20,24,27 e 30 ° C em meio VIII, contendo sacarose. As curvas foram determinadas em reômetro Haake a 25 °C.	103
Figura 22 Comportamento reológico de soluções a 6% de biopolímero obtidos na fermentação em meio VIII com sacarose a 27 C, determinado em reômetro Haake a 25, 45 e 65 C.	105
Figura 23 Viscosidade vs. Taxa de Deformação da solução aquosa a 6% do biopolímero B-27. As curvas foram obtidas em reômetro Haake 25, 45 e 65 C.	106

Figura 24	Efeito do tratamento térmico no comportamento reológico de soluções aquosas, contendo 6% de biopolímero B-27 a pH 7, determinado em reômetro Haake a 25 e 65 C.	108
Figura 25	Viscosidade vs. Taxa e Deformação da solução aquosa de biopolímero B-27 a 6%, submetidas ou não ao tratamento térmico. As curvas foram obtidas nas determinações com reômetro Haake a 25 e 65 °C.	109
Figura 26	Comportamento reológico das soluções de 1% de biopolímero B-27 em pH 3.0, 7.0 e 11, determinado em reômetro Brookfield V, spindle SC4-31 a 25 C.	112
Figura 27	Comportamento reológico de soluções aquosas a 3% de biopolímero B-27 a pH 3.0, 7.0 e 11, determinado em reômetro Brookfield LV, spindle SC4-31.	113
Figura 28	Viscosidade das soluções aquosas a 1% do biopolímero B-27 a pH 3 com 0.5 ou 1 % de CaCl ₂ e 1% de KCl ou sem sais a pH 7 com 1% CaCl ₂ .	114
Figura 29	Espectro mecânico da solução aquosa com 6% de biopolímero B-27, determinado no VILASTIC a 0 C.	116
Figura 30	Espectro mecânico da solução aquosa com 6% de biopolímero B-27 e 30 % de sacarose, determinado no VILASTIC a 0 C.	117
Figura 31	Espectro mecânico da solução aquosa com 1% de gelrite, determinado no VILASTIC a 0 C.	118
Figura 32	Espectro mecânico da solução aquosa com 3% de biopolímero B-27 e 1% de goma guar, determinado no VILASTIC a 0 C.	119

Figura 33 Espectro mecânico da solução aquosa a 6% de biopolímero B-27, contendo 50 mM de CaCl₂, determinado no VILASTIC a 0 C.

.....120

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 1 Composição de heteropolissacarídeos.....	32
Tabela 2 Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas da <i>Beijerinckia</i> sp, cepas 7070 e 9102AA'.....	70, 71, 72
Tabela 3 Quantidade e qualidade dos biopolímeros produzidos pelas cepas das bactérias denominadas 1175, 4341 4343, 7021-7070 e 9102-910.....	78
Tabela 4 Quantidade de biopolímero produzido pelas cepas 1175A, 4342, 7070 e 9102AA' nos meios VI, VII, VIII, IX, X e XI.....	80, 81
Tabela 5 Quantidade de biopolímero produzidos pela cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp nos meios VII e VIII de produção de biopolímero, combinados com os meios III e IV de produção de células,e viscosidade aparente de suas soluções a 1%.....	82
Tabela 6 Efeito da temperatura de fermentação no processo descontínuo de produção de biopolímero pela cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp com meio VIII, contendo 5% de glicose, 96 horas a 200 rpm e a pH inicial de 6,5.....	87
Tabela 7 Efeito da temperatura de fermentação no processo descontínuo de produção de biopolímero pela cepa 7070 de <i>Beijerinckia</i> sp, com meio VIII, contendo 5% de sacarose, 96 horas a 200 rpm e a pH inicial de 6,5.....	88

RESUMO

Foram isolados e selecionados dois microrganismos do solo cultivado com cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto no Estado de São Paulo, que posteriormente foram identificados como *Beijerinckia* sp, cujas cepas foram denominadas 7070 e 9102AA'. Para determinação do crescimento celular da cepa 7070 foram utilizadas concentrações de sacarose de 0.1 a 5.0 % em meio YM. O melhor resultado foi obtido no meio contendo 1 % de sacarose. A cinética do crescimento celular da cepa 7070, foi determinada, em erlenmeyer de 500 ml, com 50 ml de meio IV, contendo 1 % de sacarose a 27 °C por 54 horas a 100 rpm. Esta cepa de *Beijerinckia* sp apresentou uma fase logarítmica de 18 horas. As cepas 7070 e 9102AA' produziram biopolímero extracelular no seguinte meio (g/l): K₂HPO₄ 2,0 ; MgSO₄ 7 H₂O 2,7 ; KH₂PO₄ 13, 62; extrato de levedura 0,2; triptose 2,0 e glicose ou sacarose 20 ou 50, em pH 6.5 e nas seguintes condições : 96 horas, 200 rpm e temperaturas de 15, 20, 24, 27 e 30 °C. O maior rendimento foi obtido em meio contendo 50 g/l de sacarose com fermentação por 96 horas, 20 °C e 200 rpm, onde se obteve 17,02 g/l de biopolímero. O biopolímero denominado B-27 produzido pela cepa 7070 no meio contendo 5% de sacarose a 27 °C por 96 horas e 200 rpm apresentou a seguinte composição: glicose, galactose, manose, ácido galacturônico e ácido glucurônico. As soluções aquosas a 1%, 3% e 6% do biopolímero B-27 apresentaram, respectivamente :160 , 5700 e 78000 cP de viscosidade aparente , a 25°C, para taxa de deformação de 0,3 s⁻¹. As análises de viscoelasticidade mostraram que na temperatura de 0°C a associação de soluções aquosas de 3% de biopolímero B-27 com 0,6% de goma guar e a associação de 6 % de biopolímero com 50 mM de CaCl₂, formam gel. As soluções aquosas de 6 % de biopolímero e soluções com 6% de biopolímero com 30% de sacarose não formaram gel. A adição de CaCl₂ a 0,5 e 1,0 %, em soluções aquosas de 1,0 % do biopolímero B27 em pH 3,0 aumentou a viscosidade, enquanto que não houve modificação em pH 7,0. O biopolímero produzido pela cepa 7070 se mostrou estável ao pH na faixa de 2,5 a 12,5 e no aquecimento até 100 °C. Avaliações realizadas após um ano mostraram que soluções do biopolímero são estáveis ao tempo.

SUMMARY

Two microorganisms were isolated and selected from a sugar cane plantation from the North-East region of the São Paulo. They were identified as *Beijerinckia sp.*, strains 7070 and 9102AA'. Sucrose solutions at concentrations from 0.1 to 5.0% in Yeast Malt medium were used to determine cellular growth of the 7070 strain. The 1% sucrose medium showed the best result. The culture kinetic behavior of this strain was determined in a 1% sucrose medium, the optimal growth was obtained, at 27°C and 100 r.p.m. for 54 h. The logarithmic phase was completed at 18 h. The 7070 and 9102AA' strains produced extracellular biopolymers in the following medium (g/l): K₂HPO₄, 2.0; MgSO₄·7H₂O, 2.7; KH₂PO₄ 13.62; yeast extract, 0.2; tryptose, 2.0 and glucose or sucrose 20 or 50; pH 6.5. The fermentation conditions were 96 h, 200 r.p.m. at 15, 20, 24, 27 and 30°C. The larger yield of biopolymer was obtained from the medium containing 50 g/l sucrose, at 20°C, 200 r.p.m. during 96h. Under these conditions 17.02 g/l of biopolymer were obtained. Study of the composition of the B-27 biopolymer produced by the 7070 strain (5% sucrose, 27°C, 200 r.p.m., 96 h) revealed the presence of glucose, galactose, manose, galacturonic and glucuronic acids. B-27 aqueous solutions at 1, 3 and 6% concentration, had their apparent viscosity measured at 25°C and shear rate 0.3 s⁻¹. The results were 160, 5.700 and 78.000 cP, respectively. Viscoelasticity analyses at 0°C to 3% B-27 aqueous solution plus 0.6% guar gum and of 6% B-27 aqueous solution plus 50 mM CaCl₂, showed that both can form a gel. The CaCl₂ (0.5% and 1.0%) added to a 1% B-27 aqueous solution increased the solution's viscosity at pH 3 and did not affect the viscosity at pH 7. The 7070 strain biopolymer showed good stability in a wide range, of 2.5 to 12.5 pH and under heating up to 100°C. Tests performed after one year showed that the biopolymer solutions are stable during that time.

1. INTRODUÇÃO

Polissacarídeos de origem microbiana, também chamados de biopolímeros, geralmente são produtos capazes de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações. Segundo STADING (1988) não existe outra categoria de substâncias que exiba esse comportamento.

Devido, fundamentalmente, a essa propriedade singular, os biopolímeros têm sido, atualmente, objeto de intensa pesquisa, tendo em vista o seu alto potencial de aplicação em vários segmentos industriais.

Na indústria de alimentos, os biopolímeros encontram um vasto campo de aplicação como agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes e emulsificantes, e vêm substituindo progressivamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais como plantas e animais. De acordo com SANDERSON (1990) essa tendência se deve, em parte, às incertezas no suprimento do mercado mundial de polissacarídeos de fontes naturais, os quais são vulneráveis aos fenômenos que ocorrem na natureza e à instabilidade política das regiões produtoras, provocando escassez e alta de preços.

SUTHERLAND (1983) e MORRIS (1987 e 1992) também afirmam que as maiores vantagens dos biopolímeros sobre os produtos em uso, obtidos de plantas e animais, são as propriedades físico-químicas reprodutíveis, além de custo e de suprimento estáveis.

Para FENANTES (1985) a preferência por biopolímeros se deve às suas propriedades e características funcionais, somadas às vantagens da sua produção ser independente de condições climáticas, permitindo que sejam obtidos em condições controladas e em lotes homogêneos com qualidade assegurada. O autor afirma que a razão disso é a especificidade da biossíntese dos microrganismos, os quais permitem ainda modificações genéticas, visando a obter polissacarídeos com propriedades específicas.

A potencialidade do uso de biopolímeros na moderna indústria de alimentos é um consenso na literatura existente. Diversos autores, entre eles SANDERSON (1981 e 1990), RINAUDO (1993), MISAKI (1993); MARIUZZO et alii (1993) e SCAMPARINI (1993) concordam que, devido às suas propriedades funcionais versáteis, os biopolímeros podem se tornar uma ferramenta poderosa para se criarem novas texturas e, conseqüentemente, permitir a criação de novos e diferenciados produtos.

Além da possibilidade dos biopolímeros substituírem e imitarem a textura dos polissacarídeos clássicos, agindo em baixas concentrações, observa-se atualmente um grande avanço nas pesquisas sobre sinergismo, onde polissacarídeos convencionais são associados a biopolímeros visando a intensificar as propriedades funcionais (NISHINARI & DOI, 1993).

WELL, citado por SANDFORD (1979), estimou o consumo mundial de polissacarídeos, excetuando os amiláceos, em 150 milhões de libras (68 mil toneladas), em 1973. De acordo com o mesmo autor, o consumo geral de polissacarídeos vinha crescendo a uma taxa de 2% ao ano, enquanto que essa taxa, para os polissacarídeos microbianos, era de 8% ao ano, devido principalmente ao crescimento da utilização da goma xantana na indústria de petróleo.

O Brasil é um tradicional importador de polissacarídeos para uso industrial, com exceção dos amiláceos, e segue a tendência mundial, na qual os biopolímeros vêm crescendo no total das importações. Uma amostra disso é dada pela CACEX, segundo a qual, no período 84/86, a importação de goma xantana evoluiu de 29,9 toneladas para 132,6 toneladas.

Apesar das amplas possibilidades do uso de biopolímeros em alimentos, os mercados de consumo mais importantes para polissacarídeos são as indústrias de petróleo, de mineração, têxtil e termoquímica, de tintas de impressão, de papel, cosmética, farmacêutica, e de produtos agropecuários, onde além de serem utilizados como formadores de gel, espessantes e agentes de suspensão, são utilizados, também, por suas propriedades flocculantes, adesivas, formadoras de filmes, lubrificantes e redutoras de fricção. Observa-se nesses setores uma contínua substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana (SANDFORD et alii, 1984; LOPEZ et alii, 1991 e SCAMPARINI et alii, 1992).

Entretanto, a obtenção de biopolímeros para consumo humano é uma tarefa mais complexa do que para a utilização em outros produtos, uma vez que estes devem ser considerados seguros do ponto de vista alimentar e, portanto, satisfazer os severos códigos e legislações alimentares, atualmente em vigor. Uma amostra disso é que, apesar de a pesquisa em biopolímeros ter sido iniciada há mais de três décadas, até agora apenas dois biopolímeros foram aprovados para uso alimentar nos EUA: xantana e gelana.

Selecionar variedades de microrganismos que produzam polissacarídeos em quantidade e com propriedades economicamente interessantes é um desafio que vem sendo enfrentado por vários grupos de pesquisa, envolvendo universidades e o segmento industrial, principalmente nos países economicamente desenvolvidos, como EUA, Japão, Canadá e França.

Embora essa área de pesquisa tenha avançado muito nos últimos tempos, é fato reconhecido que apenas poucos microrganismos foram estudados completamente dentre a vasta gama de microrganismos produtores de biopolímeros, onde os fungos e bactérias são os mais promissores.

Uma amostra da complexidade dos fatores que interferem na seleção de microrganismos viáveis de produzir polissacarídeos é a constatação de que, dos muitos microrganismos que crescem em meio sólido produzindo colônias gomosas, somente uma fração destas colônias produzem polissacarídeo extracelular em cultura líquida, e destas, são poucas as que convertem o substrato de cultivo em quantidades de polissacarídeos economicamente viáveis. Ademais, é preciso levar em consideração se o biopolímero é hidrossolúvel e apresenta propriedades funcionais de interesse comercial.

Os biopolímeros sintetizados por bactérias são divididos em três grupos, segundo sua localização morfológica: intracelular, integrante da parede celular e extracelular. A pesquisa visando à aplicação industrial, de modo geral, está concentrada nos polissacarídeos extracelulares, pois resultam em processos de extração e purificação mais simples, além de possibilitarem produtividade mais elevada. Bactérias Gram-negativas também têm sido reputadas como as de maior aptidão para o processo. É obvio que os biopolímeros de maior viabilidade industrial para uso alimentar são os produzidos por bactérias não-patogênicas.

2. OBJETIVOS e JUSTIFICATIVA

O principal objetivo do trabalho foi selecionar do ambiente de uma indústria processadora de cana-de-açúcar uma bactéria Gram-negativa, com alto potencial de produção de biopolímero e com propriedades funcionais de interesse comercial. Os objetivos específicos foram:

- Isolar e selecionar, bactérias Gram-negativas, bastonetes, não patogênicas produtoras, de biopolímero extracelular, em meio líquido;

- Identificar a bactéria com o mais alto potencial de produção de biopolímero de alta qualidade;

- Determinar a cinética de crescimento celular da bactéria em estudo;

- Determinar os parâmetros de produção: meio de produção de células, meio de produção de biopolímero, concentração e tipo de açúcar, pH e temperatura;

- Determinar o comportamento reológico de soluções aquosas do biopolímero obtido.

Como justificativa para o presente trabalho, pode-se afirmar que bactérias promissoras quanto à produção industrial de biopolímeros, como as dos gêneros *Xanthomonas*, *Pseudomonas* e *Beijerinckia*, são abundantes na microflora do Brasil, ao contrário da microflora da maioria dos países com pesquisa avançada nessa área. Essa é uma razão suficiente para que se pesquise linhagens desses microrganismos, visando a conhecer sua produtividade, propriedades do polímero sintetizado e sua potencialidade de aplicação industrial.

Outra importante razão é a riqueza de matérias primas de que o país dispõe, como o açúcar de cana, componente representativo do meio de produção, bem como o álcool etílico, produto largamente utilizado na recuperação de biopolímeros. O Brasil é o maior produtor de açúcar de cana e álcool etílico do mundo (FAO, 1990). Esses fatores podem tornar possível a produção de biopolímeros a um custo altamente competitivo no mercado internacional.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Introdução

Dentre os microrganismos que produzem biopolímeros, os que podem render quantidades economicamente aproveitáveis são escassos. Entretanto, para uma dada espécie, a produtividade pode ser aumentada pela modificação de cultivo, pela variação na quantidade e tipo de nutriente, temperatura, pH e outras condições (WILKINSON, 1958).

Várias espécies de fungos e leveduras produzem polissacarídeos extracelulares; no entanto, os produtos poliméricos de bactérias não-patogênicas são os que têm maior viabilidade industrial e comercial. Até o momento, nenhum polissacarídeo de natureza bacteriana foi produzido no Brasil em nível industrial. Entretanto, já foram realizadas pesquisas no Departamento de Ciência de Alimentos da FEA - Universidade Estadual de Campinas, envolvendo a seleção de linhagens de *Xanthomonas*, produção e determinação da estrutura da goma xantana. No Departamento de Engenharia de Alimentos da FEA, foram realizadas pesquisas sobre a produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRI B-512(F), onde foram estudados meios alternativos de produção. Foi também desenvolvido um projeto de produção de dextrana-sacarase, com o objetivo de extrair e purificar dextrana-sacarase para ser aplicada na síntese de dextrana. Ainda na Universidade Estadual de Campinas, no Departamento de Genética do Instituto de Biologia, estão sendo feitas modificações genéticas das linhagens selecionadas visando a melhorar o rendimento no processo de produção de polissacarídeos (SCAMPARINI e ROSATO, 1987; MAUGERI FILHO, 1988; SCAMPARINI, 1991; SCAMPARINI et alii 1992 e 1992a; SCAMPARINI 1993; VENDRUSCOLO et alii, 1993 e ROSATO et alii, 1994).

3.2 Biopolímeros produzidos por microrganismos¹

Pesquisas iniciadas em 1945, nos E.U.A., e concluídas na década de 60, com o propósito de conseguir linhagens que produzissem maior quantidade de dextrana, terminaram encontrando novas bactérias produtoras de biopolímeros. Posteriormente, com o objetivo específico de reduzir custos, os rumos da pesquisa nessa área visavam à substituição de biopolímeros originários de plantas por biopolímeros microbianos. Atualmente, estão sendo obtidos biopolímeros com características específicas e únicas, que garantem um grande espaço nas aplicações industriais. Diferentes aplicações requerem diferentes propriedades, e como as propriedades estão relacionadas ao tipo de biopolímero, impõe-se a necessidade de se pesquisarem cada vez mais novos biopolímeros.

Dextrana

A dextrana foi o primeiro polissacarídeo de origem bacteriana a ser produzido em escala industrial. Sua produção em larga escala teve início na Suécia, 1942 a 1944, na Inglaterra em 1947 e nos E.U.A. em 1949. É largamente utilizada na indústria farmacêutica, tendo seu uso já consagrado com fins clínicos, porém o seu potencial de aplicação se estende às indústrias química, petroquímica, fotográfica e de alimentos.

As aplicações da dextrana dependem principalmente do seu peso molecular. Quando este é superior a 25 milhões de daltons, pode ser utilizada na extração de petróleo, como agente de impermeabilização, em lamas de perfuração ou, ainda, na recuperação do petróleo. A dextrana de peso molecular médio é usada na indústria de alimentos, como agente modificador de textura, gelificante e estabilizante; na indústria farmacêutica, como substância de encapsulação e vetor de medicamentos e, na indústria química, pode ser usada na fabricação de peneira molecular utilizada no isolamento e purificação de produtos biológicos, tais como enzimas. A dextrana de peso molecular baixo, quando em solução aquosa, apresenta propriedades

¹A revisão bibliográfica deste trabalho limitou-se aos polímeros extracelulares produzidos por bactérias Gram-negativas.

semelhantes à do plasma sanguíneo; por essa razão, é usada há mais de trinta anos como substituto do plasma sanguíneo.

Estudos de obtenção de Dextrana-sacarase por fermentações tipo batelada e batelada alimentada, fermentações contínuas, e de separação da dextrana pelo método tradicional com uso de álcool ou pelo método mais atual, separação em fase líquida com uso de polietilenoglicol, tem sido realizados por QUEIRÓZ (1987) e VILOCHE-BAZÁN (1994).

Xantana

A xantana foi o segundo polissacarídeo microbiano usado na indústria de alimentos, como espessante, emulsificante, estabilizante e agente de suspensão, aprovado pelo FDA (Food and Drugs Administration) desde 1969. A estabilidade de suas soluções à temperatura permite o uso em processos em que são necessários congelamentos e descongelamentos. Seu uso foi aprovado no Canadá, Dinamarca e Nova Zelândia (SANDFORD, 1979).

No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto lei N^o 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (ABIA, 1965). As concentrações permitidas nos diferentes tipos de alimentos estão especificadas na Tabela de Aditivos Intencionais (ABIA, 1992)).

Dentre os usos da xantana, destaca-se a aplicação em lamas de perfuração de poços de petróleo. Este polímero tem sido considerado adequado para esse uso devido à estabilidade de suas soluções em larga faixa de pH e temperatura, estabilidade a íons mono e divalentes, e ao comportamento pseudoplástico de suas soluções. Esta última característica do comportamento de suas soluções facilita operações de bombeamento (WELLS, 1977). Outra utilização nesta área é a de recuperação melhorada de petróleo (SANDVIK & MAERKER, 1977).

Na agropecuária, é utilizada como agente de suspensão de vitaminas e minerais para suplementos líquidos na alimentação de animais, e especificamente para suspender proteínas nos substituintes de leite para bezerros (BETZ, 1979). As propriedades reológicas das soluções da goma xantana aumentam a capacidade de dispersão das suspensões de fungicidas, herbicidas e inseticidas, e também a capacidade de aderência à vegetação (COTTRELL, 1979). Ainda no campo industrial, é utilizada como espessante

em pastas de impressão na indústria têxtil e também na formulação de explosivos (SANDFORD, 1979).

A xantana é também usada como agente estabilizante em diversos produtos cosméticos e farmacêuticos, por não apresentar efeitos tóxicos, não induzir a reações alérgicas e, ainda, por sua compatibilidade com sais minerais (COTTRELL, 1980).

Curdulana

O polissacarídeo extracelular curdulana, isolado por HARADA (1965), é produzido por uma bactéria do solo, *Alcaligenes faecalis*, var. *mixogenes*. O uso deste biopolímero não é permitido nos EUA, porém é extensamente usado no Japão em diversos alimentos processados. Esse polissacarídeo forma géis opacos, que são irreversíveis e não são afetados pelo resfriamento, aquecimento ou congelamento. Tem capacidade de formar gel em uma ampla faixa de pH, sem apresentar sinerese (MAEDA et alii 1967, HARADA, 1979 e HARADA et alii 1986).

De acordo com SLODKI & CADMUS (1979), a curdulana é utilizada como gelificante em ração animal, como ligante em tabaco e como agente imobilizador de enzimas.

MIWA et alii (1993) mostraram que a curdulana tem duas categorias de aplicação : uma como aditivo para melhorar o efeito de qualidade; a outra como ingrediente essencial de alimentos nos quais se utiliza a característica de não-fusão de seu gel mesmo quando aquecido acima de 100 °C.

Alginato bacteriano

É um polissacarídeo extracelular isolado da bactéria Gram negativa, *Azotobacter vinelandii*. A séria limitação para produção desse alginato é que esta bactéria produz a enzima "algin lyase", que causa a degradação do polissacarídeo, resultando na perda de viscosidade da solução. A adição de enzimas proteolíticas no meio de cultura pode prevenir a perda de viscosidade durante a produção (DEAVIN et alii 1977).

Esse alginato tem propriedades similares ao alginato de algas e forma gel na presença de cálcio (SUTHERLAND, 1982 e 1983).

Zanflo

Zanflo é um polissacarídeo extracelular produzido por uma bactéria Gram negativa, isolada pelo programa de "screening", efetuado pela empresa Kelco Co. , EUA. Mesmo esse polissacarídeo formando soluções de maior viscosidade que a xantana e sendo compatível com cátions, suas aplicações em alimentos ainda não foi permitida, tendo sido utilizado, até o momento, como espessante em tintas látex (SANDFORD, 1982).

Gelana

A gelana é um polissacarídeo extracelular produzido pela bactéria Gram negativa, *Pseudomonas elodea*, isolada do tecido da planta Elodea, na Pennsylvania, EUA (KANG et alii 1982). Segundo SANDERSON & CLARK, (1983); MORRIS (1990) e CARROLL et alii (1983) este biopolímero é o único "agente gelificante universal microbiano" produzido até o presente momento . Foi aprovado pelo FDA em 1990, para uso limitado a alguns tipos de alimentos, como geléias, coberturas para tortas e frutas, congelados, "fondant" e "marshmallow" (SANDERSON, 1990). Os géis obtidos com gelana são firmes, transparentes e brilhantes.

Welana

A welana, produzida por *Alcaligenes sp*, é um polissacarídeo extracelular, cujas soluções aquosas são altamente viscosas e estáveis a temperaturas superiores a 150 °C (KANG et alii, 1983). É empregada como agente de suspensão e na manutenção de fluidos de perfuração na prospecção de poços de petróleo e na mineração (CRESCENZI et alii, 1986; KIRIAKI & TAKO, 1990 e MASAKUNI & MASAHIRO, 1990).

Succinoglucanas

Succinoglucanas é o nome genérico de um grupo de polissacarídeos produzidos por *Pseudomonas sp*, que atualmente vêm sendo produzidos pela

empresa comercial Shell Co. , Inglaterra, para utilização na recuperação de petróleo (DUSSAP et alii, 1991 e PONS et alii, 1989).

Biopolímero produzido por *Pseudomonas* sp 11264

Pseudomonas sp 11264, isolada de efluentes ricos em carboidratos, produz um biopolímero com propriedades gelificantes. A viscosidade das soluções deste biopolímero é dependente da temperatura (WILLIAMS et alii, 1979).

Biopolímero produzido por *Pseudomonas atlantica*

Pseudomonas atlantica produz um polissacarídeo extracelular denominado "glycocalyx". Sua maior produção ocorre na fase estacionária, quando a célula mostra-se na energia metabólica máxima (UHLINGER & WHITE, 1983).

Biopolímeros produzidos por *Pseudomonas* sp NCMB 2021

Pseudomonas sp linhagem NCMB 2021, bactéria encontrada na água do mar, é capaz de produzir biopolímero extracelular em duas fases: na fase exponencial de crescimento, produz um biopolímero que forma soluções muito viscosas em água, forma gel reversível em concentrações elevadas, precipita com cátions multivalentes e, no final da fase exponencial e na fase estacionária, produz outro biopolímero que, mesmo em altas concentrações forma soluções aquosas com baixa viscosidade (CHRISTENSEN, et alii 1985).

Biopolímero produzido por *Pseudomonas* sp EPS-5028

O biopolímero sintetizado por *Pseudomonas* sp EPS-5028, forma soluções viscosas, em concentrações de 1% em água deionizada. Esse polissacarídeo pode ser produzido usando-se várias fontes de carbono, tais

como galactose, glicose, sacarose e lactose, sendo que o rendimento depende da fonte de carbono utilizada (CONGREGADO et alii , 1985).

Biopolímero produzido por *Pseudomonas sp* GSP-910

MANRESA et alii (1987) estudaram a produção de um biopolímero extracelular por *Pseudomonas sp* GSP-910, isolada do solo. Este biopolímero forma soluções altamente viscosas em baixas concentrações, estáveis na faixa de temperatura de 25 a 45 °C e na faixa de pH de 2 a 12, na presença de sais monovalentes. Na presença de cátions divalentes, como Ca⁺⁺, as soluções contendo 1% deste polissacarídeo gelificaram. Os autores sugeriram as mesmas aplicações da xantana para este biopolímero.

Os cinco últimos biopolímeros produzidos por *Pseudomonas*, ainda não tiveram o potencial de uso considerado.

Biopolímeros produzidos por *Beijerinckia*

Somente quatro espécies de *Beijerinckia* foram identificadas até hoje: *Beijerinckia indica* (DERX, 1950); *Beijerinckia mobilis* (DERX, 1950a) *Beijerinckia fluminensis* (DOBEREINER & RUSCHEL, 1958) e *Beijerinckia derxii* (TCHAN, 1956). O gênero *Beijerinckia*, aparentemente parece estar distribuído somente em solos tropicais e, em menor, quantidade em solos subtropicais.

A obtenção do polissacarídeo extracelular produzido pela bactéria *Beijerinckia indica*, linhagem Hawaii-2, foi estudada pela primeira vez por LOPEZ & BACKING em 1968, nos Países Baixos. Os resultados apresentaram dados de produção para o meio líquido utilizado e composição do polissacarídeo.

HAUG & LARSEN, (1970) estudaram a composição do polissacarídeo extracelular obtido por *Beijerinckia indica* em meio líquido. A determinação dos grupos acetil foi feita de acordo com KUNZ & HUDSON. Para análise do grau de acetilação, o biopolímero foi hidrolisado 5 horas com ácido sulfúrico 2N a 100 °C. Os constituintes do biopolímero, glucose e ácidos urônicos,

foram determinados por cromatografia em papel. A presença do ácido gulurônico foi confirmada por reação de carbazol.

COOKE & PERCIVAL (1975) investigaram a estrutura do polissacarídeo extracelular produzido por *Beijerinckia mobilis*, esta considerada uma variante da *Beijerinckia indica*. Após a remoção dos contaminantes protéicos, o polissacarídeo foi separado em polissacarídeo neutro e polissacarídeo ácido. A fração neutra continha glicose, arabinose e ramnose. O polissacarídeo ácido continha ácido glucurônico, glicose, ácido acético e ácido pirúvico.

BECKING (1974) estudou as características morfológicas, a formação das substâncias de reservas e os aspectos ecológicos de distribuição de *Beijerinckia*. Seu trabalho relatou a quantidade de polissacarídeo obtido no meio líquido utilizado e sua composição. Esse trabalho é o único apresentado no Manual de Bergey, sobre *Beijerinckia derxii*.

O polissacarídeo extracelular, denominado PS-7, produzido por *Beijerinckia indica* (*Azobacter indicum*), descoberto por KANG & McNEELY, (1976 e 1977), U.S patente 3.960.832, embora forme soluções com viscosidade e estabilidade à temperatura, superiores às soluções de xantana, e com capacidade de formar gel na presença de cátions ou íons polivalentes, teve seu uso sugerido somente para tintas (SUTHERLAND, 1983). Segundo SANDFORD (1979), esse polissacarídeo foi desenvolvido pela empresa comercial Kelco Co.; porém, sua utilização só é recomendada para uso em lamas de perfuração para poços de petróleo. Apesar dos testes realizados para determinar a eficiência como agente de suspensão terem demonstrado que este polímero é o melhor agente de suspensão já testado, outros potenciais de aplicação foram sugeridos, como adesivos para sementes, para tintas de base aquosa e para aumento da recuperação do óleo em sistemas inundados de água.

No Brasil, extensos trabalhos com bactérias do gênero *Beijerinckia* foram realizados por DOBEREINER (1955, 1958, 1959a, 1959b, 1965 e 1976) sempre relacionados com sua capacidade de fixar nitrogênio; porém nenhum destes trabalhos teve como objetivo verificar a capacidade de estas bactérias produzirem polissacarídeo extracelular.

3.3 Ocorrência de *Beijerinckia* no solo

Os estudos sobre *Beijerinckia*, como bactéria fixadora de nitrogênio, foram realizados em várias partes do mundo, nas décadas de 50 até 70. DERX (1950) isolou, na Indonésia, um novo gênero de bactéria fixadora de nitrogênio, *Beijerinckia*, que mais tarde foi classificada como *Beijerinckia indica* var Derx. Esta bactéria também foi isolada por TCHAN (1953), que estudou a presença de *Beijerinckia* no norte da Austrália e sua distribuição geográfica. DOMMERGUES (1963) e MOUREAUX (1954) isolaram bactérias fixadoras de nitrogênio do solo de Madagascar. KLUYVER & BECKING (1954) estudaram a *Beijerinckia derx* isolada de solos da Guiana Holandesa.

A presença de *Beijerinckia* no solo do Brasil foi estudada por DOBEREINER, que relacionou a distribuição deste microrganismo no solo dos seguintes estados : Pernambuco, Pará, Rio Grande do Norte, Alagoas, Bahia, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro e São Paulo. Seus estudos com esta bactéria iniciaram em 1955 e foram até 1966. A conclusão destes estudos quanto à ocorrência foi de que não há presença de *Beijerinckia* nas regiões de seca prolongada, como os estados de Pernambuco, Pará e Rio Grande do Norte. Foi observada ocorrência de *Beijerinckia*, em abundância, no solo dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Alagoas e São Paulo. (DOBEREINER & CASTRO, 1955; DOBEREINER, 1959b e DOBEREINER & RUSCHEL, 1958).

Estudos sobre a influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo foram realizados por DOBEREINER (1959b, 1961), que concluiu ter, a cultura da cana-de-açúcar, uma influência favorável no desenvolvimento desta bactéria.

A faixa de temperatura de crescimento das espécies de *Beijerinckia* é de 10 a 35°C; as mesmas possuem tolerância a baixos valores de pH (4,5 a 5,2), no entanto, já foram isoladas também em pH neutro, na América do Sul, (BECKING, 1961a e FLORENZANO et alii, 1968).

As bactérias fixadoras de nitrogênio comumente encontradas no solo, e que foram estudadas, produziram quantidades variadas de polissacarídeo (KANG & McNEELY, 1977 e JARMAN, 1979).

3.4 Síntese do biopolímero

Morfologicamente são três os tipos de biopolímeros encontrados : intracelular, da parede celular e extracelular. Por razões práticas, os microrganismos que produzem polissacarídeo extracelular livre são os primeiros a serem explorados, para evitar os procedimentos dispendiosos de purificação que são necessários aos outros tipos de polissacarídeos. Os polissacarídeos extracelulares têm um grande potencial industrial, porque podem ser recolhidos em grandes quantidades no meio líquido (McNEELY & KANG, 1973). Também, por razões óbvias, polissacarídeos extracelulares provenientes de microrganismos causadores de doenças humanas têm sido evitados. Felizmente, existem muitos microrganismos não-patogênicos ao homem, que produzem polissacarídeos extracelulares (SANDFORD, 1979).

Os biopolímeros extracelulares estão localizados fora da parede celular, sendo que alguns são encontrados ligados às células, como uma verdadeira cápsula. No entanto, outros são excretados pelas células no meio de crescimento. Provavelmente, o polissacarídeo extracelular tenha a função natural de proteger o microrganismo contra vários fatores adversos do meio ambiente. Por exemplo: quando na forma de cápsula, serviria como protetor contra ataques de fagócitos (WILKINSON, 1958).

Em geral, o polissacarídeo não aparece como função de reserva de fonte de energia. A bactéria normalmente não é capaz de catabolizar o próprio polissacarídeo extracelular (WILKINSON, 1958). Outros autores, como LÓPEZ & BACKING (1968) e BEKING (1974), no entanto, mostraram que a produção do biopolímero, após atingir um máximo de rendimento, diminuía drasticamente. Os autores consideraram que o biopolímero foi utilizado para o crescimento das células, visto que o nível de polissacarídeo decrescia concomitantemente com o aumento do número de células.

Os polissacarídeos extracelulares podem ser homopolissacarídeos ou heteropolissacarídeos. Para síntese de homopolissacarídeo, é requerido um carboidrato específico, porque polissacarídeos como a dextrana e levana, são produzidos, geralmente, por uma só enzima ou por um sistema simples de enzimas. Por causa da simplicidade do sistema, são facilmente adaptados para produção livre de células, ou seja, por síntese enzimática. Em contraste, os heteropolissacarídeos são formados a partir de qualquer fonte de carbono utilizável, embora a eficiência varie consideravelmente, porque o sistema de enzimas é complexo. Para esse tipo de sistema, a síntese por enzimas não está ainda elucidada (WILKINSON, 1958 e SANDFORD, 1982).

Segundo SANDERSON (1983), a síntese de polissacarídeos extracelulares de bactérias, com exceção da dextrana, levana e mutana, envolve açúcares ativados, intermediários, na forma de difosfato nucleotídeos.

3.5 Cinética do processo fermentativo

Nos processos de fermentação aeróbica, o microrganismo desenvolvendo sua atividade vital em meios de elevada complexidade, transforma certas substâncias em outras, podendo conduzir a resultados de interesse econômico. A célula viva é o agente responsável pela transformação, ela assimila diversos materiais, se reproduz e produz outras substâncias, alterando a composição do meio em que vive. Segundo BORZANI (1986), o problema para fazer um estudo de cinética reside em reconhecer dentre as diversas substâncias consumidas e produzidas pelo microrganismo, quais devem ser escolhidas para o estudo. Durante a fermentação, variam as concentrações de nutrientes, de produtos e de células. Partindo-se da hipótese de que a concentração de células é uma medida adequada da concentração do sistema enzimático, é óbvio que o estudo inicial seja feito em relação à produção de células. BORZANI sugere ainda que seja determinada, inicialmente, a velocidade específica de crescimento do microrganismo, e, em estudos mais completos, a velocidade específica de formação do produto e a velocidade específica de consumo do substrato para avaliação de um processo fermentativo.

3.6 Condições de produção de biopolímero

O efeito das condições ambientais sobre a produção de polissacarídeo extracelular tem sido estudado para culturas em crescimento e com suspensão de células lavadas. Limitações das fontes de nitrogênio, fosfato ou enxofre em presença de excesso de carboidrato podem conduzir a um aumento na síntese de polissacarídeo, embora a quantidade seja também afetada pelo teor de oxigênio, pH e temperatura, sendo que cada cepa difere em sua resposta ao efeito das mudanças ambientais e à utilização da fonte de carbono. As condições ideais para crescimento e produção de polissacarídeo em culturas descontínuas também são afetadas pela proporção entre o volume de ar e o volume de meio, presença ou ausência de agitação e tamanho do inóculo, além dos nutrientes (SUTHERLAND, 1972, 1981, 1982 e 1983).

Como regra geral, para fornecer os nutrientes necessários para o crescimento e produção de biopolímero, o meio deve ter carboidrato, sais de amônio ou aminoácidos e um número de sais inorgânicos que servem também como fonte de íons e que atuam como cofatores na síntese de polissacarídeo (BRETSCHER & KAISER, 1978 e MIAN et alii, 1978). Os nutrientes inorgânicos comumente requeridos para o crescimento podem ser divididos em macronutrientes tais como fósforo (KH_2PO_4); potássio (KCl); magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou MgSO_4); cálcio (CaCl_2); sódio (NaCl ou $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) que podem ser utilizados entre 0,001 a 4 gramas por 100 ml e micronutrientes tais como ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$); manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); zinco (ZnO ou $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); molibdênio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); iodo (KI) e cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), que podem ser utilizados entre 0,5 a 13 mg por 100 ml (REED, 1983).

3.6.1 Influência de nutrientes

Os microrganismos estudados, produtores de biopolímero extracelular, utilizam carboidrato como fonte de carbono e energia, e também sais de amônio ou aminoácidos como fonte de nitrogênio e carbono, além de sais inorgânicos liberadores de íons, que podem servir como cofatores, sendo que

alguns microrganismos requerem ainda vitaminas e antibióticos (MONOD, 1949; SUTHERLAND, 1982; BJURSTROM, 1987 e SANDERSON, 1990).

O próprio crescimento do microrganismo pode tornar-se um fator limitante para seu desenvolvimento, pois suas atividades metabólicas modificam a composição do meio em que se reproduzem, e dependendo das condições iniciais e do tipo do microrganismo estes podem cessar suas funções rapidamente. São comumente considerados fatores limitantes: a exaustão dos nutrientes, o acúmulo de produtos metabólitos tóxicos e as mudanças de pH, os quais são consequência do desenvolvimento do microrganismo (MONOD, 1949). No entanto, existem outros fatores físicos, tais como temperatura e aeração, que também são limitantes, e são distintos para cada tipo de microrganismo, os quais nem sempre são conhecidos (BORZANI, 1986).

3.6.1.1 Na produção de células

Na obtenção de biopolímero, a fonte de carboidrato pode ser a mesma para a produção de células e para a fase de fermentação, porém as concentrações devem ser diferentes para cada etapa. As concentrações dos açúcares preferidos na produção de células ou inóculo, glicose ou sacarose, variam de 0,2 a 2,0 % (SANDFORD et alii, 1977; MARQUÉZ et alii, 1986; MOCHI & SCAMPARINI, 1992 e VOLPATO & SCAMPARINI, 1993).

SANDFORD et alii (1977) mostraram que, para a *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459, quando foi utilizado o meio contendo baixas concentrações de carboidrato (0,2%), no primeiro estágio o crescimento celular ocorreu normalmente, mas o microrganismo não sintetizou o biopolímero. Entretanto, com o aumento da concentração do carboidrato, houve produção de biopolímero.

MORAINE & ROGOVIN (1973), estudando a cinética de fermentação de xantana, concluíram que a taxa de crescimento aumenta com o acréscimo da concentração dos nutrientes e que o nitrogênio é consumido exclusivamente para o crescimento, uma vez que a concentração celular cresce com o aumento da concentração de nitrogênio no meio.

3.6.1.2 Na produção de biopolímero

SUTHERLAND (1982), em uma extensa revisão, com mais de 150 trabalhos, mostrou a influência da composição do meio de cultura, especialmente quanto à fonte de carbono, nitrogênio e íons, na produção de polissacarídeo extracelular. A composição do biopolímero independe da natureza ou do tipo de carboidrato utilizado como fonte de carbono (LILLY et alii, 1958; UHLINGER & WHITE 1983; SUTHERLAND 1982 e MANRESA et alii, 1987). No entanto, a composição global do meio e as concentrações de seus constituintes podem influenciar o rendimento do biopolímero. A maioria dos meios de produção são baseados na alta relação entre carbono e nitrogênio, a qual favorece a produção de biopolímero, segundo DUGUID & WILKINSON, 1958 e CORP, 1964. Nutrientes limitantes, como enxofre, magnésio, potássio e fósforo, foram utilizados no lugar do nitrogênio (WILKINSON, 1953). Segundo SUTHERLAND (1983), foi observado que, em culturas contínuas, o polissacarídeo difere nas propriedades reológicas como no grau de acilação, conforme o nutriente limitante utilizado.

CADMUS et alii (1976), em estudos utilizando meio sintético na produção de xantana, concluíram que baixos teores de nitrogênio (0,1%) e ar (0,25 litro/min) favoreceram a formação de xantana com baixo teor de piruvato, enquanto que o aumento de nitrogênio (1,5%) e fluxo de ar (1,5 litro/min), juntamente com a adição de K_2HPO_4 , favoreceu a formação da xantana com alto teor de piruvato.

As fontes de carbono mais utilizadas na produção de biopolímero são a glicose e a sacarose, tendo sido utilizadas na produção de xantana nas concentrações de 2 a 7% (CHEN et alii, 1975; CHEN & TSOU, 1976; JEANES et alii, 1976 e 1977; CADMUS et alii, 1976 e 1978; SOUW & DEMAIN, 1979; CRUZ, 1983 e MOCHI & SCAMPARINI, 1993). Na produção de dextrana e curdulana, têm sido usadas concentrações de 2 a 10% (MURPHY & WHISTLER, 1973, QUEIRÓZ, 1987; HARADA et alii, 1966); e em produções de biopolímeros por *Pseudomonas*, as concentrações utilizadas têm sido de 1 a 5% (KANEKO & KANG, 1979 e CHRISTENSEN et alii, 1985).

3.6.2 Influência do pH

Para a maioria das bactérias, o pH ótimo de crescimento localiza-se entre 6,5 e 7,5. Quando as bactérias são cultivadas num meio originalmente ajustado a um pH determinado (pH 7, por exemplo) é provável que este pH se altere, pelo resultado das substâncias produzidas pelo microrganismo, que tanto podem ser ácidas como básicas. O desvio do pH pode ser tão grande que venha a limitar o crescimento do microrganismo. Para evitar essas mudanças radicais de pH deve-se fazer o uso de tampão, o qual será incorporado ao meio de cultura. A combinação de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 é largamente empregada como tampão, nos meios bacteriológicos (PELCZAR et alii, 1980).

SILMAN & ROGOVIN (1970) estudaram a produção do biopolímero por *Xanthomonas campestris* e concluíram que, para o meio e condições utilizadas, a produção da xantana é função do pH e da taxa de diluição. A faixa de pH utilizada no experimento foi de 7,1 a 7,5. SOUW & DEMAIN (1980) estudaram o efeito da concentração do citrato na produção de xantana por *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459 e concluíram que o citrato, nas concentrações de 4,7 a 9,4 mM, estimulou a produção da xantana; porém, essa melhora na produção só ocorreu quando o pH não foi controlado, já que o controle de pH elimina estes efeitos benéficos.

KANG et alii (1982) estudaram a produção do biopolímero obtido por *Pseudomonas elodea* em meio quimicamente definido e pH ajustado em 6,5, e o ajuste do pH foi feito usando KOH 4,45 N ou NaOH 6,25 N.

Segundo SANDFORD et alii (1977), um indicador do comportamento da goma xantana em solução é o conteúdo de ácido pirúvico, o qual é influenciado pelas condições de tempo de fermentação e pH. TAIT et alii (1986) concluíram que o pH 6,4, considerado baixo para esse tipo de fermentação, não afetou a produção da xantana, em processo descontínuo.

MARQUÉS et alii (1986), para a linhagem de *Pseudomonas sp* EPS-5028, constataram que a quantidade de polissacarídeo produzido, quando o pH foi ajustado para 7,0, dependeu do conteúdo de fosfato presente no meio.

Em 1985, CONGREGADO et alii concluíram em seu estudo com *Pseudomonas sp* EPS-5028, que o pH exerce uma profunda influência no crescimento de células e na produção do polissacarídeo. O acréscimo ou o decréscimo na produção do polissacarídeo também estão relacionados com a quantidade de sais adicionados. Para esse experimento, o melhor volume de solução salina por litro de meio foi de 4 a 6 ml.

Segundo HARADA et alii (1966, 1977 e 1981) e NAKANISHI et alii (1974), o melhor pH para produção de curdulana é o pH 7,0.

MONOD (1949) considerou que o crescimento total do microrganismo depende da natureza dos fatores limitantes e que o pH é um dos fatores limitantes mais comuns, depois da exaustão dos nutrientes e do acúmulo de produtos tóxicos.

O pH dentro de certos limites (6,5 a 8,0) tem pouca influência na taxa de crescimento, mas pode influenciar no número total de bactérias. No entanto, valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5) podem levar o microrganismo rapidamente à morte (CASTRO, 1993).

3.6.3 Influência da temperatura

A temperatura ótima de crescimento pode não ser a temperatura ótima para outras atividades celulares, como, por exemplo, a produção de biopolímeros. O limite térmico para as bactérias mesófilas é de 15 a 45 °C (PELCZAR et alii, 1980). Com relação ao tempo de geração, os mesmos autores afirmam que variações de temperatura também podem influenciar os processos metabólicos e a morfologia celular. CASTRO (1993) também afirma que o tempo de geração é altamente influenciado pela temperatura de incubação, podendo duplicar na faixa ótima, para uma diferença de 10°C e quintuplicar para 10°C acima ou abaixo da faixa ótima de temperatura .

Um aspecto importante a ser considerado no estudo das fermentações reside no fato de que as concentrações das enzimas e catalisadores das reações que se processam, não se mantêm constantes com o tempo. Em

alguns casos, uma decomposição relativamente rápida desses catalisadores pode ocorrer devido a condições ambientais pouco favoráveis, particularmente a temperatura (BORZANI, 1986). O agente responsável em um processo fermentativo é a célula viva, que assimila diversos materiais, se reproduz e produz outras substâncias, alterando profundamente o meio em que vive. Para cada bactéria, há uma temperatura ótima de crescimento; no entanto, a temperatura de produção de polissacarídeo nem sempre ocorre nessa temperatura, mesmo quando se encontra em meio adequado de nutrientes (BORZANI, 1986; CONGREGADO et alii, 1985 e MANRESA et alii, 1987).

Estudos realizados por MIAN et alii, em 1978, com *Pseudomonas aeruginosa* utilizaram a mesma temperatura de crescimento da célula para produção do biopolímero, ou seja, 30°C. KANG et alii (1982), para obter biopolímero por *Pseudomonas* PS-60 em meio com agitação, utilizaram a temperatura de produção entre 30 e 33°C. CONGREGADO et alii (1985), na produção de biopolímero EPS-5028, por *Pseudomonas* sp, utilizaram duas temperaturas e verificaram que a melhor temperatura de crescimento foi a 30°C, enquanto para produção do polímero, a melhor temperatura foi a 25°C.

MANRESA et alii (1987) determinaram que a melhor temperatura para síntese do polímero por *Pseudomonas* sp. GSP-910 foi a 25°C, enquanto que a máxima biomassa foi obtida a 18°C.

A temperatura utilizada por LÓPEZ & BECKING (1968), para obtenção de biopolímero por *Beijerinckia indica*, foi 30°C, enquanto a utilizada para obtenção do biopolímero por *Pseudomonas* sp NCMB-2021 variou de 20 a 22 °C (CHRISTENSEN et alii, 1985).

3.6.4 Influência da aeração

A agitação adequada satisfaz uma necessidade básica em fermentação, que é a homogeneidade do cultivo, impedindo a ocorrência de diferentes concentrações de nutrientes, pH e temperatura, além de dispersar as bolhas de

ar na massa líquida, permitindo, assim, que o oxigênio do ar chegue ao microrganismo (BRUNELLO & CONCONE, 1986).

A aeração, ao contrário do que se poderia pensar, não tem nenhum efeito no tempo de geração do microrganismo, mas aumenta consideravelmente o total da massa bacteriana. A oxigenação, além de manter a cultura por mais tempo em metabolismo oxidativo, gerando, portanto, mais ATP para a biossíntese, parece promover a oxidação de certos produtos que se acumulam no meio de cultura, resultantes do próprio metabolismo celular, e que são tóxicos para as bactérias (CASTRO, 1993).

Agitação e aeração são fatores importantes a serem considerados nas fermentações que utilizam microrganismos aeróbicos, principalmente em processos contínuos; no entanto, em produções descontínuas, a agitação e o volume de ar são também importantes, pois os processos de reprodução de microrganismos se dão em presença de oxigênio, e em determinadas fermentações a necessidade de oxigênio não é só para produzir células, mas também para aumentar o rendimento dos produtos destas fermentações (BRUNELLO & CONCONE 1986).

Em 1982, KANG et alii, visando a produzir gelana em fermentadores com capacidade de 30 litros, utilizaram uma agitação de 400 a 800 m/min e uma taxa de aeração de 2 (meio/ar, v/v/m). A eficiência de conversão em relação à fonte de carbono inicial, para uma fermentação de 50 horas, foi de 50%.

LÓPEZ & BACKING (1968) produziram biopolímero com a bactéria *Beijerinckia*, utilizando agitador do tipo rotativo para pequenos volumes, ou seja, 25 ml em Erlenmeyer de 100 ml, e para quantidades maiores, 1 litro em frascos "Kluyver" com capacidade de 2,5, litros com aeração através de ar comprimido.

3.7 Meios utilizados na produção de biopolímeros

3.7.1 Dextrana

A dextrana é produzida pela enzima extracelular dextrana-sacarase; portanto, sua obtenção pode ser feita na presença ou ausência de células, isto é, pelo processo convencional ou pela síntese enzimática, utilizando-se enzima purificada. Conhecendo-se a enzima produtora, torna-se mais fácil determinar o meio de produção. O meio convencional usado contém em g/l : sacarose 100, extrato de levedura 2,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,20; K_2HPO_4 5,0 e o pH ajustado para 7,0. O rendimento para esse meio é próximo a 25 %. Esse meio produz dextrana de alto peso molecular (JEANES et alii 1948 e JEANES, 1965). Segundo MURPHY & WHISTLER (1973), variando-se a concentração inicial de sacarose ou adicionando outros açúcares ou oligossacarídeos de baixo peso molecular, inclusive dextrana hidrolisada, pode-se obter dextrana de baixo peso molecular no próprio meio de produção. Outro meio de produzir dextrana com peso molecular entre 10 000 e 300 000 é variando as concentrações de sacarose entre 20 e 80 % e adicionando carboidratos como glicose, frutose, maltose, oligossacarídeos ou dextrana.

A maioria das dextranas comerciais são produzidas pelo processo convencional. ALSOP (1983) relatou, na produção de dextrana nativa, que a concentração de sacarose a qual apresenta maior rendimento industrial é de 17%, não sendo adicionados outros açúcares. QUEIRÓZ (1987) usou um meio para produção de dextrana, com a seguinte composição em g/l: sacarose 40, extrato de levedura 20, K_2HPO_4 20, $MgSO_4$ 0,2, NaCl 0,01, $FeSO_4$ 0,01, $MnSO_4$ 0,01 e $CaCl_2$ 0,02.

Outras fontes de nutrientes, como melão e água de maceração de milho, foram utilizadas para substituir o extrato de levedura. Quando se utilizou água de maceração de milho, não se obteve nenhum incremento significativo na produção de dextrana-sacarase. A adição ou omissão de sais no meio com melão não modificou de forma significativa a produção de dextrana-sacarase. QUEIRÓZ (1987) testou concentrações de 0 a 30 g/l de fosfato, para as quais obteve um aumento significativo de dextrana-sacarase, quando se aumentou o teor de fosfato, verificando que, acima de 30 g/l, houve queda na produção da enzima.

3.7.2 Xantana

A produção de xantana utilizando diversas fontes de carbono foi estudada por LILLY et alii (1958). O meio continha glicose de amido ou sacarose, caseína hidrolizada e sais minerais. O rendimento obtido foi de até 6g de polissacarídeo por litro de caldo de fermentação. No entanto, a primeira tentativa de determinação dos requerimentos nutricionais de *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459 foi feita por ROGOVIN et alii (1961), sendo que a constituição do meio em gramas por litro foi a seguinte : glicose 25, fosfato de potássio 20 e traços de sais minerais.

ROGOVIN (1969) utilizou para produção contínua com a mesma bactéria, um meio contendo 22,5 g/l de açúcar de milho, e, após 13 dias de fermentação, obteve 79,6% de rendimento (baseado na quantidade de açúcar consumido). Ainda com a mesma linhagem, SILMAN & ROGOVIN (1970) usaram um meio contendo glicose, sais minerais, resíduos solúveis de destilaria e uréia, para fermentação contínua por 20 dias e obtiveram melhor rendimento quando o pH foi ajustado entre 7,1 - 7,5 e quando a taxa de diluição foi aumentada de 0,024 para 0,028 hr⁻¹ a pH 7,5.

Em 1976, CADMUS et alii testaram um meio sintético com a seguinte composição em gramas por litro: MgSO₄ 0,001, fosfato de amônio 0,01 e glicose 26, para o qual obtiveram um rendimento de 50%. SOUW e DEMAIN (1979) aumentaram para 70% o rendimento da xantana quando utilizaram um meio químico definido, contendo como fonte de carbono a sacarose (40 g/l) e quantidades ótimas de ácidos orgânicos. Em 1980, os mesmos autores estudaram o efeito de citrato em concentrações de 4,7 - 9,4 mM, no meio de produção, e concluíram que o citrato estimula a produção de xantana quando não se controla o pH.

CRUZ (1983), estudando a produção de xantana por *Xanthomonas manihotis*, utilizou o meio cuja composição foi a seguinte, em gramas por litro: glicose ou sacarose 40; KH₂PO₄ 5,0; MgSO₄.7H₂O 0,2; (NH₄)₂SO₄ 2,0; ácido cítrico 2,0; H₃BO₃ 0,006; ZnO 0,006; FeCl₃.H₂O 0,0024; CaCO₃ 0,02 e 0,13 ml de HCl a 0,1%, sendo que o pH foi ajustado para 7,0. Para quantidades iguais de glicose e sacarose, obteve-se o mesmo rendimento em termos de polissacarídeo; porém quando se utilizou a glicose como fonte de carbono houve maior produção de massa celular. Neste experimento, CRUZ

obteve 1,742 g/l de células secas quando usou glicose e 1,424 g/l quando usou sacarose. O maior rendimento de xantana obtido foi de 50%, tanto para sacarose como para glicose.

MOCHI & SCAMPARINI, em 1993, produziram xantana com as linhagens DCA450 e DCA459 de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, utilizando o meio com a seguinte composição em gramas por litro : sacarose 20; K₂HPO₄ 5,0; MgSO₄ 0,001 e o pH foi ajustado para 7,0.

3.7.3 Curdulana

A produção de curdulana pode ser obtida em meio definido com altas concentrações de carboidrato simples e a pH neutro. O rendimento de produção é próximo a 50 % (HARADA et alii, 1966 e NAKANISHI et alii, 1974).

3.7.4 Zanflo

Este biopolímero é melhor sintetizado quando se usa sacarose, maltose ou misturas destas com glicose; no entanto, a taxa de conversão é baixa (GLICKSMAN, 1982).

3.7.5 Gelana

A *Pseudomonas elodea* foi isolada do tecido da planta Elodea, em 1979 por KANEKO & KANG. A goma gelana foi denominada PS-60 (COTTRELL, 1980; KANG et alii, 1982 e KANG et alii, 1983). Em 1982, KANG et alii usaram um meio de produção contendo: 30 g de glicose, 0,5 g de K₂HPO₄; 0,1 g de MgSO₄.7H₂O; 0,9 g de NH₄NO₃; 0,5 g de Promosoy em 1 litro e 1 ml de solução salina. A solução salina continha os seguintes componentes por litro de água deionizada: 1,8 g de MnCl₂.4H₂O; 2,487 g de FeSO₄.7H₂O; 0,285 g de H₃BO₃; 27 mg de CuCl₂; 21 mg de ZnCl₂; 74 mg de CoCl₂.6H₂O e 23 mg de MgMoO₄ e 2,1 g de tartarato de sódio diidratado.

Embora exista continuidade de trabalhos sobre gelana até 1994, é interessante observar que, após o trabalho de KANG et alii (1982), as referências sobre o meio de produção são citadas apenas como: o meio consiste de uma fonte de carbono como glicose, uma fonte de nitrogênio e um

número de sais inorgânicos (SANDERSON & CLARCK, 1983 e SANDERSON, 1990).

3.7.6 Welana

LAWFORD et alii (1982) realizaram um estudo com *Alcaligenes* que envolvia dois estágios contínuos para produção do polissacarídeo extracelular. O meio de cultura utilizado para crescimento celular e posterior produção de biopolímero era composto de: glicose, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ácido cítrico e propileno glicol como antiespumante. O rendimento de polímero foi de 42 %. Não houve deterioração da biomassa em 21 dias de processamento contínuo.

Em 1983, KANG et alii estudaram certas espécies de *Alcaligenes* capazes de excretar welana em meio contendo glicose como fonte de carbono, nitrato de amônia e peptona de soja como fonte de nitrogênio, e traços de elementos como ferro, magnésio, molibdênio, cobalto, zinco, cobre, magnésio e boro. A conversão foi de aproximadamente 60% da fonte de carbono inicial para 70 horas de fermentação.

3.7.7 Succinoglicana

DUSSAP et alii (1991) utilizaram o meio para produção de succinoglucana que foi descrito e patenteado por LINTON et alii (1984). A composição do meio é a seguinte : (mM): glicose (166,5), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5,67), KH_2PO_4 (5,52), MgSO_4 (1,62), CaCl_2 (0,08) e FeCl_3 (0,05). Foram adicionadas soluções dos seguintes sais em ml: CuSO_4 (1); MnSO_4 (1,3); ZnSO_4 (1); CoSO_4 (0,5), H_3BO_3 (0,5), Na_2MoO_4 (0,5) e KI (0,5) e o pH foi ajustado a 6,8 - 7,0 com NaOH 1 N.

3.7.8 "Glycocalys"

UHLINGER & WHITE (1983) utilizaram para produção do polissacarídeo Glycocalys, por *Pseudomonas atlantica*, o seguinte meio: 100 ml de água do mar contendo 1% (p/v) de galactose e 0,1% (p/v) de proteose

peptona em 15500 ml. O meio foi inoculado com 1 ml de cultura na fase exponencial e incubado a 25°C a 150 rpm. A galactose foi substituída por glicerol, xilose, manose ou glicose. A galactose foi a que apresentou maior rendimento na produção do biopolímero.

3.7.9 Polissacarídeos produzido por outras cepas de *Pseudomonas*.

As condições de cultura para obtenção de um biopolímero extracelular a partir de *Pseudomonas* NCMB 2021, utilizadas por CHRISTENSEN et alii (1985) foram : temperatura de 20 - 22°C, velocidade de agitação 150 rpm e 100 ml de meio contendo : 0,3% peptona ou 0,3% extrato de levedura em água do mar filtrada. Também concentrações até 5% de glicose foram adicionadas ao meio. O rendimento foi de 240 mg/l, quando se utilizou 1,0% de glicose no meio.

Em 1986, MARQUÉS et alii utilizaram o meio inicial quimicamente definido para *Pseudomonas* sp EPS-5028, que continha por litro 20g de glicose, 1g de NH₂Cl; 5,44g de KH₂PO₄ e 6 ml de solução mineral contendo por litro: 0,1g de CaCl₂, 0,4g de FeSO₄.7H₂O; 0,075g de MnSO₄.7H₂O e 10 g de MgSO₄.7H₂O. O meio de produção continha, por litro : 20g de glicose, 0,5g de NH₄Cl; 2,72g de KH₂PO₄ e 6 ml da mesma solução mineral descrita acima. O pH foi ajustado a 7,0. O frasco de 500 ml continha 250 ml de meio o qual foi mantido a 28 °C. Essa cultura foi usada como inóculo para fermentação contínua.

MANRESA et alii (1987) isolaram do solo uma nova cepa de *Pseudomonas* sp GSP-910 a qual, produziu biopolímero. no meio contendo : 2% de sacarose, 0,02% de extrato de levedura, 0,2% de triptose, 0,2% de KH₂PO₄, 0,27% de MgSO₄.7H₂O, 0,001% de MnSO₄, 0,001% de FeSO₄ e 0,001% de CaCl₂. Para este mesmo meio foram testadas também as seguintes fontes de carbono: glicose, manose, galactose, frutose, xilose, lactose e maltose. As condições do experimento foram as seguintes: 100 ml de meio em frasco de 500 ml, 30 °C e 150 rpm por 72 h. Os melhores rendimentos foram 4,81; 4,43; e 3,72 g/l para glicose, sacarose e xilose, respectivamente . Todas as outras fontes de carbono apresentaram rendimento entre 1,48 e 1,64 g/l.

3.7.10 Biopolímeros produzido por *Beijerinckia*

LÓPEZ & BACKING, em 1968, utilizaram um meio livre de nitrogênio para produção de biopolímero extracelular por *Beijerinckia*, o qual continha em gramas por litro de água destilada: glucose 20, K₂HPO₄ 0,8; KH₂PO₄ 0,2; MgSO₄.7H₂O 0,5; FeCl₃.6H₂O 0,025; Na₂Mo₄.2H₂O 0,005. O pH foi ajustado para 7,2. O rendimento foi de 5,4g/l de biopolímero.

Em 1974, BECKING utilizou o mesmo meio, adicionando 0,05 g/l de CaCl₂ ou 10 a 20 g/l de CaCO₃ e o pH foi ajustado para 6,9.

KANG & McNEELY (1977) isolaram e identificaram uma bactéria do solo como sendo *Azotobacter indicus*, e codificaram o polissacarídeo produzido como PS-7. Visando a produzir biopolímero, utilizaram o seguinte meio em g/l: glucose 30; K₂HPO₄ 5,0; MgSO₄.7H₂O 0,1; NH₄NO₃ 0,9 e Promosoy 0,5. SANDFORD (1982) referindo-se ao PS-7 como sendo polissacarídeo produzido por *Beijerinckia indica* (*Azotobacter indicus*), cita para obtenção deste polissacarídeo o mesmo meio utilizado por KANG & McNEELY (1977). Em 1983, SUTHERLAND relatou apenas que, para a produção deste biopolímero em laboratório, foi utilizado um meio contendo nitrogênio e 3% de glicose.

Os resultados da composição dos biopolímeros estão apresentados na Tabela 1.

3.8 Composição dos Biopolímeros

A composição dos biopolímeros, de acordo com a Tabela 1, é limitada a um número pequeno de monossacarídeos, e outros componentes não carboidratos, como fosfato, acetato e piruvato. Porém, soluções aquosas destes polímeros apresentam diversidade nas propriedades físicas. Alguns desses polissacarídeos produzem soluções altamente viscosas, e outros podem formar géis semelhantes ao agar, pela adição de sais.

CONGREGADO et alii (1985) testaram diferentes fontes de carbono para obtenção do polissacarídeo por *Pseudomonas sp* EPS-5028 e concluíram que a composição do polímero não foi afetada pela natureza da fonte de carbono.

As bactérias *Xanthomonas campestris sp v. campestris* e *Xanthomonas campestris v. manihotis* produzem através da fermentação da glicose ou outra fonte de carbono, a xantana, que é um polissacarídeo aniônico de alto peso molecular (COTTRELL et alii 1980 e SCAMPARINI 1987). Quimicamente este polissacarídeo é constituído por D-glucose, D-manose, ácido D-glucurônico, ácido acético e ácido pirúvico nos teores 2,8 : 3,0 : 2,0 : 1,7 : 0,51 : 0,63 respectivamente (SLONEKER & JEANES, 1962).

A gelana é também um polissacarídeo de alto peso molecular, sintetizada por *Pseudomonas elodea* ATCC 31461 em fermentação controlada, com glicose ou sacarose como fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e um número de sais inorgânicos (KANG & VEEDER, 1981). Os monossacarídeos constituintes da unidade formadora da gelana são: glicose, ácido glucurônico e ramnose na proporção 2:1:1 respectivamente (SANDERSON, 1990 e SANDERSON & CLARK, 1984).

SANDFORD (1982) estudou a composição do polissacarídeo PS-60, produzido por *Pseudomonas elodea* o qual continha glicose, ramnose, ácido glucurônico e grupos O-acil. CARROLL et alii (1983), apresentam a seguinte composição para a gelana : 6 % de grupos O-acetil, 22 % ácido urônico, ramnose e glicose na proporção molar de 3: 2. O'NEIL et alii (1983), analisando a estrutura do biopolímero obtido por *Pseudomonas elodea*, em meio contendo 3% de glicose como fonte de carbono, encontraram os seguintes constituintes: glicose , ramnose e ácido urônico na razão molar de 1:15:1.

O polissacarídeo extracelular ácido produzido por *Rhizobium Trifolii* 4S, tem a seguinte composição : D-glucose, ácido D-glucurônico, ácido pirúvico e ácido acético na proporção de 5:2:1:2, respectivamente (AMEMURA et alii, 1983).

A xiloglucana proveniente da parede celular de *Phaseolus coccineus*

foi isolada e parcialmente caracterizada por ONEILL & SELVENDRAN (1983). Esse polímero é composto de L-arabinose (4,2%), L-frutose (6.0%), D-Galactose (9.3%), D-xilose (34.1%) e D-glucose (46.4).

A pululana, produzida por *Aureobasidium pullulans*, é um polissacarídeo neutro. Não forma gel, porém é solúvel tanto em água como em soluções ácidas ou alcalinas (KENNEDY et alii, 1984 e SANDFORD et alii, 1984). A pululana é um polímero linear de unidades de maltotriose conectadas por ligações α -(1-6); em algumas preparações podem ser encontradas unidades de α -maltotetraose e resíduos de glucopiranosose ligados em α -1-3 (SANDFORD, 1982).

A curdulana produzida por *Alcaligenes faecalis*, var. *myxogenes*, é um polímero linear formado por β -1,3-D-glicose (HARADA et alii, 1987). A curdulana é um polissacarídeo linear neutro, capaz de formar gel, o qual apresenta propriedades entre a elasticidade da gelatina e a rigidez do agar. (KENNEDY et alii, 1984).

CHRISTENSEN et alii (1985) pesquisaram o polissacarídeo extracelular produzido pela *Pseudomonas marinha* NCMB 2021, detectando a produção de dois tipos de polissacarídeos, o primeiro produzido apenas na fase exponencial de crescimento, constituído por glucose, galactose, ácido glucurônico e ácido galacturônico, nas seguintes proporções molares 1.00 :81 :0.42 :0.32. De acordo com os autores, este polímero produziu soluções de alta viscosidade e formou gel a altas concentrações com adição de cátions multivalentes. O outro polissacarídeo foi produzido no fim da fase exponencial e na fase estacionária, sendo composto por N-acetilglucosamina, ácido 2-ceto-3-desoxioctulosônico, 6-desoxihexose e também grupos acetil. Este polímero formou soluções com baixa viscosidade.

Em estudos preliminares, CONGREGADO et alii (1985) apresentaram a estrutura do polissacarídeo produzido pela *Pseudomonas sp.* EPS-5028, como sendo constituído por D-glicose, D-galactose e ácido urônico, nas seguintes relações molares : 3: 2: 3 . A viscosidade deste polímero foi de 1600 cP, quando diluído a 1% em água deionizada.

O polissacarídeo extracelular, produzido por linhagens de *Lactobacillus bulgaris*, que crescem em leite desnatado, apresentou a seguinte composição:

galactose, glucose e ramnose na proporção molar 4:1:1, sendo que o seu peso molecular é de aproximadamente 500.000 (CERNING et alii, 1986).

A linhagem de *Pseudomonas sp.* GSP-910, isolada do solo, produziu um polímero extracelular com a seguinte composição : glucose 28.07%, galactose 56,8%, ácido glucurônico 8,8% e grupos acetila 6,23%. Suas soluções aquosas a 1 % apresentaram alta viscosidade em presença de íons monovalentes e em presença de íons divalentes (CaCl₂ 0,5%), formaram gel elástico (MANRESA et alii, 1987).

FETT et alii (1989) estudaram um total de 214 linhagens de *Pseudomonas fluorescens* associadas a plantas, com a finalidade de encontrar linhagens produtoras de polissacarídeos extracelulares. As linhagens foram testadas em vários meios de crescimento e condições de cultura, sendo que aproximadamente 10% das linhagens produziram polissacarídeo extracelular. De 20 linhagens examinadas, 6 produziram polissacarídeo ácido; no entanto outras 12 linhagens de *Pseudomonas fluorescens* produziram um outro tipo de polissacarídeo ácido denominado marginalana, composto por glucose e galactose (1:1) contendo grupos acetil e pirúvico. Três destas linhagens de *Pseudomonas fluorescens* produziram um terceiro tipo de polissacarídeo ácido, composto por ramnose, manose, e glucose, na proporção molar de 1:1:1, contendo ainda grupos acetil e pirúvico.

A levana é um polissacarídeo produzido pela bactéria isolada do solo, em meio contendo sacarose, pela linhagem *Bacillus polymyxa*, estudada por HAN & CLARKE (1990). A sua constituição é inteiramente de frutose com resíduos de frutofuranosídeos ligados em $\beta(2-6)$.

Tabela 1 Composição de heteropolissacarídeos

Heteropolissacarídeo	Constituintes	Referência
Xantana (<i>Xanthomonas campestris</i>)	glicose, manose, ác. glucurônico,ác. pirúvico, grupos acetil	(SANDFORD et alii 1977)
Gelana (<i>Pseudomonas elodea</i>)	glicose, ramnose, ác. urônico, grupos acetil (gelifica)	(KANG et alii 1983)
GSP-910 (<i>Pseudomonas sp</i>)	glicose, galactose, ác. glucurônico,grupos acetil (gelifica)	MANRESA et alii 1987)
EPS-5028 (<i>Pseudomonas sp</i>)	glicose, galactose, ácido urônico	(MARQUÉS et alii 1986)
NCMB-2021 (<i>Pseudomonas sp</i>)	glicose, galactose, ác. glucurônico, ác. galacturônico	(CHRISTENSEN et alii 1985)
Zanflo (<i>Erwinia tahitica</i>)	glicose, galactose, frutose, ác. glucurônico, grupos acetil	(SANDFORD, 1982)
<i>Beijerinckia indica</i>	glicose, manose, galactose, ác.glucurônico, ác.galacturônico	(LÓPEZ & BACKING 1968)
<i>Beijerinckia indica</i> (<i>Azobacter indicus</i>) PS-7	glicose, ramnose, ác.glucurônico, grupos acetil (gelifica)	(KANG & McNEELY, 1977)

3.9 Métodos usados na determinação da composição de biopolímeros

LÓPEZ & BACKING (1968) e BECKING (1974), na determinação da composição do polissacarídeo obtido por fermentação com *Beijerinckia indica*, utilizaram hidrólise total com ácido sulfúrico 1,5 N. A hidrólise foi realizada em tubo de vidro fechado, por 5 horas a 100 °C. A determinação qualitativa dos açúcares foi feita em cromatografia de papel, descendente, usando papel filtro Whatman nº 1 e os seguintes sistemas de solventes : a) acetato de etila : piridina : água, (v/v, 10 : 4 : 3), b) butanol : etanol : água (v/v, 4 : 1 : 3) e c) butanol : ácido acético : água (v/v, 8 : 2 : 2). A presença de ácido galacturônico foi posteriormente confirmada pelo teste de carbazol, segundo DISCHE (1955), e o ácido glucurônico pelo teste de ácido tioglicólico, segundo DISCHE (1962). KANG & McNEELY (1977) analisaram a composição do polissacarídeo PS-7, também produzido por *Beijerinckia indica*, através da cromatografia em papel e cromatografia gasosa.

FUKAGAWA et alii (1975), no estudo da estrutura da fucogalactana, produzida por *Rhodotolura glutinis* k-24, obtiveram os açúcares residuais componentes do polissacarídeo por hidrólise com ácido sulfúrico 1N por 10 h a 100°C. O resíduo foi submetido a trimetilsililação com 0,1 ml de piridina, contendo hexametildisilazano (50 $\text{O}l$) e trimetilclorosilano (30 $\text{O}l$). A cromatografia gasosa dos derivados trimetilsililados foi feita em cromatógrafo Shimadzu - GC-4APF, equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio. A coluna de vidro (0,4 x 200cm) foi empacotada com 3% OV-17 sobre Chromosorb W (60 - 80 mesh). A temperatura da coluna foi de 165°C e o fluxo de nitrogênio de 5 ml/min.

JANSSON et alii (1975), na determinação da estrutura do polissacarídeo extracelular produzido pela *Xanthomonas campestris*, utilizaram metilação com e sem redução do grupo carboxila e a análise dos açúcares metilados e seus alditóis acetilados foram feitos por cromatografia gasosa e espectrometria de massa.

WILLIAMS et alii (1979), em estudos preliminares da composição e reologia do polissacarídeo extracelular sintetizado pela *Pseudomonas* PB1 (NCIB 11364), determinaram qualitativamente e quantitativamente os monossacarídeos, através de cromatografia gasosa, usando um cromatógrafo a gás Pye Series 104 com coluna de vidro e detector de ionização de chama. A hidrólise do polissacarídeo foi feita com H_2SO_4 0,5 m por 15 h a 100°C.

A estrutura do polissacarídeo PS-60, produzida pela *Pseudomonas elodea*, estudada por KANG et alii (1982), foi determinada por metilação segundo o método de HAKOMORI (1964). Pelo método usado por BJORN DAL et alii (1970), o polissacarídeo metilado foi hidrolisado e os derivados foram separados e identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, usando um aparelho Hewlett-Packard com coluna de vidro 1.5 -ft (ca.45.72 cm), contendo 3% OV-225 a 170 °C.

Os açúcares, componentes da estrutura do polissacarídeo ácido extracelular produzido por *Pseudomonas elodea*, gelana, foram determinados em cromatografia de papel, (KANG et alii, 1982). Em 1983, ONEIL et alii determinaram os monossacarídeos componentes da gelana, por cromatografia gasosa, após terem hidrolisado o biopolímero com H_2SO_4 por 2,5 horas, a 100 °C. O ácido urônico foi determinado colorimetricamente, usando ácido D-glucurônico como padrão.

JANSSON et alii (1983), estudando a estrutura da goma gelana, fizeram a determinação dos monossacarídeos hidrolisando o biopolímero e, posteriormente, fazendo cromatografia gasosa. Nas condições de hidrólise usadas por estes autores, o resultado obtido na cromatografia gasosa dos alditóis acetilados foi D-glucose e L-ramnose na proporção molar 1 : 0,47. A cromatografia foi feita com Perkin-Elmer 550 e Hewlett-Packard 5830 A, com detector de ionização de chama. A separação do alditóis acetilados foi feita em coluna de vidro contendo 3% de OV-225 sobre Gas Chrom Q a 190° C e os alditóis acetilados parcialmente metilados, na mesma coluna a 170°C. A metilação foi feita de acordo com o procedimento de HAKOMORI, com sódio metilsulfanilmetanida, iodeto de metila e sulfóxido de metila. Para materiais de baixo peso molecular, o metil sulfóxido foi removido por liofilização, e o produto foi isolado por partição entre clorofórmio e água e, quando necessário, foi purificado por cromatografia em Sephadex LH-20.

IELPI et alii (1983) em um trabalho de biossíntese de xantana, também utilizaram cromatografia com papel Whatman nº 1, e eletroforese, sendo que os solventes utilizados foram : a) acetato de piridina 1,2M, b) amônia 3M em etanol 99% (v/v) e c) isopropanol : ácido acético : água (27 : 4 : 9).

CONGREGADO et alii (1985), na determinação da composição do polissacarídeo sintetizado pela *Pseudomonas sp.* EPS-5028, utilizaram o método de DUBOIS et alii (1956), para a determinação dos carboidratos. Os açúcares constituintes foram determinados por cromatografia de camada delgada. Antes, o polissacarídeo foi hidrolisado por 16 h a 100 °C com ácido clorídrico 1 M e neutralizado com carbonato de prata. O solvente utilizado foi água : acetato de etila : piridina, (25 : 100 : 35). O ácido pirúvico foi determinado no polissacarídeo parcialmente hidrolisado, (HCl 1M, 5h, 100° C) utilizando-se o método específico para piruvato de FRIEDMAN & HAUGEN (1943).

MANRESA et alii (1987) na caracterização do polímero produzido pela *Pseudomonas sp.* GSP-910, utilizaram para determinação do ácido urônico o método de DISCHE (1962). Os grupos O-acetil foram determinados pelo método de McCOMB & McREADY (1957), usando-se como padrão paraacetil glucose. Para fazer análise dos monossacarídeos, o polissacarídeo foi hidrolisado com H₂SO₄ 2N a 100 °C por 24 h, sendo os resíduos, após neutralização com CaCO₃ e separação por centrifugação, analisados por cromatografia gasosa, através de seus alditóis trimetilsililados, segundo BLAKE & RICHARDS (1970). As análises cromatográficas foram feitas em cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5790A, equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar (25 m x 0,31 mm com 5% fenilmetil silicone). O cromatógrafo foi programado isotermicamente por 2 min a 80° C com um gradiente linear de 6°C a 300°C.

3.10 Recuperação e purificação do biopolímero

ROGOVIN et alii (1961) recuperaram o polissacarídeo produzido pela *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459, por adição de etanol ao meio de fermentação, e a purificação foi feita por sucessivas lavagens do precipitado com etanol 95%.

MARKOVITZ & SYLVAN (1962), no estudo do efeito do sulfato de sódio e sulfato de magnésio sobre a síntese do polissacarídeo extracelular, por bactéria Gram-negativa do solo, utilizaram, após adição de solução 0,04 N de NaCl ou Na₂SO₄ no caldo de fermentação, etanol para precipitar o polissacarídeo neutro.

ROGOVIN & ALBRECHT (1964) descreveram um método de recuperação do polissacarídeo produzido por *Xanthomonas* B-1459 do caldo de fermentação, através da formação de complexos insolúveis com aminas quaternárias.

McNEELY & CONNELL (1966) recuperaram a goma xantana pela utilização de um hidrolisado de cal (íons cálcio) como precipitante. O precipitado formado foi separado e purificado por lavagem em solução salina.

O polissacarídeo extracelular produzido pela *Pseudomonas* NCIB11264, em fermentação contínua e descontínua, foi recuperado do caldo de fermentação, por precipitação com 2-propanol, e seco sob pressão reduzida a uma temperatura não superior a 40°C. A goma foi purificada por diálise contra água destilada a 4°C, usando tubos de diálise pré-lavados com solução 0,01 M de EDTA 1 % (peso/vol) e solução de Na₂CO₃. (WILLIAMS et alii, 1973; WILLIAMS & WIMPENNY 1977 e WILLIAMS & WIMPENNY, 1978 e 1979).

MIANT et alii (1978), em seu estudo sobre a biossíntese do polissacarídeo extracelular, em cultura descontínua, por *Pseudomonas aeruginosa*, utilizaram na recuperação do biopolímero, 75 ml de 2-propanol para 25 ml de sobrenadante; e essa mistura foi agitada e, após, deixada em repouso por 10 minutos. O precipitado resultante foi filtrado em disco de filtro Whatman GF/A, pré-pesado, sendo então, seco a vácuo a 45 °C, por 24 horas.

CADMUS et alii (1982) centrifugaram o caldo de fermentação por 30 min a 20.000 rpm, para remover as células. O polímero foi então recuperado do sobrenadante por precipitação com três volumes de etanol 95% e, após, foi dializado contra água destilada, ajustado para pH 7,0 e liofilizado.

Nos estudos preliminares sobre a produção e composição do polissacarídeo extracelular sintetizado por *Pseudomonas* sp. EPS-5028, CONGREGADO et alii (1985) utilizaram três volumes de etanol para recuperar o polímero; antes, porém, centrifugaram o caldo de fermentação a

11.000 x g para retirar as células. O precipitado foi filtrado em discos de papel filtro Whatman GF/A pré-pesado. A secagem foi feita a vácuo a 45 °C, por 24 horas. A purificação foi feita dissolvendo o polissacarídeo em solução de cloreto de sódio 0,01 M, à qual foi adicionada solução de "cetyl pyridium chloride" até não haver mais formação de precipitado. O complexo insolúvel foi recuperado por centrifugação e dissolvido em NaCl a 10 %. Esta solução foi dializada contra água deionizada e, posteriormente, foi liofilizada.

READ & COSTERTON (1987) na recuperação do polissacarídeo extracelular aderido, produzido por *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*, centrifugaram o caldo de fermentação e lavaram o precipitado com solução 1 M de NaCl; então, centrifugaram novamente o sobrenadante e adicionaram este novo sobrenadante ao da primeira centrifugação e, após, dialisaram contra água deionizada por uma noite e então precipitaram o polímero com dois volumes de etanol 95% a frio.

Na produção do polissacarídeo extracelular aniônico, por *Pseudomonas elodea*, o caldo de fermentação foi pasteurizado após a fermentação completa, para eliminar as células viáveis. Subseqüentemente, foi realizado o processo de recolhimento do polissacarídeo, desacetilado ou não, através da adição de dois volumes de isopropanol 99%. O polissacarídeo foi recolhido e seco a 55 °C através de circulação de ar, por uma hora, enquanto na forma desacetilada o pH do caldo de fermentação foi primeiramente ajustado a 10,0, com adição de KOH ou NaOH, e aquecido a 95 °C e então resfriado até 80 °C e mantido nessa condição por 10 minutos. Posteriormente, foi neutralizado com H₂SO₄. O produto clarificado foi obtido através da filtragem, do caldo de fermentação quente tratado com álcali em pH 10,0, em membranas filtrantes Gelman (KANG et alii, 1982 e SANDERSON, 1990).

A goma xantana produzida após fermentação completa por *Xanthomonas campestris*, foi precipitada com metanol (LAWRENCE, 1973). SCAMPARINI et alii (1990) e MOCHI & SCAMPARINI (1992) utilizaram etanol comercial para recuperação do polímero produzido por linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. A secagem foi feita em estufa a vácuo por 48 horas a 50°C. CHENG et alii (1978) também utilizaram etanol ou metanol para precipitação da xantana do meio de fermentação em processo, utilizando *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. CRUZ (1983), em seu estudo dos fatores envolvidos na produção de goma xantana por

Xanthomonas manihotis, recuperou a goma por precipitação com etanol, depois da remoção das células por centrifugação a 7000 rpm por 30 minutos. Após, filtrou o precipitado, e este foi lavado três vezes com etanol. O polissacarídeo foi seco em estufa a vácuo, a 55 °C, até a obtenção de peso constante.

3.11 Reologia² de biopolímeros

Exemplificando a importância da estrutura química desse tipo de substância, STADING (1988) ressalta ser possível que um sol formado por 99,9 % de água seja capaz de formar gel e se comportar como sólido elástico em alguma circunstância, enquanto os oceanos têm 96,5 % de água e não formam géis. Atualmente, o estudo da funcionalidade dos hidrocolóides tem crescido de importância na indústria de alimentos, devido às suas propriedades espessantes e estruturantes (MORRIS et alii, 1981; MORRIS, 1984; MORRIS, 1992).

Produtos alimentícios devem oferecer uma percepção sensorial agradável; portanto, os agentes formadores de gel devem ter características especiais que satisfaçam o consumidor. Esse é um tópico abordado pela Psicorreologia, ciência ainda nos seus primórdios (BOURNE, 1982 e MORRIS, 1993).

Deve ser lembrado que a designação gel tem um aspecto muito amplo, podendo variar de uma forma elástica como borracha, passando por quebradiça, até pastosa. Da mesma forma, um gel com alto índice de elasticidade pode entrar em colapso quando sofre uma pequena deformação. Conseqüentemente, torna-se necessário explicar teoricamente suas propriedades reológicas em termos de parâmetros estruturais. Para STADING (1988) as teorias originadas da química de polímeros têm sido aplicadas no estudo dos géis; entretanto, elas oferecem um número de parâmetros que parecem ser insuficientes para descreverem a estrutura de um gel.

²Reologia é a ciência que estuda o fluxo e a deformação dos materiais, através do emprego de ensaios físicos e análise matemática.

3.11.1. Medida das propriedades reológicas

As propriedades funcionais dos biopolímeros são caracterizadas pela descrição do seu comportamento reológico, ou seja, pela definição das suas propriedades reológicas, que é a forma mais precisa de se caracterizar um material, ou de se comparar uma classe de materiais com outra. Didaticamente, o comportamento reológico dos materiais é dividido em dois grupos: deformação de sólidos e fluxo de fluidos, embora a distinção entre sólido e fluido não seja clara e precisa (MOHSENIN, 1976 e BOURNE, 1982).

3.11.1.1 Viscosidade

Tradicionalmente, a viscosidade de soluções poliméricas era avaliada por viscosímetros simples, como o Brookfield, e pipetas de fluxo, que resultam em valores relativos e altamente influenciados pelas condições de medida. Mais recentemente, viscosímetros com dispositivos cilíndricos do tipo Couette e cone-prato, como Haake e Shirley-Ferranti, têm-se tornado mais populares. Estes caracterizam o sistema em termo de curvas de fluxo: tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação, podendo também quantificar o comportamento em função do tempo e da temperatura (RAO, 1986).

MIAN et alii (1978) determinaram a viscosidade do polissacarídeo obtido por *Pseudomonas aeruginosa*, usando um viscosímetro Wells-Brookfield HBT, com cone e adaptador para pequenas amostras, a temperatura de 25°C.

A viscosidade da solução do polímero produzido por *Pseudomonas elodea* foi medida em viscosímetro Brookfield modelo LVF, enquanto a força dos géis formados pelo mesmo biopolímero desacetilado, denominado PS-60, foi determinada no gelômetro, Marine Colloids, modelo GT-3 (KANG et alii 1982). A viscosidade da solução do polímero produzido por *Pseudomonas* sp NCMB, foi medida a 20°C, em viscosímetro capilar Ubbelohde (CHRISTENSEN et alii, 1985).

O polissacarídeo proveniente da fermentação por *Pseudomonas* sp., denominado EPS-5028, teve a viscosidade de sua solução medida a 25 °C e 60 rpm, com "spindle" 4, em Brookfield modelo LVT, sendo que, para estudos reológicos mais detalhados de soluções do polissacarídeo, foi utilizado o viscosímetro Ferranti-Shirley, com sistema cone e prato (MARQUÉS et alii, 1986).

CRESCENZI & DENTINI (1987) estudaram a influência das cadeias laterais nas propriedades das soluções diluídas, de polissacarídeos aniônicos produzidos pelas bactérias *Pseudomonas elodea*, *Alcaligenes* (ATCC 31555) e *Alcaligenes* (ATCC 31961). Todos estes três polissacarídeos na sua forma nativa são acetilados. O polissacarídeo produzido por *Pseudomonas elodea*, quando desacetilado, foi denominado PS-60. O polissacarídeo produzido por *Alcaligenes* ATCC 31555 contendo aproximadamente um grupo o-acetil para cada duas unidades repetidas de carboidrato, foi denominado S-130. O polissacarídeo produzido por *Alcaligenes* ATCC 31961, contendo grupos O-acetil em cada unidade de carboidrato, foi denominado S-194 . O PS-60 produz gel em presença de cátions, mono e divalentes, enquanto S-130 e S-194 não formam gel, mas produzem soluções altamente viscosas e estáveis a pH e temperatura.

Estudos de viscosidade foram feitos com o polissacarídeo produzido por *Rhizobium* CB744 , por BEYER & MELTON (1987). Soluções da goma de *Rhizobium* tiveram uma viscosidade que foi dependente da tensão de cisalhamento e do tempo de aplicação dessa tensão, e mostraram um comportamento tixotrópico. A solução a 1% apresentou uma viscosidade de 0.16 Pas, quando medida a 15°C e a 60 rpm, em viscosímetro Brookfield Synchro-Electric. A viscosidade da solução da goma mostrou um moderado decréscimo com a diminuição de pH e não sofreu alteração pela adição de cálcio. A adição de sacarose 15% p/v reduziu a viscosidade em 30%. A adição de menos de 2% de NaCl teve um pequeno efeito, mas 3% de NaCl teve uma considerável redução na viscosidade da goma. A goma não apresentou sinergismo com as gomas guar e xantana. Pasteurização e congelamento lento não apresentaram pronunciados efeitos sobre a viscosidade da solução da goma.

SCAMPARINI et alii (1990) e MOCHI & SCAMPARINI (1992), efetuaram medidas de viscosidade, em viscosímetro Brookfield, modelo RVT,

no estudo da estabilidade ao pH e à temperatura, para soluções de biopolímeros produzidos por isolados de *Xanthomonas manihotis*.

De acordo com SZCZESNIAK (1985) a construção de curvas de fluxo é extremamente útil para a caracterização de um hidrocolóide, quando o objetivo é escolher o mais apropriado para um determinado uso. Os mesmos autores afirmam que a tensão residual tem grande influência nas propriedades ligantes e de suspensão de um hidrocolóide.

3.11.1.2 Formação de gel

O ramo da Reologia que estuda o escoamento dos fluidos, usualmente relacionando tensão de cisalhamento com taxas de deformação, que classifica os fluidos em newtonianos e não-newtonianos, é insuficiente para descrever o comportamento de materiais, como soluções de polímeros, géis e espumas. Esse tipo de material requer o estudo de propriedades físicas mais complexas para a sua descrição, uma vez que eles podem exibir comportamento viscoelástico, isto é, exibem propriedades elásticas e viscosas ao mesmo tempo (CAMERON & PRUD'HOMME, 1990).

Vários autores, entre eles BIRD et alii (1977) e ZAHORSKY (1982) analisaram matematicamente o comportamento de materiais viscoelásticos. Entretanto, o tratamento é complexo e está fora do escopo do presente trabalho.

Um entendimento qualitativo do fenômeno é dado por MORRIS(1984). Se um material é um sólido hookeano, uma dada tensão aplicada corresponde a uma deformação, independente do tempo, sendo que a energia aplicada é recuperada com o corpo voltando à sua forma original. No outro extremo, para um fluido perfeitamente viscoso, não há recuperação de energia, sendo esta dissipada com a deformação permanente do material. Sistemas reais comportam-se como sólido e líquido; logo, para um material viscoelástico, uma parcela da tensão aplicada poderá ser parcialmente recuperada, devido às propriedades elásticas, enquanto parte poderá ser dissipada devido às propriedades viscosas.

Quando o objetivo é avaliar a capacidade de um polímero formar gel, a viscometria baseada na Lei de Newton e no seu desvio, é de pouca utilidade. Eventualmente, para soluções poliméricas de baixa concentração (alto caráter

viscoso e baixo caráter elástico) ela pode nos fornecer algumas informações sobre capacidade "espessante" de um polímero. Observa-se, para esse tipo de medida, quase sempre, comportamento no fluxo do tipo pseudoplástico, tornando possível a aplicação de modelos reológicos clássicos como Lei da Potência, Hershell-Bukley, Casson, dentre outros (SZCZESNIAK, 1985) Portanto, a utilização de reômetros e viscosímetros do tipo rotativo ou capilar, na determinação das propriedades reológicas de soluções poliméricas, deve ser de uso restrito.

Quando se deseja avaliar os componentes elástico e viscoso de um material deve-se efetuar medidas dinâmicas, onde uma tensão ou deformação oscilatória é aplicada sobre o material, no qual se mede a resposta relativa à tensão ou deformação, em uma determinada frequência. A principal razão desse procedimento é que o componente elástico é defasado do componente viscoso, isto é, quando o componente elástico é máximo, o componente viscoso é nulo. Na defasagem de 90° do ciclo de oscilação, tem-se o caso inverso. Isto pode ser explicado pela Lei de Hooke, na qual a tensão de resposta de um corpo elástico é proporcional à deformação aplicada, enquanto de acordo com a Lei de Newton para um fluido viscoso estabelece-se que a tensão de resposta é proporcional à taxa de deformação aplicada. Pode-se analisar o problema matematicamente, conforme abaixo:

Seja uma deformação aplicada a um corpo:

$$\gamma = \gamma_0 \text{ sen } \omega t$$

onde:

$$\gamma_0 = \text{deformação máxima}$$

$$\omega = \text{frequência angular}$$

$$t = \text{tempo}$$

A tensão de resposta, τ , dependente das propriedades do material, pode ser escrita como:

$$\tau = \tau_0 \text{ sen } (\omega t + \delta) = \tau_0 \cos \delta \text{ sen } \omega t + \tau_0 \text{ sen } \delta \cos \omega t$$

onde:

$$\tau_0 = \text{tensão aplicada}$$

$$\delta = \text{diferença de fase entre a tensão e a deformação}$$

A primeira parte da equação em questão pode ser interpretada como a parcela da tensão que está em fase com a deformação, sendo, portanto a resposta elástica; enquanto a segunda parte pode ser interpretada como a parcela da tensão que está fora de fase com a deformação, isto é, é a resposta viscosa.

A tensão pode ser expressa em termos de G' , módulo de estocagem, para a parte elástica e G'' , módulo de perda, para a parte viscosa, conforme a seguir:

$$G' = \frac{\tau_0 \cos \delta}{\gamma_0}$$

$$G'' = \frac{\tau_0 \sin \delta}{\gamma_0}$$

Esses dois módulos podem ser expressos por um único módulo chamado de módulo complexo G^* , conforme a seguir:

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

Da mesma forma, pode-se definir:

$$\text{Viscosidade dinâmica: } \eta^* = G^*/\omega$$

$$\text{Viscosidade complexa } \eta' = G''/\omega$$

Quando ω tende a zero, $\lim \eta' = \eta$, isto é, a viscosidade complexa torna-se igual à viscosidade newtoniana.

Pode-se definir também : $\tan \delta = G''/G'$,

onde δ mostra o quanto o material é elástico ou viscoso, isto é, se $\delta = 90^\circ$, o material é puramente viscoso e se $\delta = 0^\circ$, o material é puramente elástico.

A representação gráfica dos módulos G' , G'' , G^* , da viscosidade dinâmica η^* e da viscosidade complexa η' em função da frequência de deformação ω , é chamada de espectro mecânico do material.

MORRIS (1984) exemplificou bem o formato geral dos espectros mecânicos obtidos para polímeros, explicando também o efeito das tensões e deformações sobre a conformação estrutural. O autor em questão apresentou didaticamente o espectro mecânico através de uma figura, (Figura 1), interpretando o seu significado, conforme a seguir:

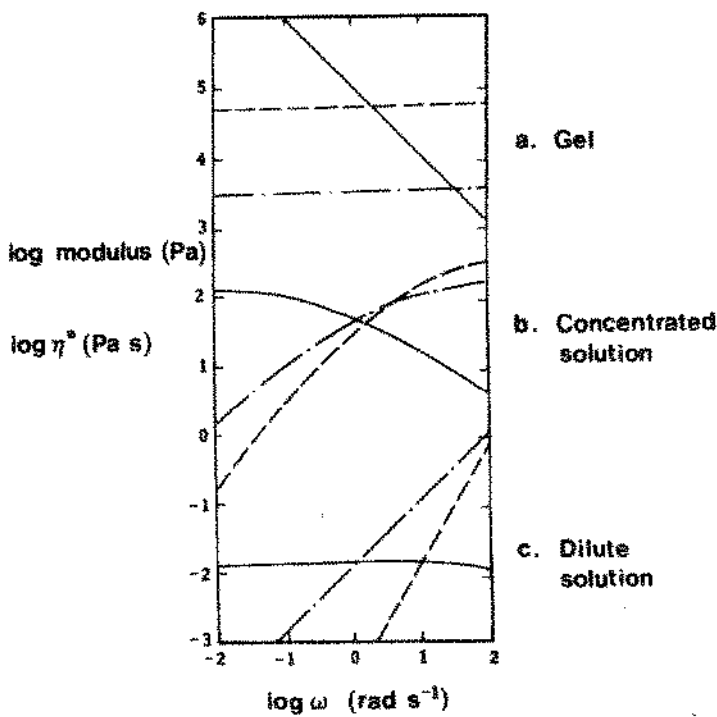


Figura 1 Dependência de G' (---), G'' (-·-·-) e η^* (—) com a frequência(ω) para: a) um gel forte 2% de agar; b) uma solução concentrada 5% p/v de carragena; c) uma solução diluída 5% p/v de dextrana (MORRIS, 1984).

1. Figura 1a, para um gel forte (agar-2% p/v) o módulo de estocagem G' é muito maior que o módulo de perda G'' , sendo praticamente paralelos e independentes da frequência de deformação. Esse é o comportamento esperado para uma estrutura com conformação perfeitamente elástica, onde a resposta é predominantemente elástica. Observa-se que a viscosidade dinâmica decresce linearmente, com uma taxa tendendo a -1, o que é esperado quando G' e G'' são constantes para a faixa de frequência de trabalho.

2. Figura 1c, para uma solução diluída (dextrana-5% p/v), o módulo de perda é substancialmente maior que o módulo de estocagem, evidenciando o predomínio das características viscosas, sendo que a viscosidade dinâmica permanece praticamente constante para toda a faixa de frequência. Nesse caso a estocagem de energia ocorre por contorção da estrutura do gel em conformação retorcida, tensionada, enquanto que a energia é perdida pelo movimento de translação no solvente. Para baixas frequências, o movimento de translação predomina, enquanto para frequências mais altas o movimento segmental interno predomina, aproximando o módulo de perda do módulo de estocagem

3. Figura 1b, solução concentrada (λ -carragenana-5% p/v), para baixas oscilações, o módulo de perda é maior que o módulo de estocagem, condição bastante semelhante ao caso de soluções diluídas, sendo que a viscosidade dinâmica é tipicamente newtoniana, isto é, independe da frequência. Por sua vez, o seu comportamento se aproxima do gel perfeito para frequências mais altas, nas quais o módulo de estocagem se torna maior que o módulo de perda. De acordo com o autor, para frequências mais baixas, as cadeias do polímero têm tempo suficiente para se desentrelaçar e fluir, enquanto para altas frequências, a rede se comporta como um gel formado por ligações cruzadas, pois não há tempo suficiente para os entrelaçamentos intercadeias serem desentrelaçados dentro do período de oscilação.

3.11.2 Fatores que influenciam as características reológicas

A estrutura dos géis é muito diversificada, podendo variar de partículas globulares altamente entrelaçadas, até malhas alongadas e fracas, influenciando diversas propriedades físicas, como elasticidade, difusão, ligação e textura.

Para MORRIS (1984) as interações funcionais dos hidrocolóides podem ser sumarizadas em termos de espessamento, quando existem entrelaçamentos de cadeias conformacionalmente desordenadas; e em termos de **estruturção**, quando se observa específicas associações entre cadeias em zonas de junção conformacionalmente ordenadas.

Uma extensa revisão das propriedades e estruturas dos géis foi efetuada por CLARK & ROSS-MURPHY (1987). De maneira geral, os géis podem ser dos seguintes tipos: 1-Filiformes: com estrutura semelhante à de fios alongados, retorcidos e fracos. 2-Agregados: quando são formados por malhas agregadas de fios alongados. 3- Com ligações cruzadas: quando são formados por polímeros de cadeias retas e longas as quais após um processo, ou naturalmente, formam ligações entre cadeias lineares. 4- Entrelaçados: são constituídos por macromoléculas ramificadas que são entrelaçadas. As junções são entrelaçamentos provocados por fenômenos físicos, não sendo ligações químicas. 5- Fractais: apresentam uma estrutura que pode parecer altamente desordenada, mas que mostra uma ordem repetitiva quando observada numa escala mais ampla. 6 - Partículas semelhantes a bastões: é uma estrutura de gel observada para polipeptídeos em hélice, semelhante a bastões alinhados, formando uma malha ou lâminas com a espessura de algumas moléculas.

A formação e modificação de géis com adição de íons de metais divalentes, especialmente cálcio, em polissacarídeos aniônicos, têm sido objeto de estudo por vários autores, como TAKO & NAKAMURA (1987), para xantana; MATSUMOTO & MASHICO (1990), para alginatos ; MORITAKA et alii (1991), para gelana; GAMINI et alii (1990), para pectatos e alginatos e ROCHAS & RINAUDO (1982 e 1984), para -carragenana.

Co-solutos, como a sacarose, podem induzir à formação de gel, aumentando a interação hidrofóbica através dos seus efeitos nas propriedades solventes da água (OAKENFULL, 1984 citado por BACK et alii).

A formação de gel por interação sinérgica de polissacarídeos, também tem sido objeto de intensa pesquisa por vários autores, como CURVELIER et alii (1987), para xantana-"carob"; NISHINARI et alii (1993),

para gelana-agarose; WILLIAMS et alii (1993) para xantana-glucomanana e IIDA et alii (1993), para "konjac"- kapa-carragena.

A temperatura e a força iônica do meio são outros dois parâmetros de extrema importância na modificação da estrutura dos géis e, conseqüentemente, das suas propriedades funcionais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Material permanente

Incubador - Agitador com Ambiente Controlado
marca New Brunswick Scientific, modelo Psychotherm;

Reômetro marca Haake, modelo CV-20, com os
acessórios: banho com controle de temperatura,
processador de dados, monitor e impressora;

Reômetro Programável marca Brookfield LV, modelo DVIII;

Viscosímetro marca Brookfield, modelo RVT;

Espectrofotômetro marca Beckman, modelo DU-70;

Banho marca Brookfield, modelo TC-500, com temperatura
controlada;

Estufa Bacteriológica marca Fanem;

Estufa de Secagem e Esterilização marca Fanem, modelo
315 SE;

Autoclave Vertical marca Phoenix, modelo AV-75;

Câmara de Fluxo Laminar marca Tecnal, modelo 115;

Centrífuga refrigerada marca SORVALL, modelo RC5C;

Potenciômetro marca Digimed, modelo DMPH-2;

Liofilizador marca Labconco modelo LYH.LOC 18;

Analizador de viscoelasticidade marca Vilastic, modelo 3, com os acessórios: banho com controle de temperatura, processador de dados, monitor e impressora;

Moinho de bola microtritador marca TECNAL, modelo TE-350;

Microscópio ótico binocular OLYMPUS - CBA;

Balança Semi- analítica, Micronal B-600;

Balança Analítica A & D, modelo FR-200.

4.1.2 Material de consumo

Os reagentes utilizados, todos p.a., foram das marcas Merck, Ecibra , Vetec e Sigma. Os meios de cultura utilizados foram da marca Difco.

4.1.3 Microrganismo utilizado

Foram utilizadas nas determinações dos parâmetros de produção do biopolímero, as cepas da bactéria *Beijerinckia* sp denominadas 7070 e 9102AA', que foram isoladas e identificadas neste trabalho.

4.1.4 Composição dos meios de isolamento, manutenção e propagação do microrganismo

O meio utilizado para isolamento, manutenção e propagação das bactérias foi o Meio I, YM (Yeast Malt) com a seguinte composição em g/l: Extrato de malte 3,0; Extrato de levedura 3,0; Peptona 5,0; Glicose 10,0 e Agar 20,0.

4.1.5 Composição do meio de enriquecimento

O meio de enriquecimento usado antes do isolamento foi o Meio II que contém todos os componentes do Meio I, com exceção de agar, nas mesmas concentrações.

4.1.6 Composição dos meios de produção de células

Os meios usados para produção de células foram : Meio III, com a seguinte composição em g/l : Extrato de malte 7,0, Extrato de levedura 7,0, Peptona 17,0 e Glicose 10,0. Meio IV, com a seguinte composição em g/l : Extrato de malte 7,0, Extrato de levedura 7,0, Peptona 17,0 e Sacarose 10,0. Meio V, com a seguinte composição em g/l : Extrato de malte 7,0, Extrato de levedura 7,0, Peptona 17,0 , Sacarose 10,0 e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,5.

4.1.7 Composição do meio de produção de biopolímero

Foram utilizados seis diferentes meios na fase de produção do biopolímero: Meios VI, VII, VIII, IX, X e XI, cujas composições são apresentadas a seguir:

Meio VI (SOUW & DEMAIN, 1979)

Componentes	(g/l)
Glicose	20
K ₂ HPO ₄	5,0
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
Ác. Cítrico	2,0
H ₃ BO ₃	0,006
ZnO	0,006
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,0024
CaCO ₃	0,02

O pH foi ajustado a 7.0

Meio VII - modificado (MANRESA et al 1987)

Componentes	(g/l)
Sacarose	20
Extrato de levedura	0.2
Triptose	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.7

O pH foi ajustado 6,5

Meio VIII

Componentes	(g/l)
Sacarose ou glicose	20 ou 50
Extrato de levedura	0,2
Triptose	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	2,7
KH ₂ PO ₄	13,62 (pH ajustado a 6,5)

Meio IX (MANRESA et alii, 1987)

Componentes	(g/l)
Sacarose	20
Extrato de levedura	0.2
Triptose	2.0
K ₂ HPO ₄	2.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.7
MnSO ₄	0.01
FeSO ₄	0.01
CaCl ₂	0.01

O pH foi ajustado a 7.0

Meio X (LÓPEZ & BACKING, 1968)

Componentes	(g/l)	
Glicose	20	
K ₂ HPO ₄	0,8	
KH ₂ PO ₄	0,2	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,025	
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05	
Na ₂ MoO ₂ .2H ₂ O	0,005	(pH ajustado a 6,6)

Meio XI (KANG & McNEELY, 1976)

Componentes	(g/l)	
Glicose	30	
K ₂ HPO ₄	5,0	
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1	
NH ₄ NO ₃	0,9	
Promosoy	0,5	(pH ajustado a 7,0)

4.2 Métodos

4.2.1 Isolamento da bactéria

As amostras foram coletadas durante um ano e meio, com intervalo de dois meses, em locais pré-estabelecidos nas lavouras de cana-de-açúcar e na planta de produção de uma usina de açúcar e álcool situada na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

4.2.1.1 Isolamento das bactérias da terra cultivada com cana-de-açúcar.

A coleta foi efetuada em quatro lavouras de cana, pré-estabelecidas. Sobre o mapa das lavouras fornecido pela indústria, foram determinados aleatoriamente três pontos de cada lavoura, com extensão de 100 m², que foram subdivididos em cinco de 20 m², dos quais foi sorteado um ponto, aleatoriamente, onde foi retirada cada amostra de terra. As amostras, dentro de cada ponto sorteado, foram colhidas em 1m² de superfície. A terra coletada foi subdividida conforme amostragem estatística utilizada pela própria usina para análise de solo. As amostras foram recolhidas em latas esterilizadas.

As amostras, com peso de 100 g, foram colocadas em meioYM, líquido na proporção 1: 1 peso/peso e mantida à temperatura ambiente, a 150 rpm, por duas horas. Então, uma alçada de líquido, era transferida para placa de Petri contendo o meio I.

As placas foram incubadas à 24 °C por 48 horas. As colônias gomositas foram replaqueadas em placa de Petri contendo o meio I, usando as mesmas condições descritas anteriormente, até a obtenção de cultura pura.

4.2.1.2 Isolamento das bactérias do caldo de cana e água de lavagem de diferentes ponto da usina de açúcar e álcool.

As amostras de água de lavagem foram retiradas do primeiro, terceiro e sexto terno de lavagem. As amostras de caldo de cana foram retiradas da

entrada do reservatório de caldo que vai para fermentação e da dorna número sete. As amostras foram recolhidas em frascos esterilizados com capacidade de um litro .

O plaqueamento foi efetuado no mesmo dia da coleta. Utilizou-se uma alçada da amostra por placa de Petri contendo o Meio I, o crescimento e o isolamento das colônias foram feitos como descrito anteriormente, em 4.2.1.1.

4.2.1.3 Isolamento das bactérias da cana-de-açúcar

As amostras foram coletadas nos mesmos locais sorteados para coleta de terra. Em cada ponto, foram coletadas dez amostras de cana escolhidas aleatoriamente.

As canas foram cortadas utilizando-se como amostras somente a primeira terça parte da raiz para cima, a qual, após picada, foi colocada em erlenmeyer esterilizado, com capacidade de 1 litro. Foi adicionado o Meio I na proporção de 1:1 peso/peso, e os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm à temperatura ambiente por duas horas.

Utilizou-se uma alçada do líquido para o crescimento em placa de Petri, contendo o Meio I. As condições de isolamento e crescimento das bactérias foram as mesmas do item 4.2.1.1.

4.2.2 Obtenção de cultura pura

O método utilizado para obtenção da cultura pura dos isolados foi o de esgotamento por estrias, em placas de Petri contendo o Meio I, nas quais, utilizando-se uma alça de platina com a bactéria, foram feitas estrias de esgotamento de acordo com o método descrito por MURO & LUCHI (1989). As placas inoculadas foram colocadas em posição invertida, na estufa, nas temperaturas de 24 a 27°C. Para avaliar a pureza da cultura, foi feita a coloração de Gram em lâmina onde se conferiram as características microscópicas e fenotípicas das colônias isoladas.

4.2.3 Manutenção e propagação do microrganismo

Para a manutenção e propagação, as culturas puras foram semeadas em tubos inclinados contendo 6 ml de Meio I e estes foram incubados por 24 horas à temperatura de 24 ou 27°C e, após, foram mantidos a 4°C. As culturas foram reativadas a cada 30 dias. As bactérias selecionadas permaneceram neste meio até ser feita a série bioquímica para cada uma delas. Após a série bioquímica, as bactérias de interesse para testar a produção de biopolímeros foram armazenadas liofilizadas ou em porcelana.

As culturas puras, para serem mantidas por liofilização, foram culturas de 24 horas crescidas em temperaturas de 24 a 27°C

As culturas puras, para serem mantidas em porcelanas, foram preparadas em tubos inclinados contendo 6 ml de Meio I, por 24 horas, à temperatura de 24 a 27°C e transferidas para os cilindros de porcelana esterilizados em frascos esterilizados, contendo uma camada de sílica gel com indicador e uma camada de aproximadamente 2/3 de lã de vidro, segundo BERGDOLL (1993).

4.2.4 Reativação das células

A cultura liofilizada foi suspensa em 1 ml de solução N (NYGB), com a seguinte composição em g/l : Peptona 5,0, Extrato de levedura 3,0 e 2,0 ml de glicerol. Esta suspensão foi adicionada a 50 ml de Meio II em erlenmeyer de 250 ml. Após incubação a 24°C e 100 rpm por 24 horas obtivemos o inóculo que foi usado na etapa de produção de células e de polissacarídeos.

A preparação do inóculo, a partir da cultura mantida em porcelana foi feita da seguinte maneira : colocaram-se um ou dois cilindros de porcelana em 50 ml de Meio II ou III, em erlenmeyer de 250 ml, os quais foram incubados nas mesmas condições do inóculo preparado a partir da cultura liofilizada.

4.2.5 Seleção da bactéria

Os testes preliminares utilizados para selecionar as bactérias que apresentaram colônias gomosas em placa de Petri, foram: morfologia, testes de Gram, catalase e oxidase segundo BERGEY (1984) e DOBEREINER & RUSCHEL (1958).

4.2.6 Identificação da bactéria

Os microrganismos que produziram a maior quantidade de biopolímero em meio líquido foram identificados através das características morfológicas e fisiológicas de acordo com BERGEY (1984), e por testes complementares de acordo com COSTILOW (1974) e DOBEREINER & RUSCHEL (1958).

4.3 Cinética de crescimento celular

Após a identificação da bactéria, foi determinada a cinética de crescimento para a cepa 7070 de *Beijerinckia* sp no Meio IV.

4.3.1 Curva Padrão de Crescimento Celular

1 - Foi feito pré-inóculo de 18 h com 50 ml de Meio IV, e uma alçada da cultura do isolado, o qual foi incubado à temperatura de 27°C e 100 rpm por 18 horas;

2 - Foram feitas diluições com esses caldos;

3 - Foi colocado 1 ml de cada diluição em placa de Petri, usando-se o método "pour-plate". A incubação foi feita a 27°C por 24 horas;

4 - As leituras de absorvância, para cada diluição, foram feitas em espectrofotômetro DU-70 Beckman, em comprimento de onda de 550 nm, utilizando-se água destilada para calibração do aparelho;

5 - Foram feitas as contagens das Unidades Formadoras de colônias (UFC) de cada placa, em cada diluição;

6 - Determinou-se a concentração celular do meio de cultura realizando-se simultaneamente as medidas indiretas do crescimento bacteriano pelo método indireto (medição de D.O) e pelo método direto (contagem de UFC). Estabeleceu-se graficamente a relação entre os valores obtidos pelos métodos direto e indireto.

4.3.2 Cinética do crescimento da cepa 7070 de *Beijerinckia* sp

4.3.2.1 Determinação da quantidade de sacarose a ser utilizada

Após a obtenção da curva de crescimento da cepa 7070, para determinar a cinética de crescimento em condições ideais, foi utilizado o Meio IV, com concentrações de sacarose variando de 0,1 até 5,0% para determinar a quantidade ideal de sacarose requerida pela bactéria para seu crescimento. A quantidade de açúcar residual foi determinada pelo método de NELSON (1944) utilizando-se uma curva padrão de glicose com concentrações de glicose variando de 25 a 200 µg/ml.

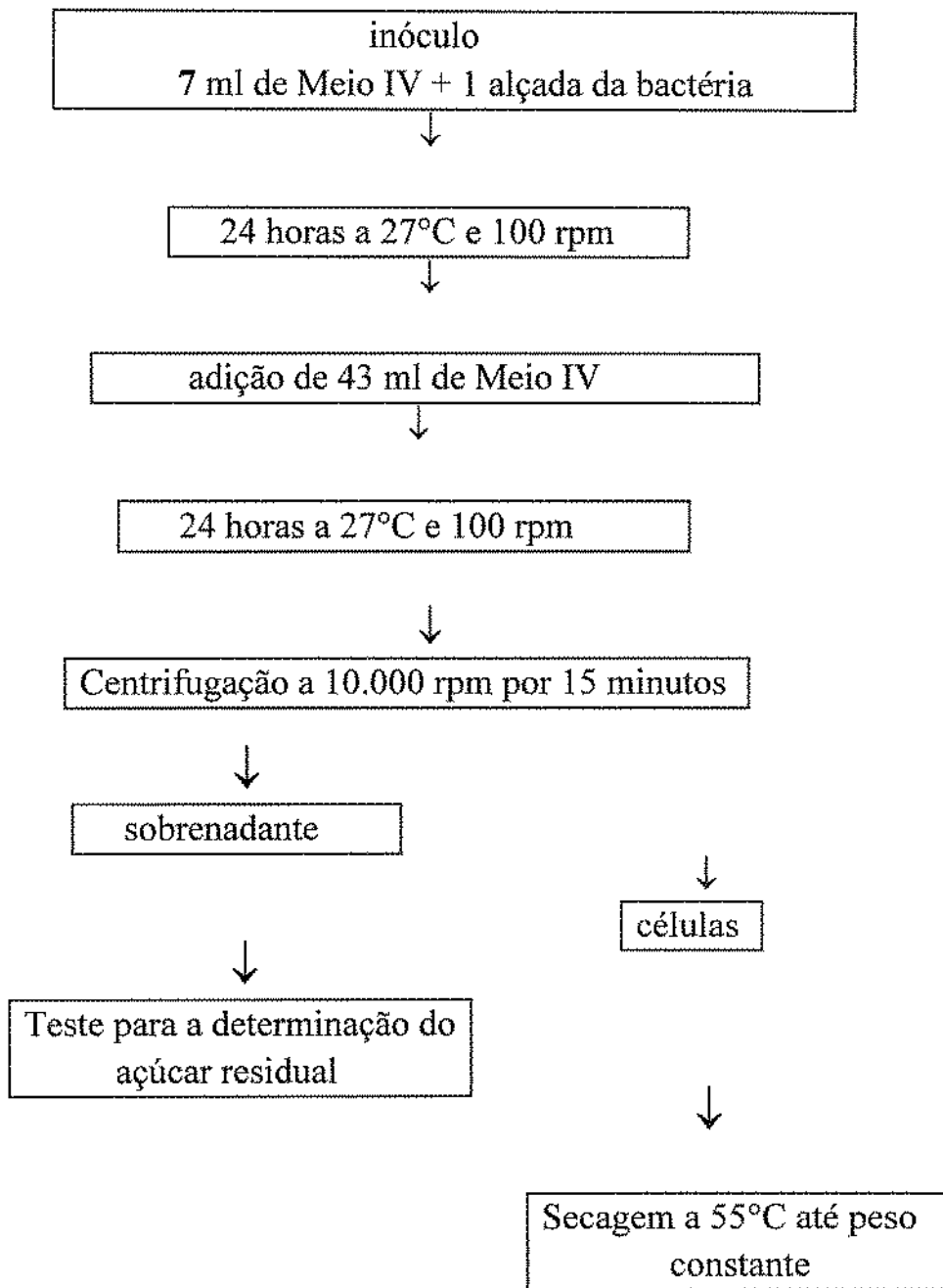


Figura 2 Fluxograma da produção de células da cepa 7070 de *Beijerinckia* sp no Meio IV, contendo 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 % de sacarose.

4.3.2.2 Cinética do crescimento no Meio IV, contendo 2 % de sacarose

A cinética do crescimento celular foi determinada segundo o fluxograma mostrado na Figura 3.

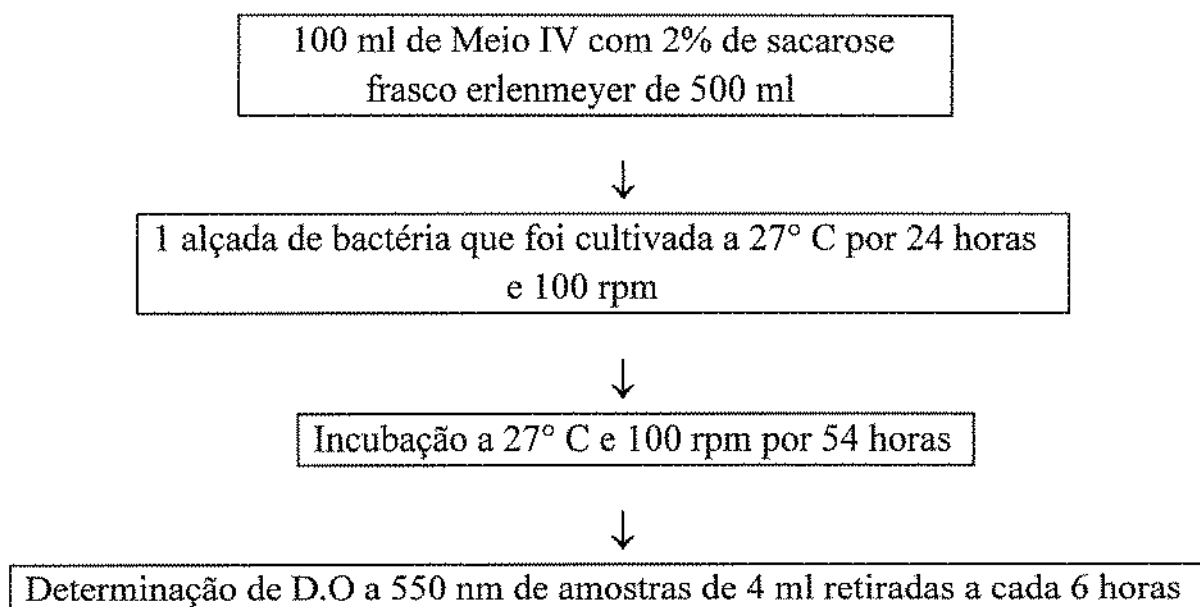


Figura 3 Fluxograma adotado na produção de células da cepa 7070 de *Beijerinckia* sp, no meio IV, contendo 2 % de sacarose.

4.4 Preparação do inóculo

A preparação do inóculo foi realizada em todas as etapas deste trabalho utilizando-se o Meio III, IV ou V, ao qual foi inoculado uma alçada da cultura de 24 horas a 27°C, equivalente a 4×10^6 de UFC por ml. O Meio utilizado foi então incubado na temperatura requerida para fermentação e a agitação foi sempre igual a 100 rpm.

4.5 Produção de biopolímero

4.5.1 Produção de biopolímero na fase de pré-seleção das linhagens

Durante o processo de seleção de linhagens, a produção de biopolímero foi efetuada adicionando-se 350 ml de Meio VII, em erlenmeyers de 500 ml, os quais foram incubados a 27 °C e 200 rpm por 96 horas e recuperados conforme descrito no item 4.6.1.

4.5.1.1 Influência do meio de fermentação

Foram realizados ensaios utilizando-se as cepas 1175A, 4342, 7070 e 9102AA', nos seguintes meios de produção de biopolímero : Meios VI, VII, VIII com 2% de sacarose, IX, X e XI. Os ensaios foram desenvolvidos utilizando-se um total de 350 ml de meio, do qual 15 % era volume de inóculo, em erlenmeyer de 500 ml. O pH foi ajustado de acordo com o especificado em cada meio. As condições de fermentação foram 96 horas, a 27 °C e 200 rpm.

O biopolímero produzido foi recuperado de acordo com o item 4.6.1. As quantidades de biopolímeros produzidos por estas cepas em cada um dos meios estão na Tabela 2.

4.5.1.2 Influência do meio de produção de células

Visando a verificar a influência do meio usado na produção de células, foram utilizados dois meios de produção de células combinados com dois meios de produção de biopolímero. Os ensaios foram feitos utilizando-se o Meio III de produção de células com os Meios VII e VIII de produção de biopolímero, contendo 50 g/l de sacarose. Da mesma forma, combinou-se o Meio IV de produção de células com os Meios VII e VIII de produção de biopolímero, contendo 50 g/l de sacarose. As condições de fermentação foram 96 horas, a 27°C e 200 rpm.

4.5.1.3 Influência do pH do meio de fermentação na produção do biopolímero

Os ensaios para avaliar o efeito do pH do meio na produção do biopolímero, foram realizados utilizando-se 300 ml do Meio VIII contendo 50 g/l de sacarose em Erlenmeyers de 500 ml, aos quais foram adicionados 15 % (v/v) de inóculo. Os valores de pH do meio de fermentação foram 5,8; 6,2; 6,5; 6,8 e 7,0. O ajuste do pH foi feito com soluções 1N de HCl ou NaOH. As condições da fermentação foram 96 horas, 27°C e 200 rpm.

4.5.1.4 Influência da concentração e tipo de açúcar

Os ensaios visando a avaliar o efeito da concentração e tipo de açúcar utilizados no Meio VIII para produção do biopolímero com a cepa 7070 e cepa 9102AA', foram realizados utilizando-se 300 ml deste meio, contendo 20 e 50 g/l (2 e 5%) de glicose ou sacarose a pH 6,5 e 7,0. Ao meio de fermentação foram adicionados 15 % (v/v) de inóculo da cepa em estudo, sendo este produzido da mesma forma que no item 4.4.

As condições de fermentação foram 96 horas, a 27°C e 200 rpm. O biopolímero foi recolhido de acordo com o procedimento descrito em 4.6.1.

4.5.1.5 Influência da temperatura

Os ensaios para avaliar o efeito da temperatura, na produção de biopolímero, utilizando-se o Meio VIII, com glicose 50 g/l e Meio VIII com sacarose 50 g/l, a pH 6,5, foram realizados em frascos erlenmeyer de 500 ml, com 300 ml de meio de fermentação. Em cada frasco foram adicionados 15% (v/v) de inóculo cultivado por 24 horas na temperatura em estudo e a 100 rpm.

As condições de fermentação para cada temperatura em estudo foram 96 h, a 200 rpm.

As condições de cada experimento, utilizando-se o isolado *Beijerinckia* sp cepa 7070, são apresentadas na Figura 4 e 5.

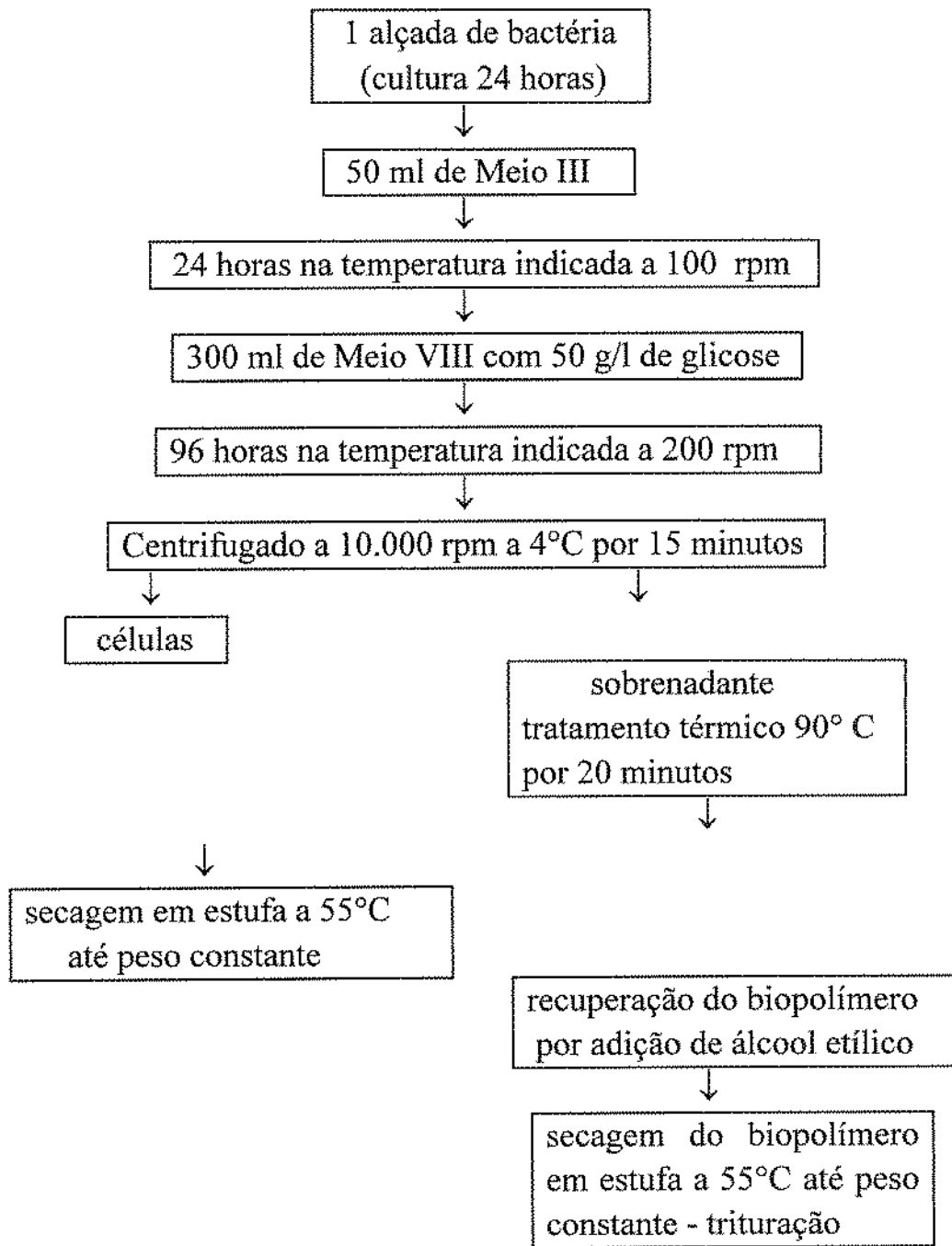


Figura 4 Fluxograma adotado na produção do biopolímero com a cepa 7070 de *Beijerinckia* sp a partir de glicose, nas temperaturas de fermentação de 15, 20, 24, 27 e 30°C.

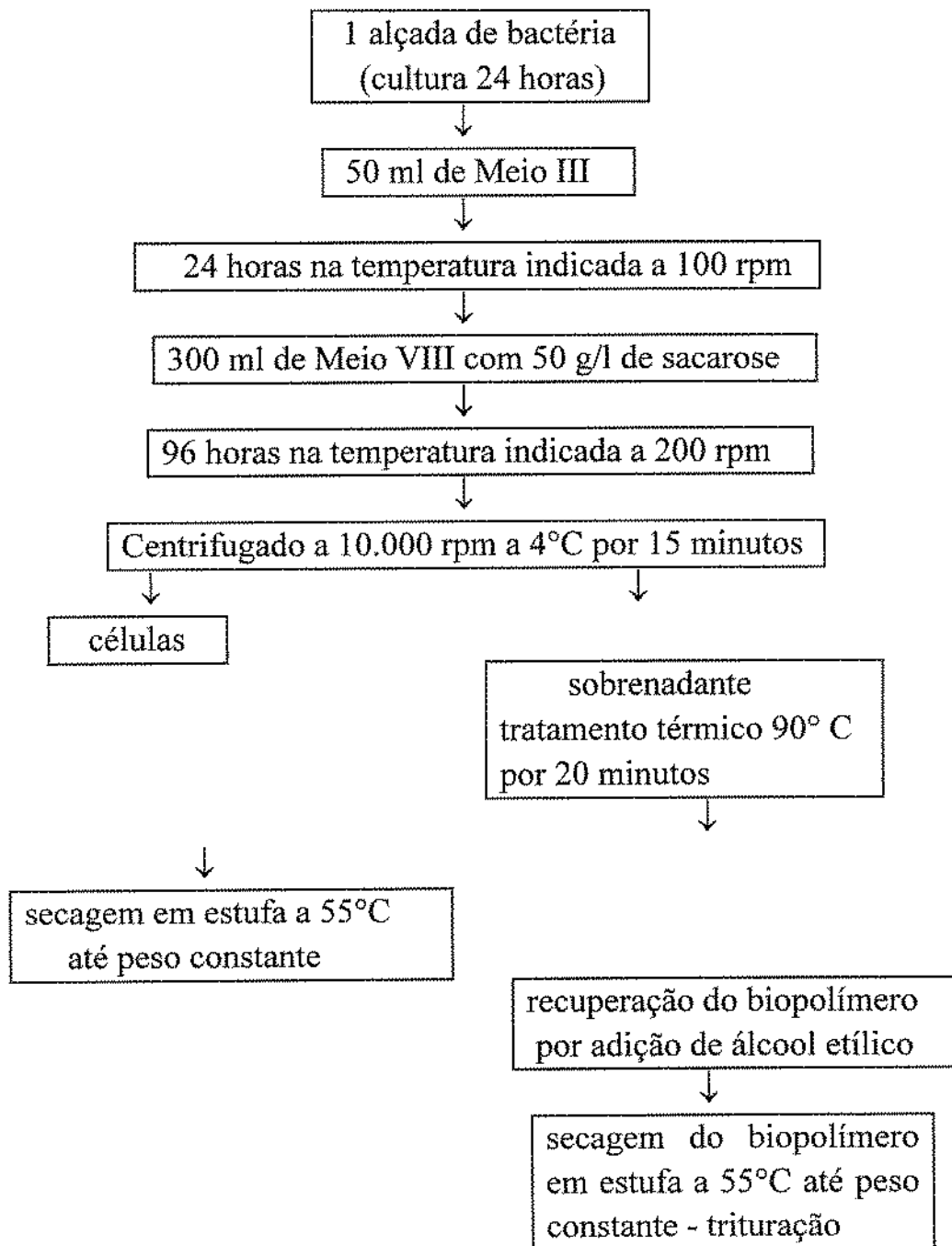


Figura 5 Fluxograma adotado na produção do biopolímero com a cepa 7070 de *Beijerinckia* sp, a partir de sacarose nas temperaturas de fermentação de 15, 20, 24, 27 e 30° C.

Foram avaliados nesses ensaios: a) a quantidade de biopolímero produzido; b) o pH final do meio de fermentação; c) a viscosidade aparente do caldo no final da fermentação; d) a quantidade de açúcar residual após a fermentação; e) a quantidade de células secas residuais; f) o rendimento de biopolímero em relação à quantidade inicial de glicose ou sacarose do meio de fermentação.

4.5.1.6 Influência do volume do meio

Para avaliar a influência do volume do meio na produção descontínua do biopolímero, utilizando-se erlenmeyer com capacidade de 500 ml foi realizado ensaio com o Meio III de produção de células e Meio VIII com 5% de sacarose em quatro diferentes volumes, sendo : 20, 40, 60 e 80 ml de Meio III e a cada um foi adicionado 4 vezes o volume de Meio VIII, obtendo-se 100, 200, 300 e 400 ml de volumes totais, respectivamente. As condições do ensaio foram : 96 horas a 20°C e 200 rpm.

4.5.1.7 Influência do volume de células no meio de produção de biopolímero

O ensaio para avaliar a influência do volume de células no meio de produção de biopolímero foi efetuado, produzindo-se células em seis erlenmeyer, de 500 ml, contendo 50 ml de Meio III. Foram utilizadas para produção de células as seguintes condições : 24 horas a 20 °C e 100 rpm. Para metade do ensaio, foram utilizados três erlenmeyer, contendo 50 ml do sobrenadante do meio de células que foi centrifugado, no qual foi adicionado 300 ml de Meio VIII, com 5% de sacarose; meio de produção de biopolímero. Aos outros três erlenmeyer com o meio de produção de células não centrifugados, foi adicionado, igual volume do meio de produção de biopolímero. As condições de fermentação foram 96 horas a 20 °C e 200 rpm. O biopolímero, foi recolhido de acordo com o procedimento descrito em 4.6.1.

4.6 Recuperação do biopolímero

4.6.1 Recuperação do biopolímero natural

Após o término da fermentação, o meio foi centrifugado a 10.000 rpm, a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi submetido ao tratamento térmico a 90°C por 20 minutos, resfriado a 25°C e o biopolímero foi precipitado com três vezes o volume de etanol 95%. O biopolímero precipitado foi recolhido em peneiras e seco a 55 °C até peso constante, sendo finalmente triturado em moinho de bolas por 1 minuto. As amostras foram armazenadas em vidros com capacidade de 80 ml, tampados e lacrados com parafilme.

4.6.2 Recuperação do biopolímero desacetilado

Quando a fermentação completou 96 horas, o caldo de fermentação foi centrifugado a 10.000 rpm e 4°C por 15 minutos, e o sobrenadante teve seu pH ajustado para 10, com solução de KOH 4N ou solução de NaOH 4N. O sobrenadante foi então aquecido a 90°C por 20 minutos e, após, resfriado a 25°C; o pH foi ajustado a 7,0 e o biopolímero foi precipitado com três volumes de etanol 95 % . O precipitado foi recolhido em peneiras e seco a 55°C até peso constante. Após a secagem, foi dissolvido em água deionizada na concentração de 1% e centrifugado, precipitado novamente, seco, triturado e armazenado da mesma forma que no item 4.6.1.

4.7 Determinação dos constituintes do biopolímero

4.7.1 Purificação do biopolímero

O biopolímero foi dissolvido a 1 % em água deionizada e foi dialisado contra água deionizada por 48 horas. A diálise foi feita em tubos de diálise,

membrana de celulose marca Sigma, com capacidade de retenção de peso molecular de 12.000 Daltons ou maior.

Após a diálise, o biopolímero foi reprecipitado com etanol 95 % e seco a 55°C até peso constante.

4.7.2 Hidrólise total do biopolímero

Três gramas do biopolímero foram adicionadas a 100 ml de ácido clorídrico 1 N e a solução foi aquecida sob refluxo a 70°C por 16 horas, em banho com temperatura controlada.

A solução foi neutralizada com bicarbonato de sódio e deionizada pela adição de uma mistura em quantidades iguais das resinas Amberlite IR 120, forma H⁺, 28-35 mesh e Amberlite IR 45, forma ⁻OH, 28-35 mesh. O material não retido nas resinas foi liofilizado e, posteriormente, utilizado na determinação dos componentes do biopolímero.

4.7.3 Identificação dos produtos da hidrólise total do biopolímero

Os resíduos de açúcares neutros foram identificados por cromatografia descendente, durante 24 horas, em papel Whatman nº 1, sendo o solvente empregado Acetato de etila, piridina e água, na proporção de 8:2:1 (v/v) segundo método descrito por ASPINALL & JIANG (1974). Os reveladores usados foram p-anisidina-ácido ftálico e nitrato de prata e hidróxido de sódio alcohólico, segundo KREBS et alii (1969).

A identificação dos ácidos galacturônico e glucurônico foi feita por cromatografia em camada delgada, ascendente, em placa de sílica, em cuba pré-equilibrada, utilizando-se como solvente isobutanol : ácido acético : água, na proporção 2:1:1 (v/v), segundo método utilizado por HAY, LEWIS e SMITH (1963). O revelador utilizado foi ácido sulfúrico concentrado.

Os componentes específicos foram determinados por vários testes colorimétricos. Para ácido urônico, o teste de carbazol; para o ácido galacturônico, o teste de carbazol modificado; para o ácido glucurônico em

presença de manose, o teste com ácido tioglicólico e ácido sulfúrico, de acordo com os métodos de DISCHE (1955 e 1962).

4.8 Comportamento reológico de soluções de biopolímeros

4.8.1 Viscosidade do caldo de fermentação

A viscosidade do caldo de fermentação foi determinada no final da fermentação, utilizando-se o Brookfield RVT, "spindle" 21, 50 rpm e 25 °C. As medidas foram feitas em triplicata para cada amostra.

4.8.2 Viscosidade aparente de soluções aquosas

A viscosidade aparente das soluções aquosas com 1% de biopolímeros obtidos na fase da seleção das bactérias foi determinada com o mesmo equipamento e condições descritas anteriormente.

4.8.3 Curvas reológicas de soluções aquosas

As avaliações do comportamento reológico das soluções aquosas preparadas com 6 %, de biopolímero em água deionizada a pH 7,0, foram realizadas no reômetro Haake, modelo CV 20, à temperatura de 25°C. Os biopolímeros utilizados foram os obtidos nas fermentações a 15, 20, 24, 27 e 30°C em Meio VIII contendo 5% de glicose ou sacarose. As amostras foram preparadas por aquecimento a 70°C por 40 min . Após resfriadas, eram submetidas a vácuo, visando a remover bolhas de ar.

O estudo do comportamento reológico medido nas temperaturas de 25, 45 e 65 C foi realizado com a amostra produzida por fermentação com Meio VIII, contendo 5% de sacarose. O preparo das amostras, equipamento e condições foram as mesmas do item anterior.

O estudo comparativo do comportamento reológico entre a solução aquosa contendo 6% do biopolímero produzido segundo o método descrito na Figura 5 , antes e após o tratamento térmico de 121°C por 30 min foi feita a pH 7,0, a 25 e 65 °C. O preparo das amostras, equipamento e condições foram as mesmas do item anterior.

O estudo do comportamento reológico de soluções aquosas contendo 1% de biopolímero em água deionizada a valores de pH 3,0, 7,0 e 11 foi determinado em reômetro Brookfield LV - DVIII, com "spindle" SC4-31. As amostras foram preparadas da mesma forma descrita anteriormente .

Visando a verificar se soluções aquosas do biopolímero tinham capacidade de formar gel, foram realizados estudos utilizando-se um analisador de viscoelasticidade marca Vilastic. Para obtenção dos espectros mecânicos foram preparadas as seguintes soluções aquosas, contendo 3 ou 6 % de biopolímero em água deionizada: 1 -Amostra com 6 % de biopolímero em água deionizada. 2 - Amostra com 6 % de biopolímero e 50 mM de CaCl₂. 3 - Amostra com 6% de biopolímero e 30 % de sacarose. 4 - Amostra com 3% de biopolímero e 0,6 % de goma guar. O biopolímero utilizado foi o produzido na fermentação, no Meio VIII com sacarose, a 27°C, o qual foi denominado B-27. Todos os espectros mecânicos foram obtidos na temperatura de 0°C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação do microrganismo

As cepas 7070 e 9102AA', produtoras de biopolímero extracelular, isoladas de solo cultivado com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), foram identificadas como bactérias do gênero *Beijerinckia*. As características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das cepas 7070 e 9102AA' estão ilustradas na Tabela 2. As Figuras 1 e 2 mostram colônias dessas cepas.

Tabela 2 Características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas da *Beijerinckia* sp, cepas 7070 e 9102AA'

	Cepa 7070	Cepa 9102AA'
Morfologia	Bastonete	Bastonete
Coloração de Gram	-	-
Temperatura de crescimento 10 a 37 °C	+	+
Temperatura ótima 15 a 30 °C	+	+
Crescimento: Em meio sem nitrogênio	+	+
Quantidade de biomassa Em meio sem nitrogênio	0,4-0,6 g/l	0,3-0,5 g/l
Em meio com nitrogênio	1,8-2,0 g/l	1,8-2,0 g/l
Bom crescimento em meio com:		
glicose	+	+
sacarose	+	+
maltose	+	+

Crescimento fraco em meio com:		
galactose	+	+
Motilidade	+	+
Coloração das colônias em meio:		
YM	Amarela	Amarela
NA	Branca	Branca
Específico p/ Beijerinckia	Transparente	Transparente
Crescimento em :		
Aerobiose	+	+
Anaerobiose	+	+
Oxidase	-	-
Catalase	-	-
Benzidina	+	+
H ₂ S em Meio TSI	-	-
Gás	+	+
Ácido(fundo)	+	+
Urease	-	-
Indol	-	-
Vermelho de metila	-	-
Voges Proskauer	+	+
Citrato	+	+
Liquefação de gelatina	-	+
Presença de nitrogenase	+	+

O. F (Glicose)		
Tubo aberto/fechado	Fermentativa	Fermentativa
produz gás	+	+
produz ácido	+	+
O.F.(Sacarose)		
Tubo aberto/fechado	Fermentativa	Fermentativa
Produz gás	+	+
Produz ácido	+	+
BGA	cresce	cresce
Fermentação da lactose	-	-
McConkey	cresce	cresce
Fermentação da lactose	-	-
Meio NA a 37 °C	cresce	cresce
Meio YM	Formou película superficial característica de Beijerinckia	
Meio específico Beijerinckia	cresce	cresce
Com CaCl ₂	cresce	cresce
Com CaCO ₃	cresce	cresce
Com 0,5% NaCl	não cresce	não cresce
Peptona agar 25 a 27 °C	cresce	cresce
Tolerância a pH 3,5 - 8,0	+	+
TFT	cresce	cresce
EMB	cresce	cresce
Fermentação da sacarose	+	+
Redução de nitrato	+	+
Sudan Black		
Presença de corpos lipóides	+	+



Figura 6 - Colônias da cepa 7070 de *Beijerinckia* sp, em meioYM 24 horas, de incubação a 20 °C

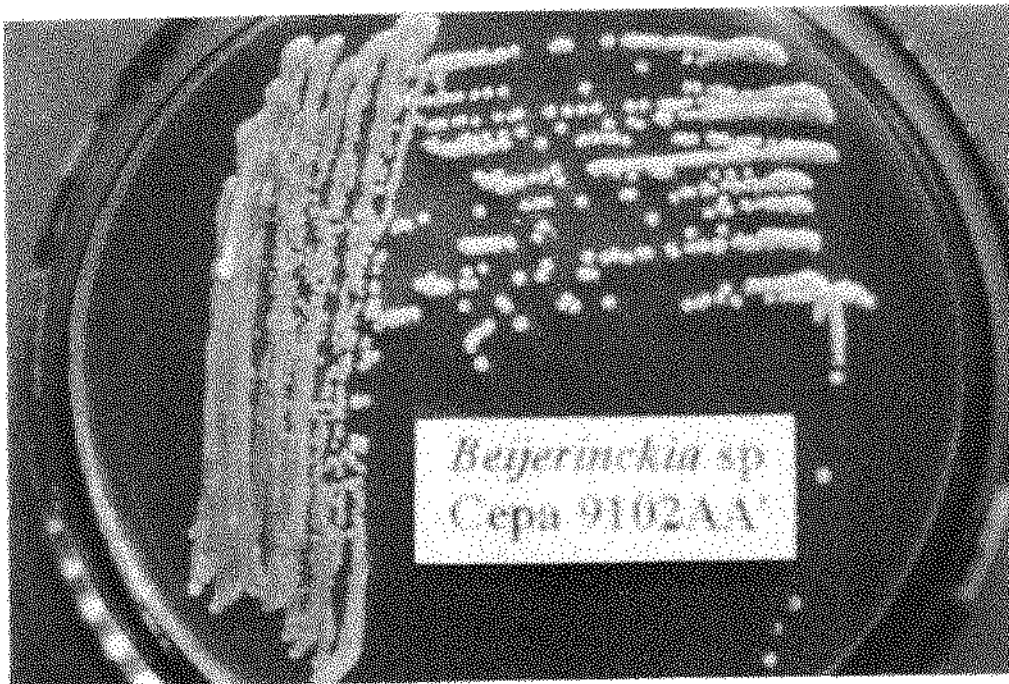


Figura 7 - Colônias da cepa 9102AA' de *Beijerinckia* sp em meio YM 24 horas, incubação a 20°C.

5.2 Cinética de crescimento celular

Os resultados da determinação do crescimento celular da cepa 7070 de *Beijerinckia* sp, em meio com concentrações de 0,1 a 5,0% de sacarose , de acordo com o item 4.3.2.1 , são apresentados na Figura 8. Como pode ser visto, o melhor crescimento ocorreu a partir de 1% de sacarose, não havendo proporcionalidade entre o aumento da concentração de sacarose no meio de produção de células e a quantidade de células produzidas, isto para as concentrações testadas. A concentração a 1% de sacarose foi considerada a melhor, tendo em vista que resultou em menor quantidade de açúcar residual no final de 48 horas. Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados por VOLPATO e SCAMPARINI (1993), para isolados de *Xanthomonas* e *Alcaligenes*.

A Figura 9 mostra a curva padrão de crescimento celular de *Beijerinckia* sp cepa 7070 que foi utilizada durante a fase de desenvolvimento do estudo do melhor meio de produção do biopolímero, com a finalidade de padronizar o inóculo.

A Figura 10 mostra a cinética de crescimento celular da cepa 7070 de *Beijerinckia* sp, determinada no meio contendo 1% de sacarose, nas condições descritas no item 4.3.2.2. Como pode ser visto nessa figura, esta bactéria tem um crescimento rápido neste meio e nas condições em que foi testada, sendo que a fase **log** estava completada com 18 horas.

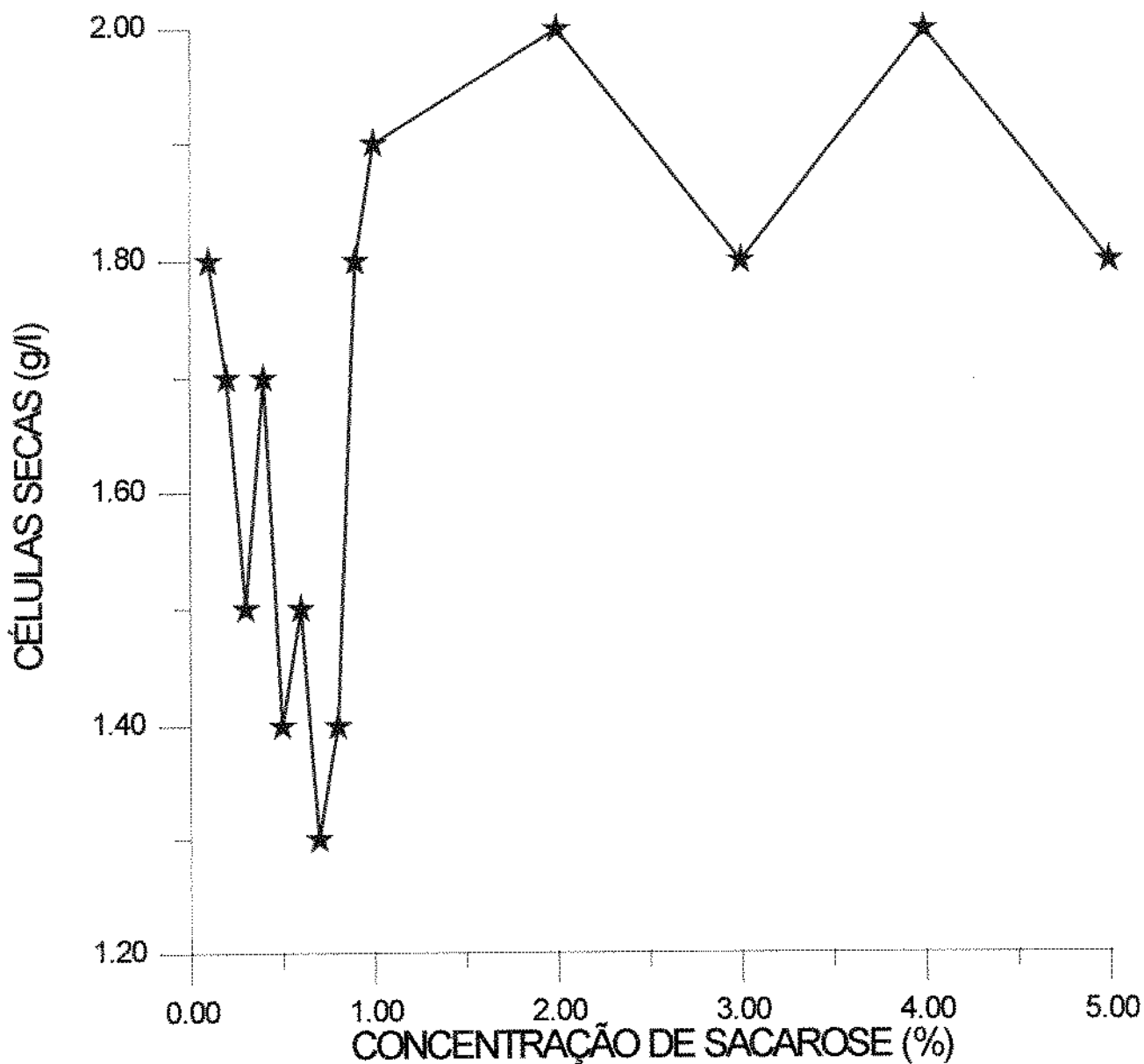


Figura 8 Quantidade de células secas (g/l) obtidas nas concentrações de sacarose de 0,1 a 5,0 % no meio III de produção de células com a cepa 7070 de *Beijerinckia* sp.

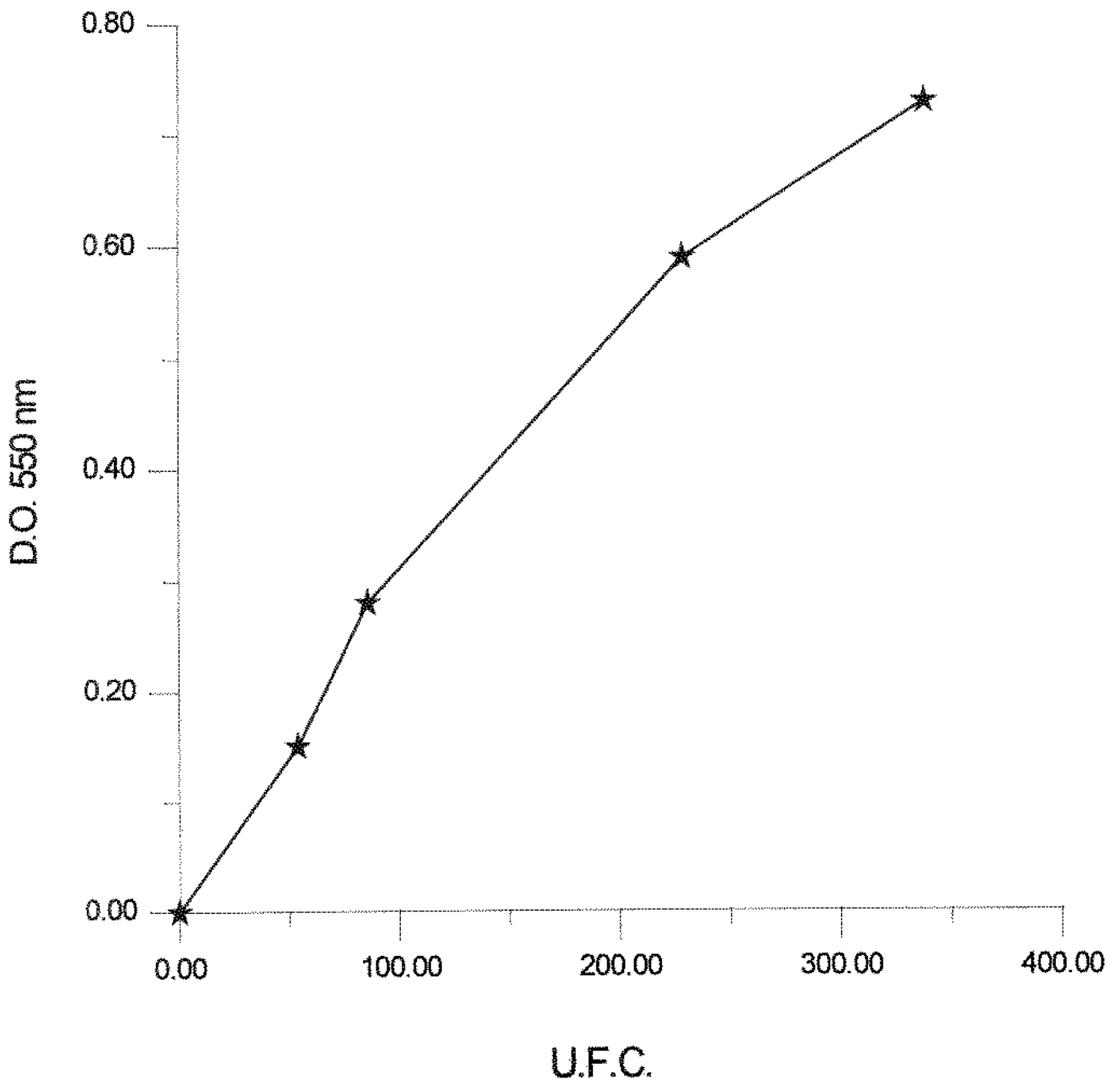


Figura 9 Curva Padrão de Crescimento Celular de *Beijerinckia cepa* 7070.

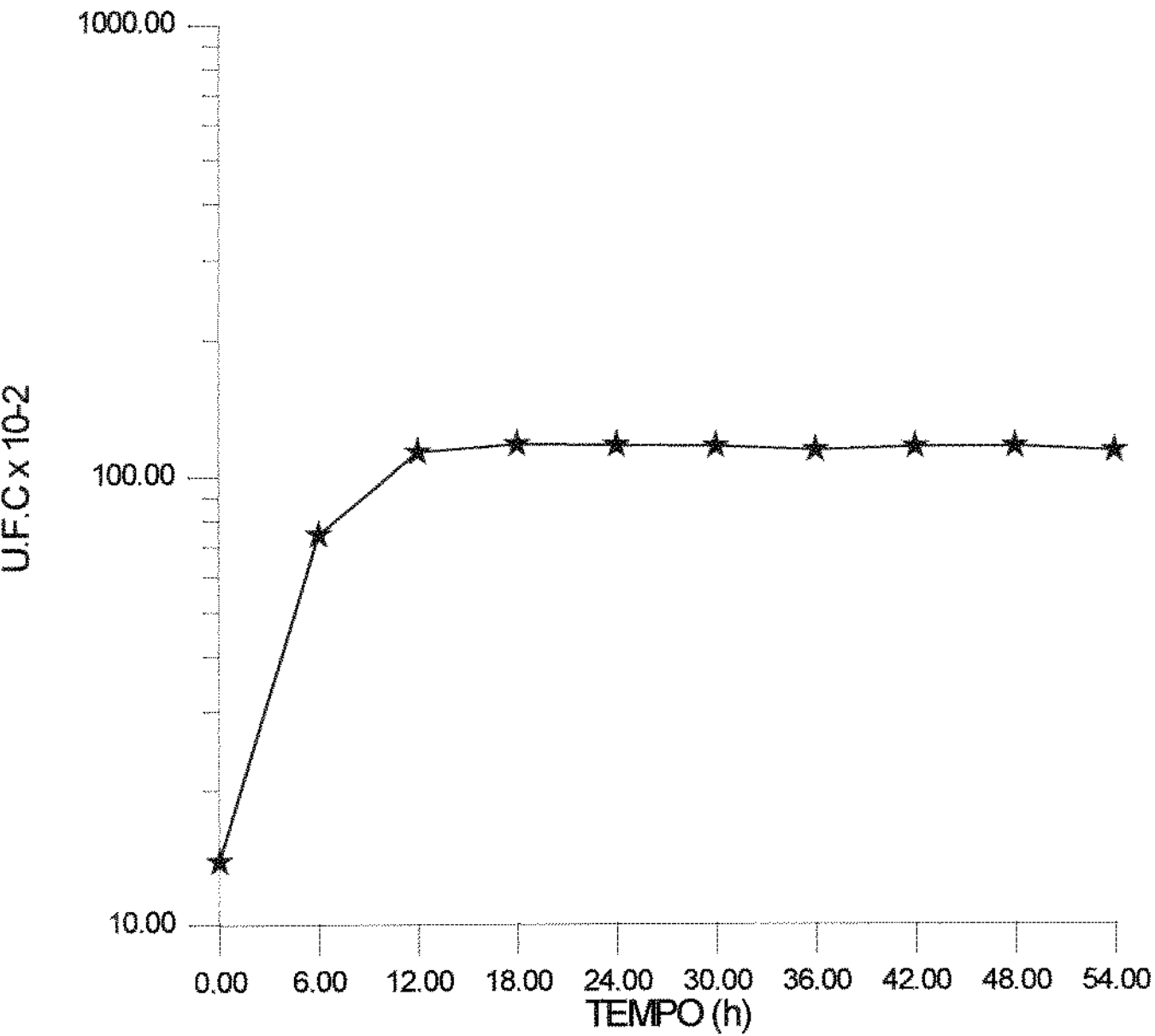


Figura 10 Cinética do crescimento da cepa 7070 de *Beijerinckia* sp.

5.3 Seleção do microrganismo

Utilizou-se o Meio I, nas condições de incubação descritas no item 4.2.1.1. Foram encontradas diversas colônias que apresentaram gomosidade neste meio sólido. Na Tabela 3, são mostradas as cepas, as quais posteriormente, foram selecionadas de acordo com o item 4.2.5, como sendo Gram negativas, tipo bastonete, catalase negativa e oxidase negativa, que foram submetidas a fermentações em Meio VII líquido, de acordo com o item 4.1.7 e nas condições do item 4.5.1. Nesta fase, a seleção das cepas das bactérias foi baseada nos parâmetros : quantidade de biopolímero produzido e viscosidade aparente da solução aquosa a 1 % .

Tabela 3 Quantidade e qualidade dos biopolímeros produzidos pelas cepas das bactérias denominadas 1175, 4341-4343, 7021-7070, e 9102-9103

	Quantidade de biopolímero	Viscosidade Aparente		Quantidade de biopolímero	Viscosidade Aparente
cepas	(g/l)	(cP)	cepas	(g/l)	(cP)
7041	0,58	12,0	4343F	0,85	26,0
7052	0,50	12,8	43435	0,46	10,0
7027	0,42	73,0	4342F	0,98	29,0
7029	0,62	34,0	4341F	0,63	29,0
7043	0,25	6,2	43436	0,40	22,0
7039	0,52	26,5	1175	0,62	29,0

7023	0,86	11,2	1175F	0,47	16,5
7044	0,28	5,5	1175AA	0,32	48,0
7028	1,10	22,0	1175A	0,40	68,0
7021	0,80	17,0	1175B	0,72	50,0
7045	0,25	2,5	9103A	0,42	80,0
733	0,20	14,0	9103B	0,53	70,0
7047	0,25	9,4	9103	0,40	38,0
7034	0,20	7,0	9102AA'	0,65	90,0
7046	0,15	30,5	9102A	0,50	54,0
7037	0,27	3,0	9102A2	0,38	82,0
4343	0,80	11,0	7070	0,63	132,0
4342	0,82	19,0	4341F	0,65	26,0

Como pode ser visto na Tabela 3, as melhores cepas, com relação à produção de biopolímero e viscosidade aparente destes em soluções aquosas à 1 %, em cada grupo foram 1175A, 4342F, 7070 e 9102AA'. Estas cepas foram as selecionadas para estudo dos parâmetros de produção.

5.4 Determinação dos parâmetros de produção de biopolímero pelas cepas 1175A, 4342F, 7070 e 9102 AA' de *Beijerinckia* sp

Considerando-se que os parâmetros, como composição do meio, pH, temperatura, concentração e tipo de açúcar desempenham um papel importante na produção de biopolímeros, foi estudado o efeito destes fatores

na obtenção do biopolímero pelas cepas que se mostraram promissoras para a produção de biopolímeros

5.4.1 Influência do meio de fermentação

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos no estudo do efeito do meio de fermentação na produção de biopolímero pelas cepas 1175A, 4342F, 7070 e 9102AA' de *Beijerinckia* sp, efetuado de acordo com o procedimento descrito em 4.5.1.1. Esses resultados mostram que a composição do meio de fermentação influencia significativamente a produção do biopolímero. Como pode ser observado nessa tabela, os meios IX, X e XI provocaram uma redução da produção de biopolímero, enquanto que não houve crescimento no meio VI. Dos seis meios testados verificou-se que os meios VII e VIII foram os que produziram maior quantidade de biopolímero e as melhores cepas quanto a produção foram a 7070 e a 9102AA'.

Tabela 4 Quantidade de biopolímero produzido pelas cepas 1175A, 4342F, 7070 e 9102AA', nos meios VI, VII, VIII, IX, X e XI

Meio	Cepas	Quantidade de biopolímero (g/l)
VI	1175A	0,00
	4342F	0,00
	7070	0,00
	9102AA'	0,00
VII	1175A	0,43
	4342F	0,97
	7070	0,63
	9102AA'	0,55

VIII	1175A	0,80
	4342F	0,66
	7070	1,93
	9102AA'	1,75
IX	1175A	0,12
	4342F	0,14
	7070	0,22
	9102AA'	0,11
X	1175A	0,26
	4342F	0,04
	7070	0,19
	9102AA'	0,11
XI	1175A	0,14
	4342F	0,20
	7070	0,60
	9102AA'	0,24

5.4.2 Influência do meio de produção de células

Para estudar se o tipo de açúcar utilizado no meio de produção de células poderia ter influência na quantidade de biopolímero produzido, foram realizados experimentos combinando-se os meios III e IV de produção de células com os meios VII e VIII de fermentação. Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que há diferença na produção de biopolímero pela cepa 7070, quando se utilizaram tanto os meios de produção de células III ou VI, com os meios VII e VIII de fermentação. Em termos de quantidade de biopolímero e viscosidade aparente das soluções dos biopolímeros, a melhor combinação foi a do meio IV de produção de células, com o meio VIII de produção de biopolímero.

Tabela 5 Quantidade de biopolímeros produzidos pela cepa 7070 de *Beijerinckia* sp nos meios VII e VIII de produção de biopolímero, combinados com os meios III e IV de produção de células e viscosidade aparente de suas soluções a 1%.

Meio de produção de células	Meio de produção de biopolímero	Quantidade de biopolímero (g/l)	Viscosidade aparente das soluções a 1% (cP)
IV	VIII	1,92	114
IV	VII	1,59	70
III	VIII	1,80	90
III	VII	1,61	70

5.4.3 Efeito do pH na produção de biopolímero pela cepa 7070 de *Beijerinckia* sp

Como a cepa utilizada neste estudo foi isolada de uma região com pH do solo entre 5,5 a 6,5 e a faixa de pH citada na literatura é de 6,0 a 7,2 onde podem estar presentes bactérias do gênero *Beijerinckia*, estudou-se a influência do pH do meio de fermentação na produção do biopolímero na faixa de pH de 5,8 a 7,0. A quantidade de biopolímero obtido para os seguintes valores de pH inicial 5,8; 6,2; 6,5; 6,8; e 7,0 foram, respectivamente, de 7,12; 8,60; 10,77; 10,28; e 9,72 g/l, nas condições do item 4.5.1.3. Verificou-se, portanto, que o pH do meio de fermentação tem grande influência no processo de produção, e que, para cepa 7070, o pH ótimo para a produção de biopolímero situou-se em torno de 6,5. A Figura 11 mostra o efeito significativo do pH na produção de biopolímero.

LÓPEZ & BACKING (1968) utilizaram pH 7,2 para *Beijerickia* Hawai 2, porém o rendimento obtido pode ser considerado baixo quando comparado ao da cepa 7070 de *Beijerinckia*. Esses autores obtiveram apenas 4,5 g/l de biopolímero para o meio contendo 2% de glicose, enquanto que, para essa mesma concentração de glicose no meio, obtiveram-se no presente trabalho 8,34 g/l para pH 6,5 e 7,94 g/l para pH 7,0 .

A influência do pH na produção de biopolímero já foi observada por CONGREGADO et alii (1985) que, trabalhando com a produção de biopolímero por *Pseudomonas* sp EPS-5028, verificaram que a faixa de pH para obtenção de maior quantidade do polissacarídeo foi de 6,7 a 8,0. Também WILLIAMS & WIMPENNY (1977), estudando a produção do exopolissacarídeo por *Pseudomonas* NCIB 11264, verificaram que, na faixa de pH 3,0 a 6,5 a produção variou de 0,1 a 1,0 mg/ml , enquanto que na faixa de pH de 7,0 a 8,0, variou de 4,0 a 5,0 mg/ml. Os mesmos autores verificaram que em pH 9,0 a produção foi de 4,5 mg/ml. Esses resultados foram obtidos em meio contendo 2% de glicose.

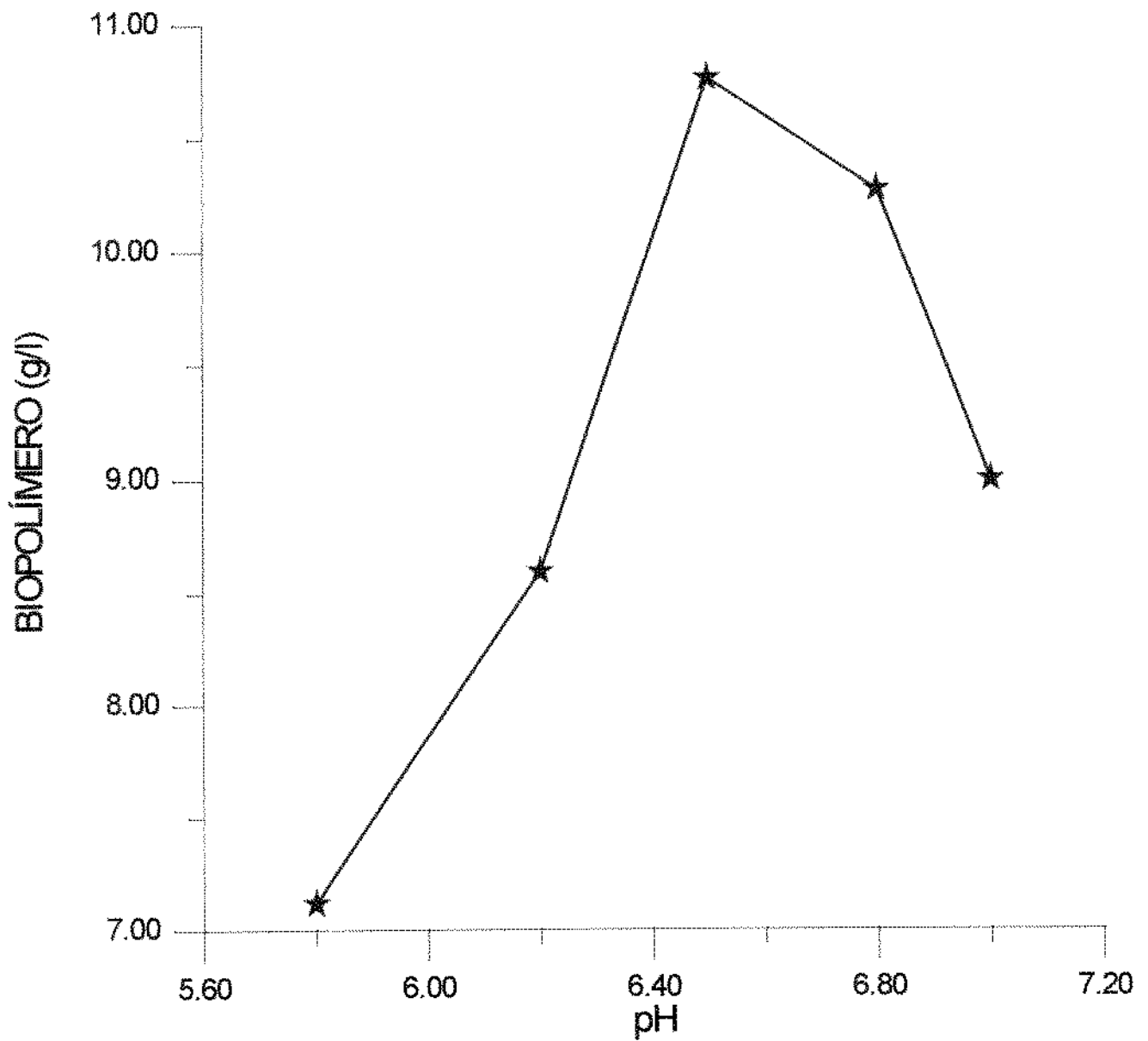


Figura 11 Quantidade de biopolímero obtido pela cepa 7070 de *Beijerinckia* em meio VIII contendo sacarose 50 g/l fermentada por 96 horas a 27 oC e 200 rpm em pH de 5.8 a 7.0.

5.4.4 Influência da concentração e tipo de açúcar

Foram efetuados estudos com a cepa 7070, relacionando-se duas concentrações de glicose ou sacarose (2% e 5%) em pH 6,5 e 7,0. As quantidades de biopolímeros produzidas em meio de fermentação contendo 2% de sacarose ou glicose em pH 6,5 foram, respectivamente, 8,34 e 7,50 g/l e para concentração de 5% de sacarose ou glicose, foram, respectivamente, 10,86 e 9,80 g/l. Para concentração de 2% de sacarose ou glicose, em pH 7,0, os resultados foram 7,94 e 6,94 g/l de biopolímero e para 5% de sacarose ou glicose foram respectivamente 10,06 e 9,45 g/l. Os resultados mostraram que a quantidade de biopolímero para qualquer concentração e tipo de açúcar, dependeu do pH para os dois tipos de açúcar. Estes dados mostram que a maior quantidade de biopolímero foi obtido em pH 6,5 quando se utilizou sacarose a 2% ou 5%. Tais resultados estão de acordo com os dados obtidos para cepa 9102AA' por VENDRUSCOLO e SCAMPARINI (1993). Tanto a sacarose como a glicose influenciaram na quantidade do biopolímero obtido; porém, esta influência pode ser considerada pequena, quando comparada com variação verificada entre estes dois tipos e os demais açúcares citados na literatura. As diferenças de rendimento entre a sacarose e a glicose neste trabalho não ultrapassaram a 5% enquanto que dados citados por MANRESA et alii (1987) mostram uma diferença de aproximadamente 10 % entre esses dois açúcares, e de até 70 % de rendimento entre a glicose e outros açúcares, tais como, galactose, lactose, frutose e maltose.

Também WILLIAMS & WIMPENNY (1977) utilizaram várias fontes de carbono, dentre elas a glicose e a sacarose, para uma fermentação de 48 horas, obtendo 3,23 mg/ml de polissacarídeo para 1% de glicose inicial e 2,87 mg/ml para 1% de sacarose inicial. Um extenso trabalho com a *Pseudomonas* NCIB 11264, realizado por estes autores, utilizando doze açúcares diferentes, mostrou o quanto o tipo de açúcar influi significativamente na produção do biopolímero, tendo sido 0,43 mg/ml a produção mínima e 3,23 mg/ml a produção máxima quando a concentração inicial foi 1% de açúcar. Estes autores afirmam, no entanto, que o tipo de açúcar não altera a composição do biopolímero .

Esses mesmos autores estudaram a influência da glicose e sacarose nas concentrações de 0,5 a 2,0 % na produção do biopolímero em fermentação de 48 horas. Somente na concentração de 1 % a quantidade de biopolímero produzido foi acima de 1,5 mg/ml para glicose e sacarose. Na concentração

de 2 %, a quantidade foi de 4,0 mg/ml para glicose e de 2,8 mg/ml para sacarose. Estes resultados também confirmam a influência da concentração e do tipo de açúcar na produção de biopolímero verificado no presente trabalho.

CRUZ (1983), na produção de xantana por *Xanthomonas manihotis* utilizando glicose ou sacarose no meio de fermentação em concentrações de 2 e 5 %, obteve 11,55 g/l de biopolímero em concentrações de 2 % de glicose e pH 5,5. Para concentrações de 2% de sacarose e pH 6,4, obteve 11,58 g/l de biopolímero. Quando utilizou 5% de glicose e pH 6,3, obteve 21,83 g/l , e 22,35 g/l quando utilizou 5 % de sacarose em pH 5,5.

5.4.5 Influência do volume de meio

O experimento para determinar a influência do volume de fermentação em erlenmeyer de 500 ml (4.5.1.6) no qual foram utilizados 20, 40, 60 e 80 ml de meio de produção de células com adição de 4 vezes o volume de meio de fermentação para perfazer os totais de 100, 200, 300 e 400 ml , nas condições do experimento, resultaram na produção , respectivamente, de 4,5, 11,4, 12,0, 9,0 g/l de biopolímero, que significam rendimento de 9%, 22,8%, 24% e 18% respectivamente.

Pode-se observar que os melhores rendimentos de biopolímeros foram obtidos para os volumes de 200 e 300 ml, onde a diferença de 33 % do volume aumenta somente em 2 % a produção de biopolímero. Os menores rendimentos foram obtidos com os volumes de 100 ml e 400 ml, onde a redução de 75 % do volume causou uma diminuição de 50 % no rendimento do biopolímero. Tais resultados indicam que há uma faixa de volume a qual proporciona uma aeração adequada, resultando em melhor rendimento na produção do biopolímero.

Na literatura consultada não foram encontrados estudos sobre volume de meio para o recipiente utilizado nas fermentações do tipo descontínuo. Segundo BORZANI (1986), a literatura é rica quando trata do problema de aeração; porém, os dados encontrados sobre quantidades de oxigênio necessárias são bastante controversos e, muitas vezes, constituem segredo de fabricação.

5.4.6 Influência da temperatura de fermentação

Os resultados dos ensaios da influência da temperatura de fermentação no rendimento e no comportamento reológico dos biopolímeros produzidos nas condições estabelecidas nas Figuras 3 e 4, estão na Tabela 6 e Tabela 7 e nas Figuras 12,13, 14, 15 e 16.

Tabela 6 Efeito da temperatura de fermentação no processo descontínuo de produção de biopolímero pela cepa 7070 de *Beijerinckia* sp, com meio VIII, contendo 5 % de glicose, 96 horas a 200 rpm e a pH inicial de 6,5.

	Temperatura (°C)				
	15	20	24	27	30
biopolímero (g/l)	10,74	12,11	11,43	10,61	7,97
células secas (g/l)	0,348	0,192	0,319	0,912	0,829
pH final	5,29	4,87	4,71	4,63	4,70
Viscosidade aparente do caldo (cP)	225	390	493	180	120
Açúcar residual (g/l)	5,95	10,0	7,8	6,0	4,0
Conversão de glicose em biopolímero (%).	21,48	24,22	22,86	21,22	15,94

Tabela 7 Efeito da temperatura de fermentação no processo descontínuo de produção de biopolímero pela cepa 7070 de *Beijerinckia* sp, com meio VIII, contendo 5 % de sacarose, 96 horas a 200 rpm e a pH inicial de 6,5.

	Temperatura (°C)				
	15	20	24	27	30
biopolímero (g/l)	10,18	12,64	10,60	8,69	7,28
células secas g/l	0,349	0,218	0,314	0,796	0,838
pH final	5,14	4,74	4,97	4,57	4,76
Viscosidade aparente do caldo (cP)	200	410	510	270	80
Açúcar residual (g/l)	2,5	8,7	5,4	3,4	4,3
Conversão de sacarose em biopolímero (%).	20,36	25,28	21,20	17,38	14,56

Os resultados do estudo da influência da temperatura na produção do biopolímero com a cepa 7070 de *Beijerinckia* sp, em meio VIII, contendo glicose ou sacarose, mostraram que houve produção de biopolímero com bom rendimento nas temperaturas testadas de 15 a 30 °C.

Nas Tabelas 6 e 7 e na Figura 12, pode-se observar que a temperatura tem influência significativa no rendimento da produção de biopolímero. A

melhor temperatura, para produção com glicose ou sacarose, foi em torno de 20 °C. O rendimento decresceu na temperatura de 15°C e a partir de 24 até 30°C. Segundo o Manual de Bergey (1984), a bactéria *Beijerinckia* desenvolve-se nas temperaturas entre 10 e 35 °C. Nos experimentos foi comprovado que para o meio e condições utilizadas, a cepa 7070 não apenas se desenvolveu, mas também produziu substanciais quantidades de biopolímero na faixa de 15 a 30 °C. Os valores obtidos foram significativamente superiores aos citados por LÓPEZ e BACKING (1968), pois a quantidade máxima obtida, para o meio e condições utilizados, foi de 5,4g/l, usando *Beijerinckia indica* Hawai 2.

Para homopolissacarídeos como a curdulana e a dextrana, a quantidade de glicose ou sacarose inicial chega a 100 g/l e, segundo HARADA et alii (1966) e NAKANISHI et alii (1972), o rendimento na produção do biopolímero alcança a 50% para a curdulana; e para a dextrana, o rendimento atinge de 25 % Porém, segundo ALSOP (1983), o rendimento máximo obtido industrialmente é de 17 %

O rendimento dos heteropolissacarídeos obtidos por *Pseudomonas* e *Xantomonas* é menor. A produção de xantana, segundo a literatura, varia de 13 g/l até 20 g/l (CADMUS et alii. 1976 ; CRUZ, 1983). Para os biopolímeros obtidos por *Pseudomonas*, a quantidade produzida é ainda menor, variando de 240 mg/l a 4,8 g/l (CHRISTENSEN 1985 ; MANRESA et alii ,1987).

LAPASIN et alii (1992) realizaram estudo comparativo entre tempos de fermentação e quantidade de biopolímero produzido. Em fermentações com 7, 14, 21 e 28 dias, obtiveram as seguintes quantidades : 0,85; 1,99; 2,54 e 3,27 g/l, respectivamente, de biopolímero produzido por *Cyanospira capsulata*. Este foi o único trabalho encontrado onde foi estudada a quantidade de biopolímero em função do tempo de fermentação.

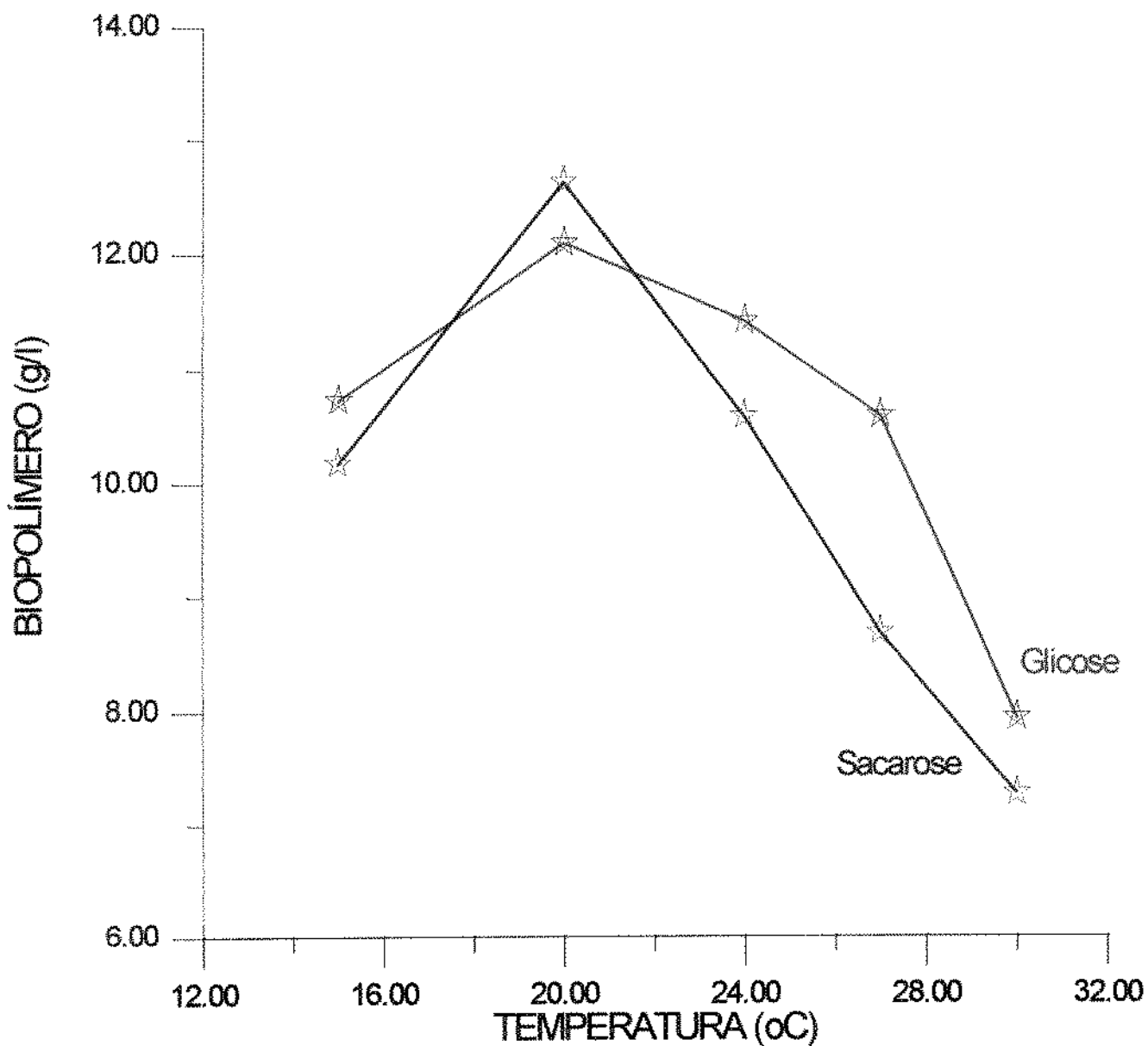


Figura 12 Quantidade em g/l de biopolímero obtido com a cepa 7070 com o meio VIII contendo glicose ou sacarose, fermentada nas temperaturas 15, 20, 24, 27 e 30 oC.

Os resultados das Tabelas 6 e 7 e a Figura 13 mostram que o pH do meio de fermentação, inicialmente ajustado para 6,5, diminuiu para até 4,57 no final da fermentação. A bactéria *Beijerinckia* manteve-se ativa até em pH 4,57, o que está de acordo com BECKING (1961a) e FLORENTANO et alii (1968), que consideram ter esta bactéria tolerância a pH baixo, na faixa de 4,5 - 5,2.

Na Figura 14, é importante notar que a quantidade de células secas mostrou-se consideravelmente menor apenas para as temperaturas de maior rendimento do biopolímero. Esse resultado está de acordo com o experimento realizado posteriormente, no qual foi avaliada a produção de biopolímero, para mesmo inóculo, com diferentes quantidades de células, isto é, inóculo com e sem centrifugação. Para o meio de produção de células, que foi centrifugado e utilizado o sobrenadante na fase de fermentação, obteve-se um aumento no rendimento de 12%. Ficou assim demonstrado que quanto menor o volume de células maior foi a produção de biopolímero.

LAPASIN et alii (1992) produzindo fermentações nas mesmas condições, para comparar o efeito do tempo de fermentação na quantidade do biopolímero produzido por *Cyanospira capsulata* mostraram que a quantidade de biomassa obtida: 1,56; 2,73; 4,02 e 4,14 g/l, não foi proporcional a quantidade do biopolímero produzido, que foi respectivamente de 0,85; 1,99; 2,54 e 3,27 g/l. Segundo os mesmos autores, a viscosidade do sobrenadante do caldo de fermentação aumentou proporcionalmente com a produção do biopolímero, até 21 dias de fermentação; porém, manteve-se a mesma até o vigésimo oitavo dia, quando houve um aumento de cerca de 25% na produção, comparando-se com os resultados de 21 dias.

Na Figura 15, pode-se observar que a maior viscosidade aparente do caldo de fermentação ocorreu nas temperaturas de 20 e 24 °C, nas quais se obteve maior rendimento na produção do biopolímero, quando se utilizou glicose ou sacarose. O aumento da concentração de biopolímero no meio de fermentação explica o acréscimo de viscosidade. A viscosidade do caldo de fermentação, quando se utilizou sacarose, foi superior à do caldo em que se utilizou glicose, na faixa onde houve maior produtividade de biopolímero. Os resultados de viscosidade aparente da solução de biopolímero a 6%, que podem ser vistos nas Figuras 18 e 20, mostram que a viscosidade foi maior

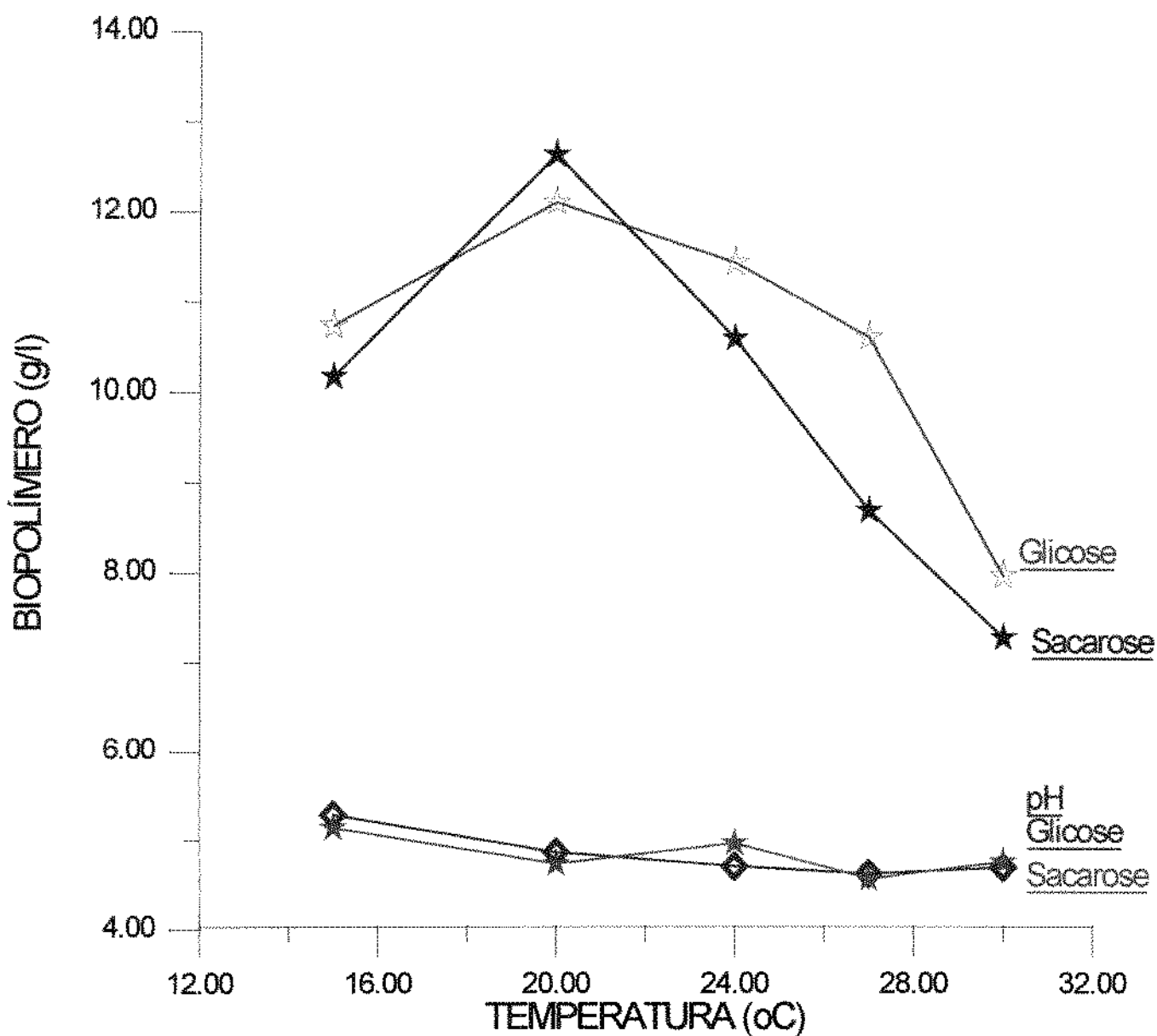


Figura 13 Quantidade de biopolímero (g/l) e pH obtidos no final das fermentações em meio VIII com a cepa 7070 de *Beijerinckia sp* nas temperaturas de 15, 20, 24, 27 e 30 oC.

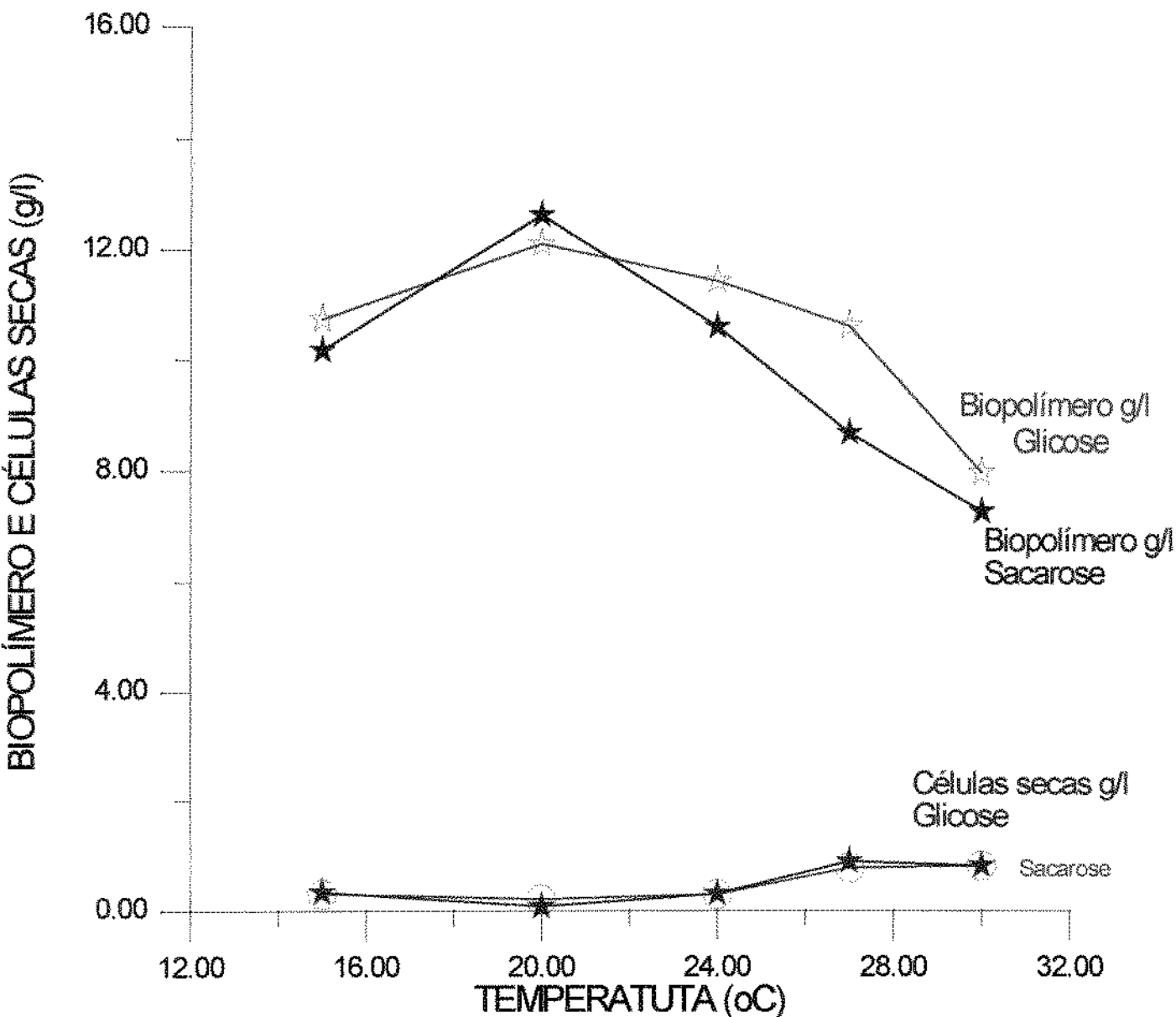


Figura 14 Quantidade de biopolímero (g/l) e quantidade de células secas (g/l) obtidas nas fermentações em meio VIII com a cepa 7070 de *Beijerinckia*, nas temperaturas de 15, 20, 24 e 30 °C.

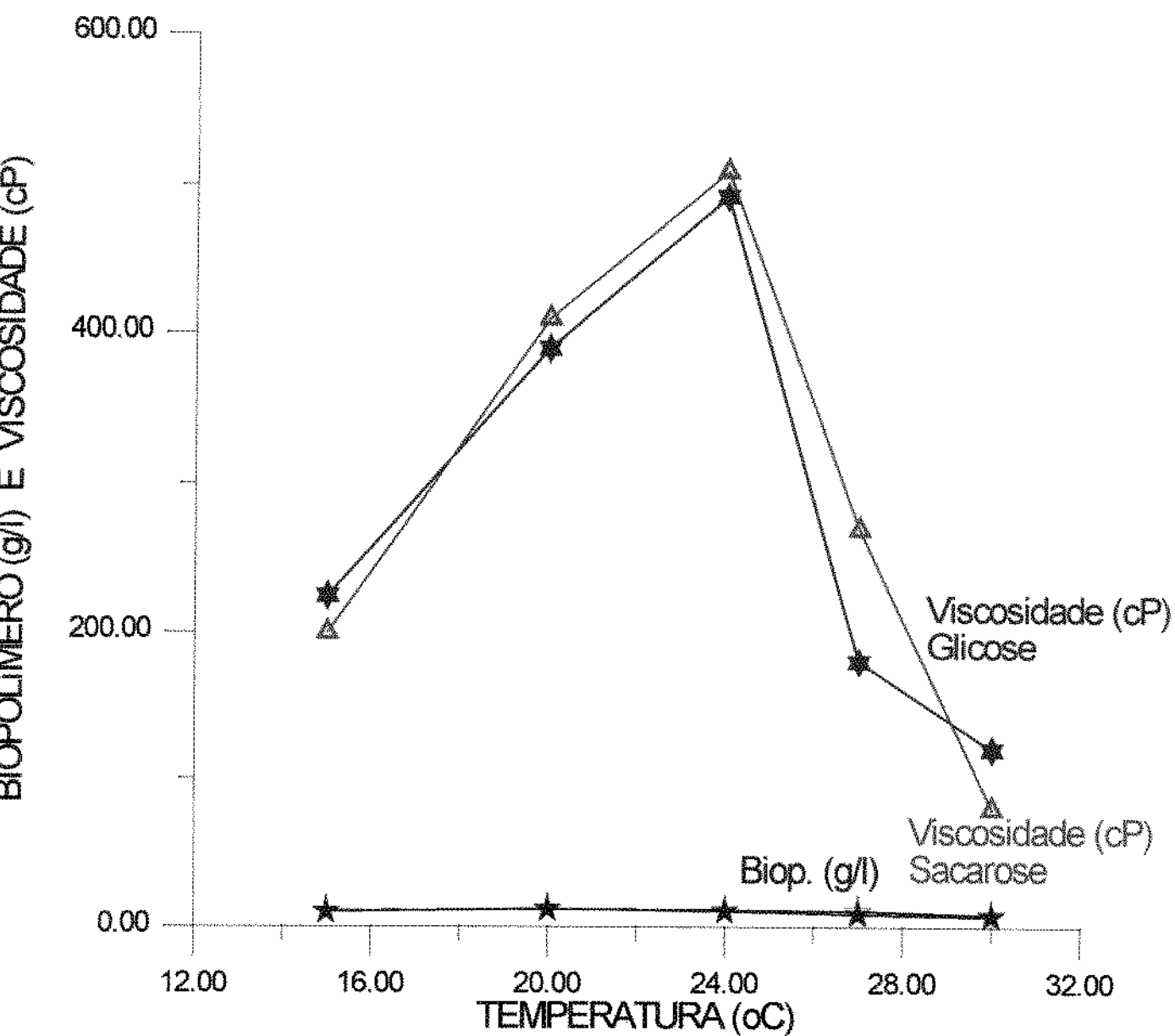


Figura 15 Viscosidade aparente (cP) do caldo de fermentação, das fermentações em meio VIII com a cepa 7070 de *Beijerinckia sp* nas temperaturas 15, 20, 24, 27 e 30 °C.

para solução do biopolímero obtido com sacarose. Verificou-se que, nesse caso, houve uma correlação direta entre a viscosidade do caldo e a da solução do biopolímero.

CRUZ (1983) também utilizou 5 % de concentração inicial de açúcares e obteve maior viscosidade aparente no caldo de fermentação, quando utilizou sacarose do que quando utilizou glicose. Já CONGREGADO et alii (1985) obtiveram para o caldo de fermentação uma viscosidade de 100 a 500 cP para os diferentes açúcares testados, sendo que a concentração inicial de cada um deles foi de 2%. Porém, quando se usaram concentrações iniciais de 0,5 a 2,0 % de glicose, os resultados de viscosidade aparente do caldo de fermentação foram praticamente iguais nas concentrações de 1.0, 1.5 e 2.0 %, nas quais a viscosidade foi de aproximadamente 150 cP.

Na Figura 16, verifica-se que a maior quantidade de açúcar residual foi determinada na faixa de temperatura de maior produção do biopolímero. Uma provável explicação para esse fato é a presença de menor quantidade de células, o que leva a um menor consumo de açúcar para crescimento e manutenção das células.

Nos resultados obtidos por LÓPEZ & BACKING (1968), a quantidade de glicose do meio decresceu até atingir o segundo maior ponto de produção do biopolímero; porém, enquanto a produção de biopolímero decrescia, o nível de glicose no meio cresceu, mostrando que, para o menor nível de produção de biopolímero a quantidade de glicose retornou ao mesmo nível de máxima produção. WILLIAMS & WIMPENNY (1977) obtiveram os seguintes resultados para uma fermentação de 50 horas com a *Pseudomonas* NCIB 11264, em meio contendo 2% de glicose: um decréscimo lento da quantidade de glicose nas 20 primeiras horas, quando a produção de biopolímero atingiu 5 mg/ml. De 20 até 50 horas, a quantidade de glicose caiu para aproximadamente 0.5 %, enquanto a produção de biopolímero aumentou para 7mg/ml.

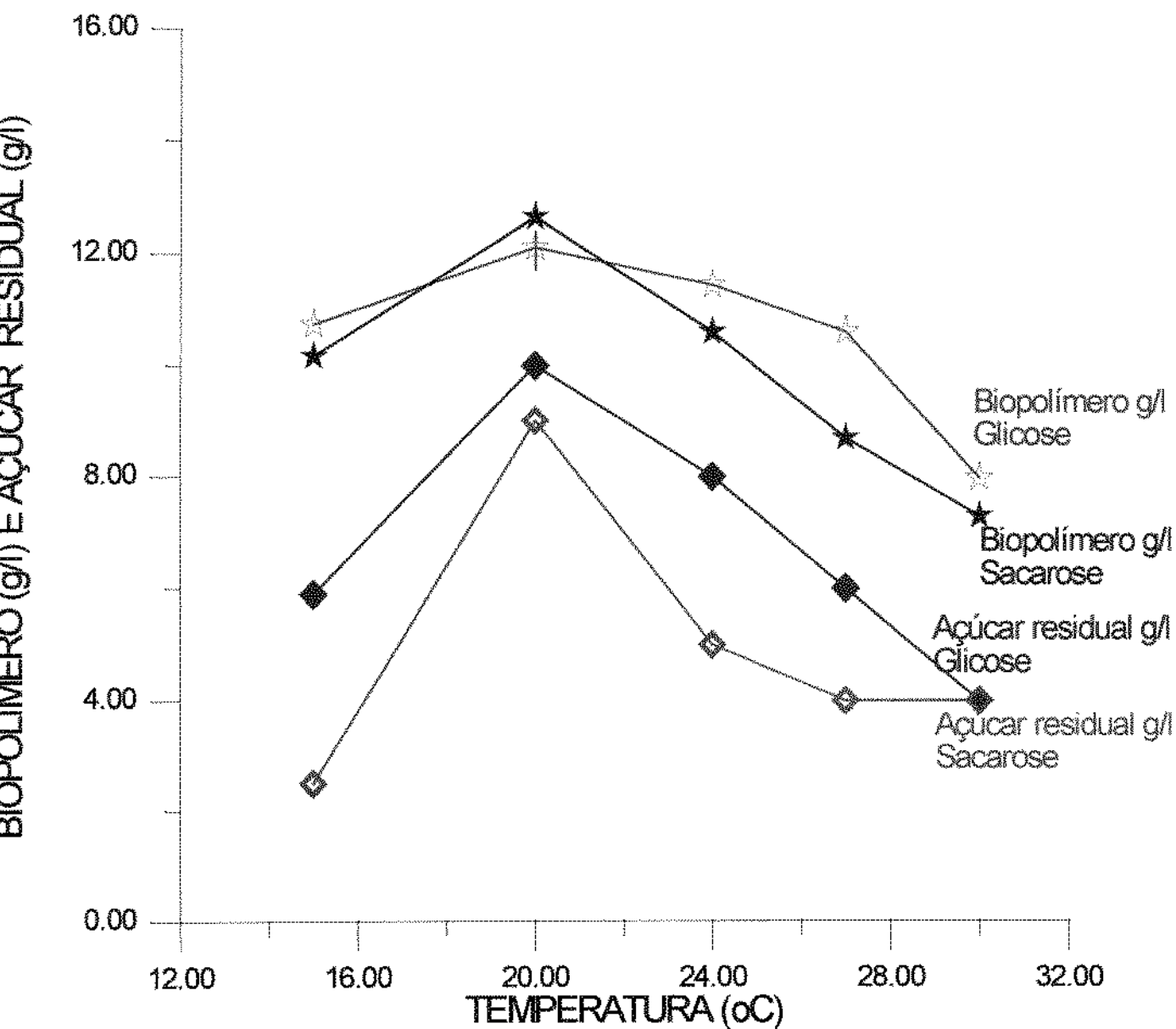


Figura 16 Quantidade de biopolímero (g/l) e açúcar residual (g/l) obtidos nas fermentações em meio VIII com a cepa 7070 de *Beijerinckia*, nas temperaturas de 15, 20, 24, 27, 30 oC.

5.4.7 Influência do volume de células no meio de produção de biopolímero

O estudo em que se utilizou somente o sobrenadante do meio de produção de células após a centrifugação, comparando-se este com o mesmo volume de meio de produção de células sem centrifugação, e nas condições de fermentação estabelecidas no item 4.5.1.7, observou-se uma produção de 17,02 g/l de biopolímero, quando se utilizou o sobrenadante do meio centrifugado; e 10,74 g/l de biopolímero, quando se utilizou o meio não centrifugado. Quando se usou o sobrenadante que tinha menor quantidade de células que o meio não centrifugado, o rendimento aumentou em torno de 12%. Para os parâmetros anteriormente estudados o maior rendimento obtido era em torno de 21% e nas condições, uso do sobrenadante, o rendimento passou para 34%. Possivelmente o excesso de células interfere negativamente no rendimento do biopolímero, pela concorrência destas na utilização dos componentes do meio, visando à sua manutenção e reprodução. CRUZ (1983) também obteve maior quantidade de biopolímero para uma biomassa menor que foi de 22,353 g/l de xantana para uma biomassa de 1,088 g/l e 21,836 g/l de xantana para 1,740 g/l. No entanto, LAPASIN et alii (1992) mostraram que não houve proporcionalidade entre a biomassa obtida no final da fermentação e a quantidade de biopolímero produzido.

5.5 Determinação dos constituintes do biopolímero B-27

Através da comparação dos valores de R_G dos açúcares padrões com os valores de R_G obtidos através de cromatografia descendente dos compostos obtidos na hidrólise total, foram identificados galactose, glicose e manose, como os monossacarídeos constituintes do biopolímero.

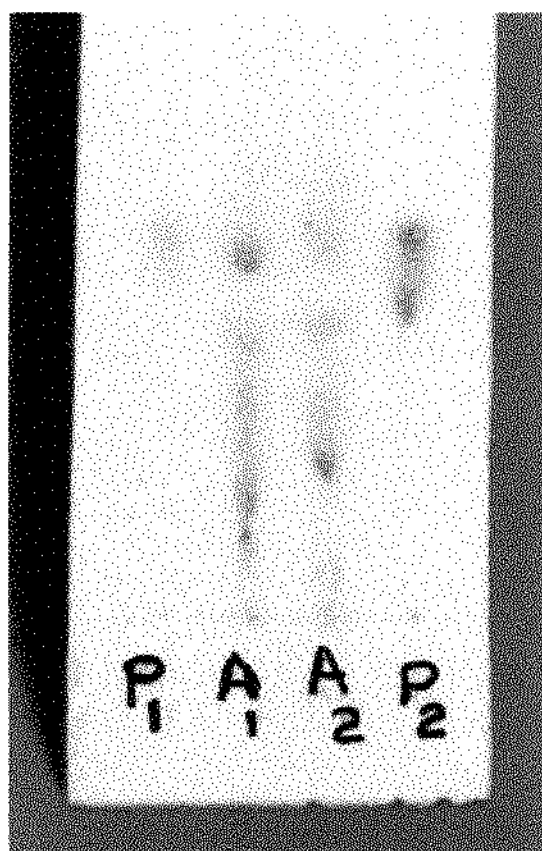


Figura 17 Cromatograma : amostras A1 e A2 , padrões P1 ác. galacturônico e P2 ác. glucurônico

Os resultados da cromatografia ascendente mostraram a presença dos ácidos glucurônico e galacturônico, na composição do biopolímero, conforme pode ser visto na Figura 17.

Portanto, pode-se afirmar que o biopolímero B-27 é constituído de galactose, glicose, manose, ácido glucurônico e ácido galacturônico.

Essa mesma constituição foi encontrada por LÓPEZ & BACKING (1968) no polissacarídeo produzido pela *Beijerinckia indica*, *Hawai-2*. HAUG & LARSEN (1970) citam que JONES et alii (1963) encontraram a seguinte constituição para o polissacarídeo produzido por *Beijerinckia indica*: D-glucose, D-manose, ácido D-glucurônico e traços de ácido galacturônico e gulurônico. HAUG & LARSEN (1970) concluíram que o polissacarídeo obtido por *Beijerinckia indica*, em diferentes bateladas, possui quantidades significante de ácido manurônico e glucurônico. KANG & McNEELY (1977) e SANDFORD (1982) encontraram a seguinte constituição para o heteropolissacarídeo produzido pela *Beijerinckia indica* : glicose, ramnose e ácido gulurônico. Para o polissacarídeo produzido por *Beijerinckia mobilis*, COOKE & PERCIVAL (1975) encontraram a seguinte constituição: glicose, arabinose e ramnose, para a fração neutra, e para a fração ácida : ácido gulurônico, glicose, ácido acético e ácido pirúvico.

5.6 Reologia de soluções aquosas do biopolímero produzido pela cepa 7070 de *Beijerinckia* sp

5.6.1 Viscosidade

Os reogramas obtidos com dispositivos cilíndricos rotativos, (Figuras 18, 19, 20 e 21) mostram que o biopolímero em questão possui fortes características pseudoplásticas, isto é, a viscosidade aparente decresce de maneira substancial à medida em que se aumenta a taxa de deformação. HOLDSWORTH (1971), interpretando esse tipo de comportamento, afirma que o aumento da taxa de deformação causa um progressivo desembaraçamento do arranjo das cadeias moleculares longas, contribuindo para reduzir a resistência intermolecular ao fluxo.

Outra importante característica observada nos reogramas é a existência de uma alta tensão residual e, como conseqüência, uma alta viscosidade aparente para baixas taxas de deformação. Tensão residual é o valor mínimo de tensão a que deve ser submetido o fluido para que ele escoe. Conforme as Figuras 19 e 21, a tensão residual mostra-se elevada para taxas de deformação

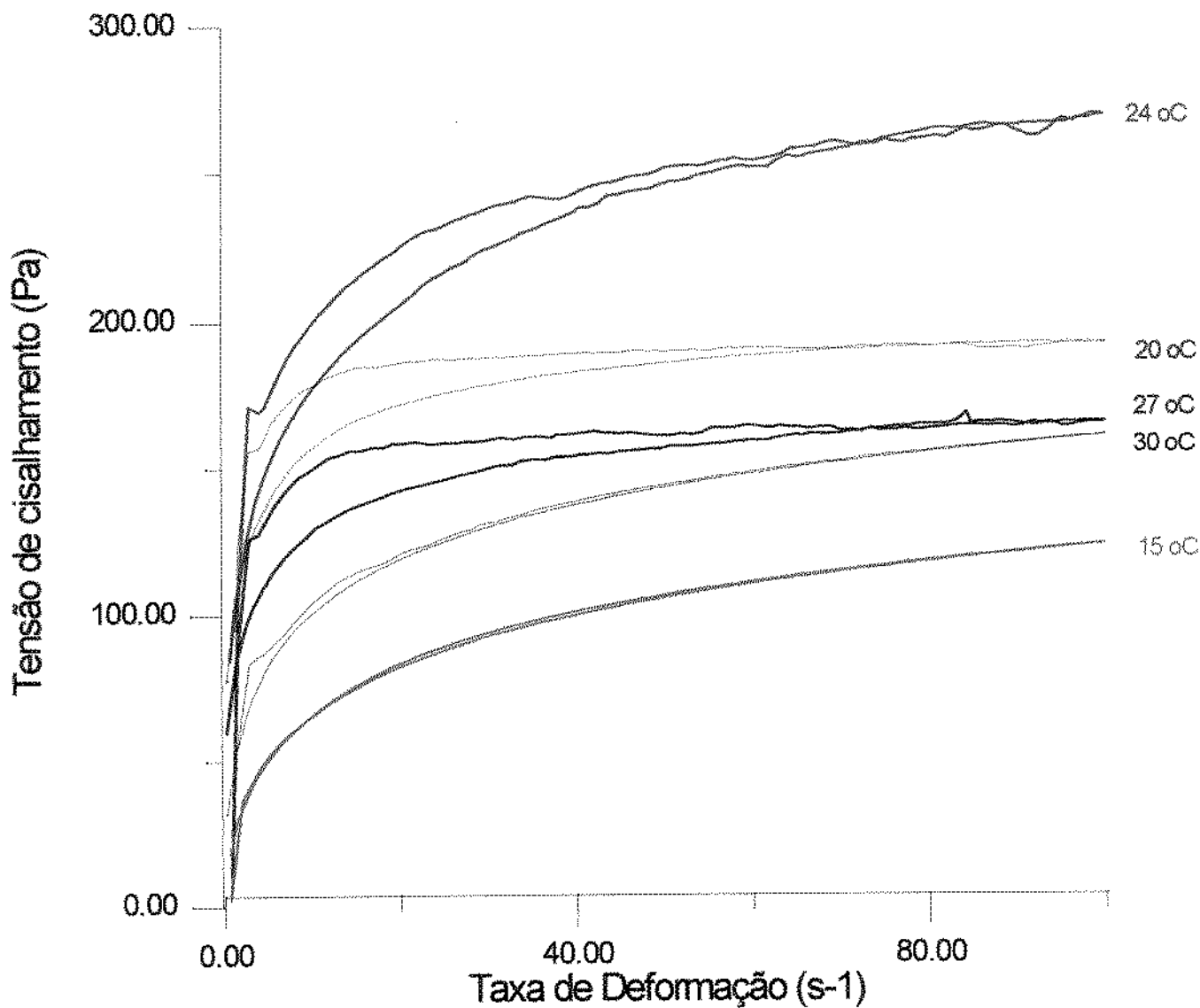


Figura 18 Comportamento reológico de soluções a 6% de biopolímero obtido nas fermentações em meio VIII contendo, glicose a, 15, 20, 24, 27 e 30 °C, determinado em reômetro Haake a 25 °C.

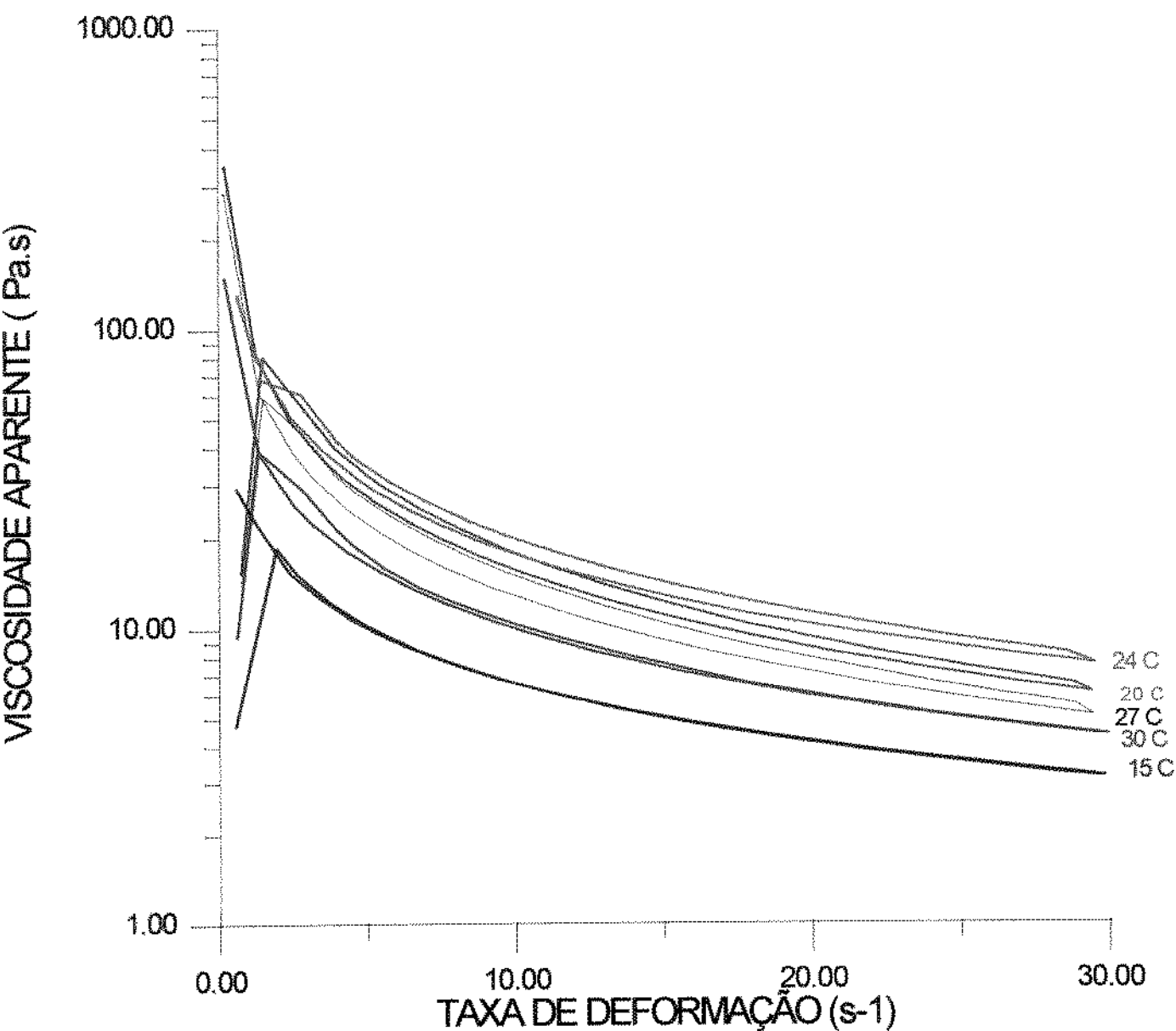


Figura 19 Viscosidade vs. Taxa de Deformação de solução aquosa com 6% de biopolímero obtidos nas fermentações a 15, 20, 24, 27 e 30 oC e meio VIII contendo glicose. As curvas foram determinadas em reômetro Haake a 25 oC.

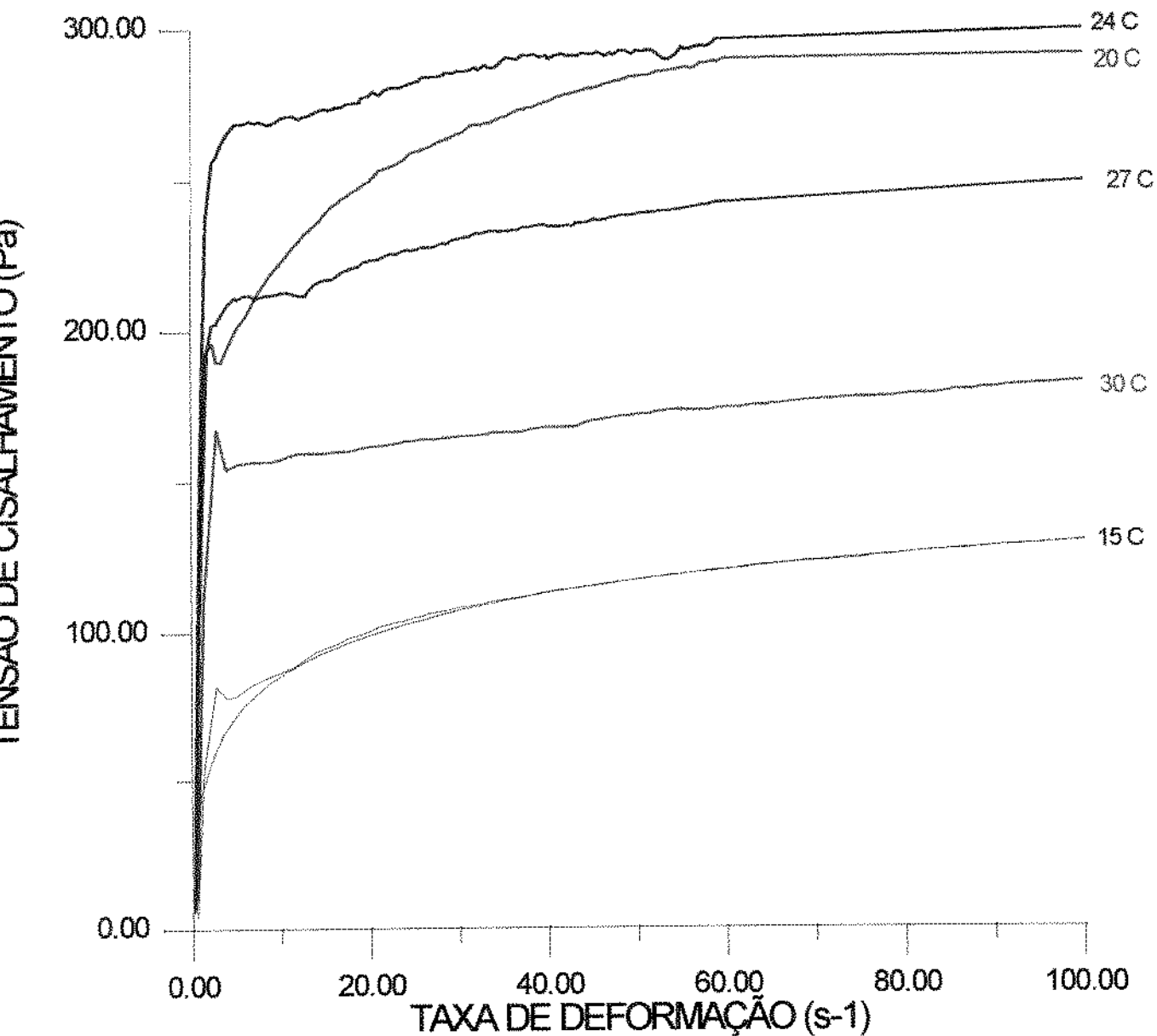


Figura 20 Comportamento reológico de soluções a 6% de biopolímero obtido nas fermentações em meio VIII, contendo sacarose a 15, 20, 24, 27 e 30 oC, determinado em reômetro Haake a 25 oC.

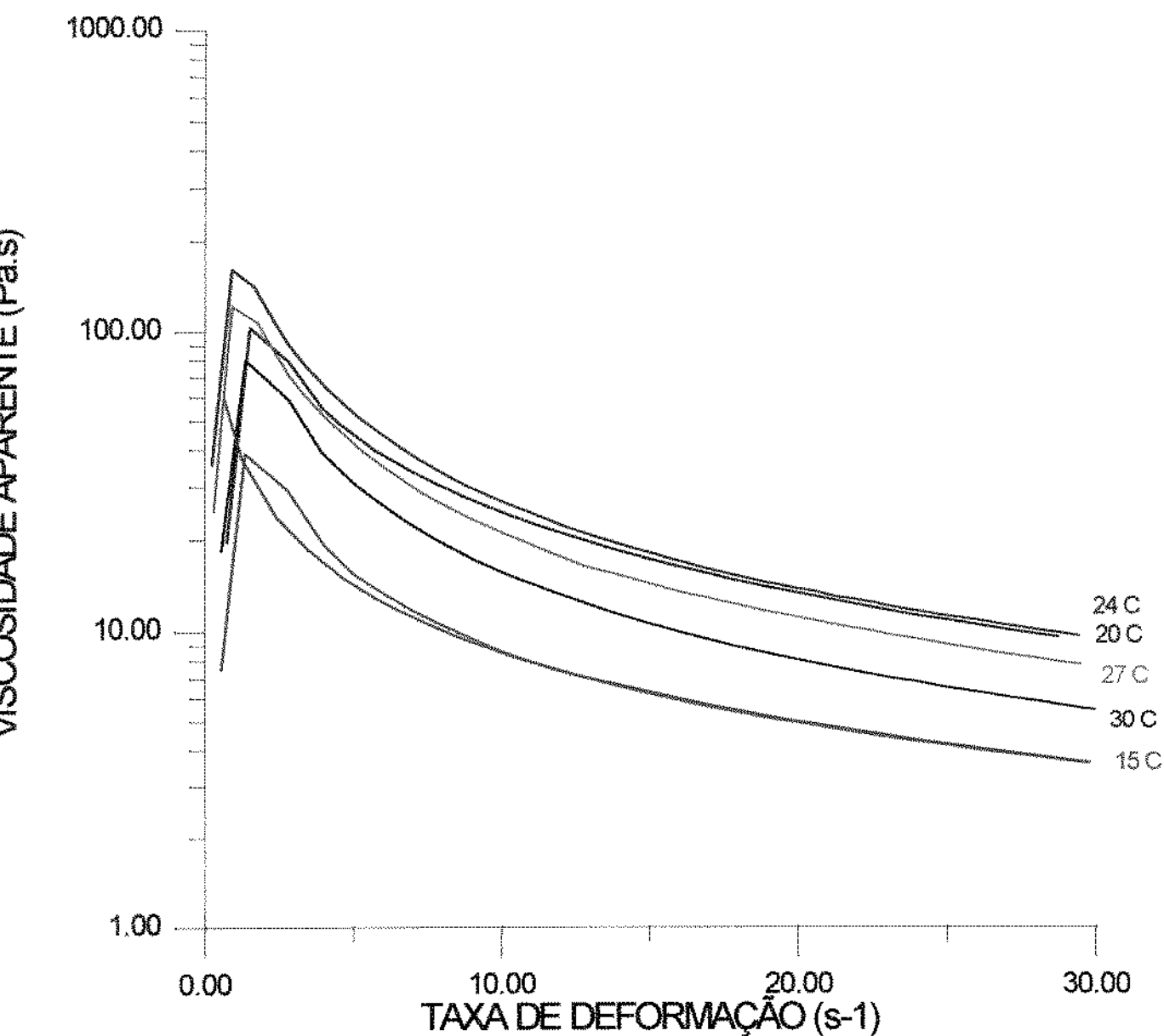


Figura 21 Viscosidade vs. Taxa de Deformação, de solução aquosa de biopolímeros obtidos nas fermentações a 15, 20, 24, 27 e 30 oC em meio VIII, contendo sacarose. As curvas foram determinados em reômetro Haake a 25 oC.

em torno de $1,5 \text{ s}^{-1}$. SZCZESNIAK (1985) apresentou reogramas da goma xantana, cujo comportamento é semelhante àquele apresentado no presente trabalho, onde um pico de tensão residual é seguido por uma região de "shear thinning", isto é: de viscosidade aparente decrescente. De acordo com o mesmo autor, a tensão residual é uma importante característica das substâncias utilizadas como agentes ligantes e de suspensão. Resultados de reogramas apresentados por MANRESA et alii (1987) para a goma xantana comparada com o polímero extracelular GSP-910 produzido por *Pseudomonas*, também mostraram-se semelhantes aos obtidos para o biopolímero do presente trabalho.

SZCZESNIAK (1985) afirma que altas viscosidades obtidas com baixas taxas de deformação, e baixa viscosidade com altas taxas de deformação, conferem a substâncias excelentes características de suspensão e sensação bucal não pegajosa, como apresenta a goma xantana.

Ainda pode ser observado nos reogramas o fluxo dependente do tempo, com histerese do tipo tixotrópico. Não se dispõe de informações sobre a extensão em que esse fenômeno afeta as propriedades funcionais dos hidrocolóides. Entretanto, SZCZESNIAK afirma que esse comportamento é importante na manufatura de produtos espessados com gomas. Os mesmos autores citando RAO & KENNY (1975) afirmam que as gomas xantana e guar não exibem acentuado comportamento dependente do tempo, ao contrário de soluções da goma furcellarana.

Nas Figuras 18 e 22, pode-se observar que a temperatura de fermentação influenciou na histerese. Houve uma redução da histerese nas soluções com biopolímeros produzidos nas temperaturas extremas 15 e 30 °C, e esta aumentou nas soluções com biopolímeros produzidos nas temperaturas de 20, 24 e 27 °C. A redução da histerese pode ser interpretada como uma capacidade de recuperação das características elásticas inerentes à estrutura do biopolímero.

A temperatura de fermentação influenciou na viscosidade aparente das soluções dos biopolímeros. As maiores viscosidades foram para os biopolímeros obtidos a 20, 24 e 27 °C, tanto para o meio VIII, contendo glicose, como para o mesmo meio contendo sacarose. As menores viscosidades foram para os biopolímeros obtidos nas temperaturas de 15 e 30°C. No entanto, quando se comparam as viscosidades nas mesmas temperaturas com meios contendo glicose ou sacarose, observa-se que as viscosidades aparentes foram superiores quando se utilizou a sacarose.

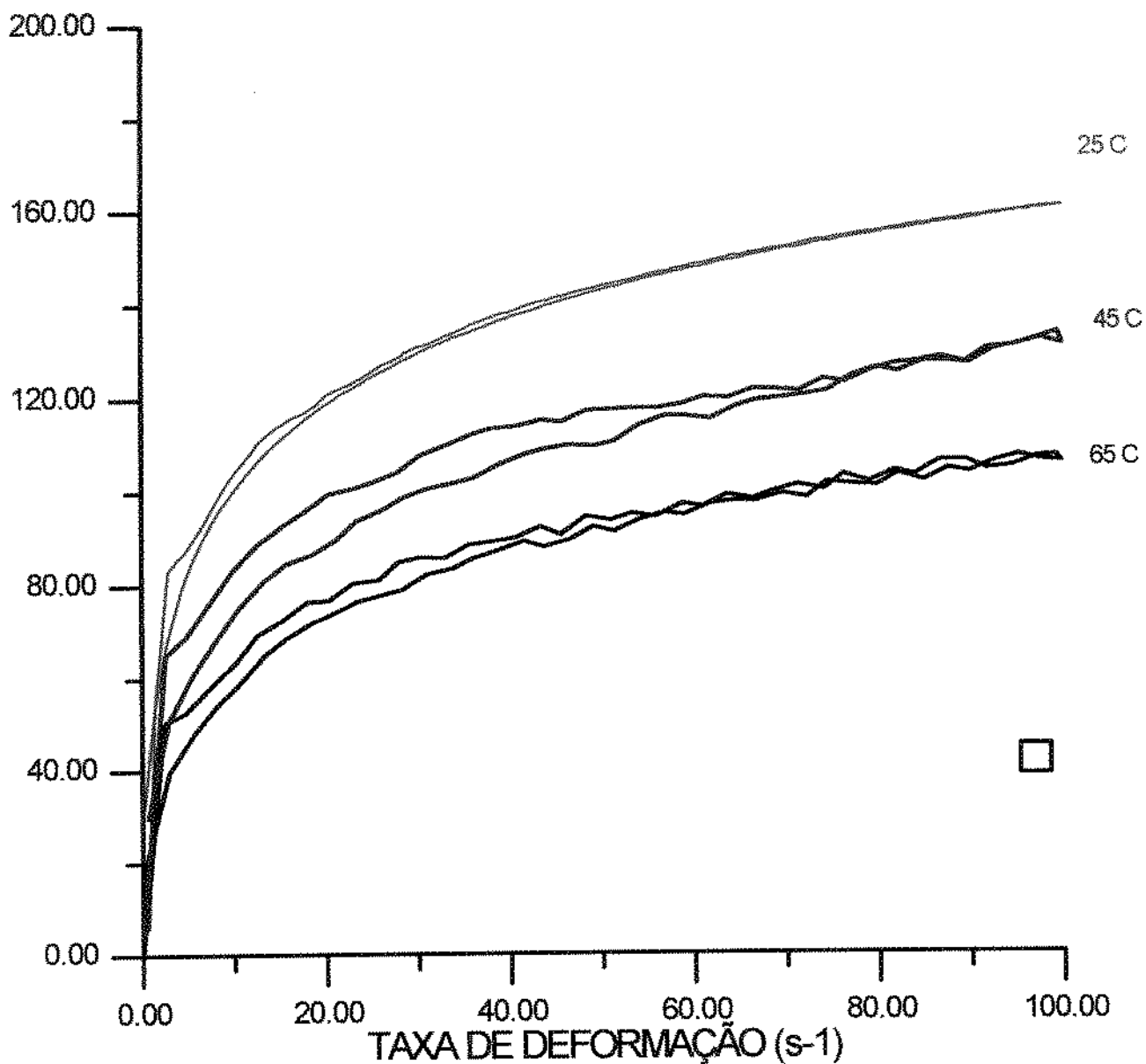


Figura 22 Comportamento reológico de soluções a 6 % de biopolímero obtidos na fermentação em meio VIII com sacarose a 27 oC determinado em reômetro Haake a 25, 45 e 65 oC.

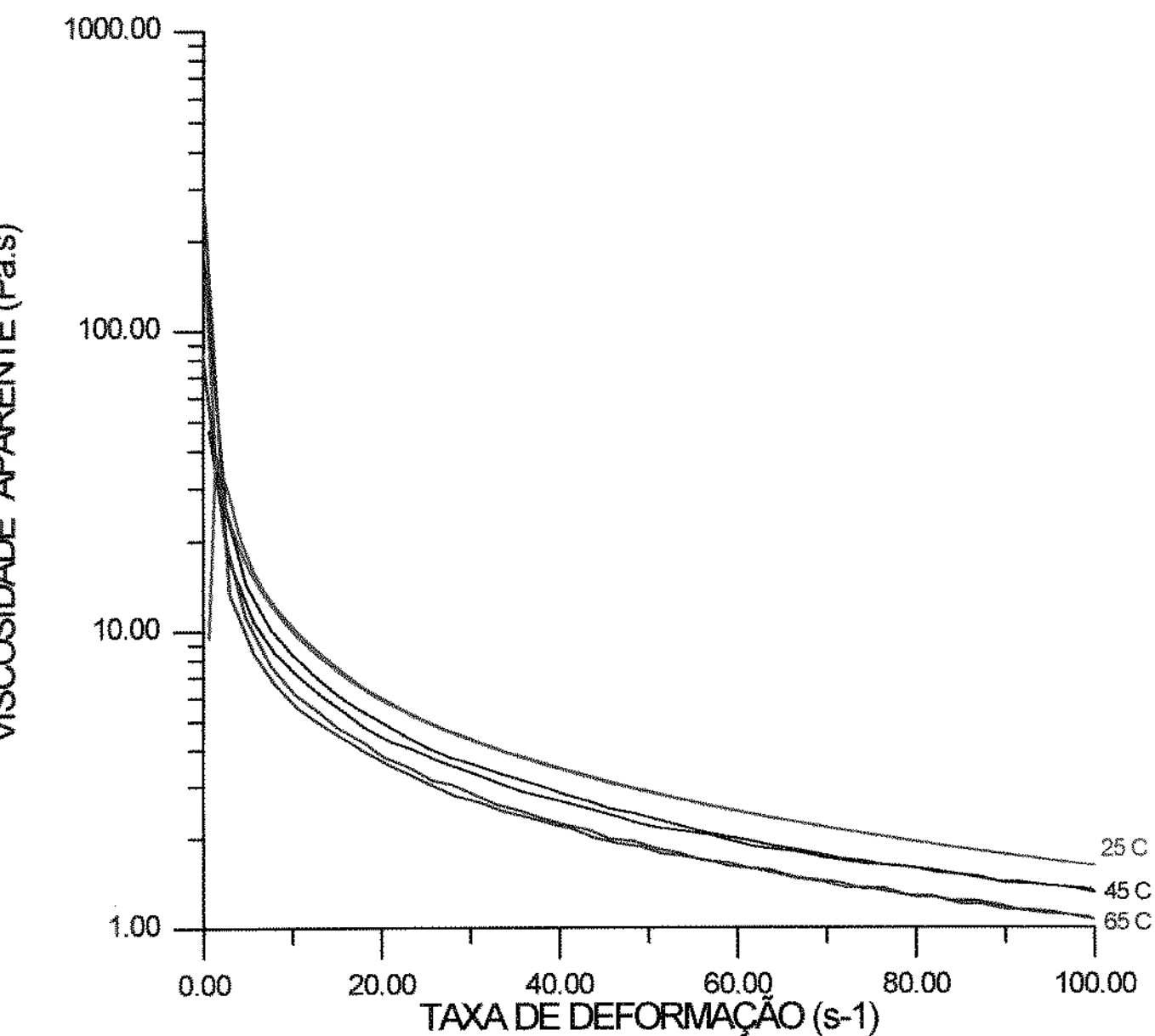


Figura 23 Viscosidade vs. Taxa de Deformação, da solução aquosa a 6% do biopolímero B-27. As curvas foram obtidas em reômetro Haake nas temperaturas de 25, 45 e 65 oC.

Provavelmente, o tipo de açúcar e a temperatura influem na produção da enzima de polimerização, resultando em polímeros com diferentes pesos moleculares. Deve ser salientado que, no processo de produção de dextrana, é possível controlar o peso molecular. A dextrana de baixo peso molecular pode ser obtida diretamente no meio de cultura, alterando-se algumas condições como a concentração inicial de sacarose e adição de outros açúcares de baixo peso molecular. (MURPHY & WHISTLER 1973). Entretanto, WILLIAMS & WIMPENNY (1977), estudando a produção de exopolissacarídeo por *Pseudomonas* NCIB-11264, verificaram que a composição do biopolímero formado foi independente da fonte inicial de carbono.

As Figuras 22, 23, 24 e 25 mostram que a viscosidade é dependente da temperatura. Porém, o polímero recupera as suas características reológicas quando medidas novamente na temperatura anterior, no caso, 25°C. Esse fato sugere que temperatura até 65 °C não tem efeito sobre a estrutura química da cadeia, mas atua sobre a conformação da mesma quando em solução.

A dependência entre a viscosidade e a temperatura foi observada por BEYER et alii (1987) que observaram para soluções a 1% do polissacarídeo produzido por *Rhizobium* CB744, medidas a 25 e 65 °C, um decréscimo da viscosidade com a taxa de deformação e com a temperatura. Entretanto, MANRESA et alii (1987) mediram a viscosidade de soluções a 1% do biopolímero GSP-910, nas temperaturas de 25, 35 e 45 °C, e obtiveram maiores valores de viscosidade para temperatura de 45 °C. Para a goma xantana, os mesmos autores determinaram um comportamento usual: maiores viscosidades à medida que a temperatura é reduzida. O mesmo comportamento para a goma xantana foi constatado por WHITCOMB & MACOSKO (1978). MARQUÉS et alii (1986) verificaram que o polissacarídeo extracelular produzido por *Pseudomonas* sp EPS-5028 em soluções a 2% mostrou a mesma viscosidade tanto a 10°C, como a 70 °C, com valores de pH variando de 1,5 a 13, sendo que esse comportamento se reproduziu quando em solução contendo 25 % de NaCl.

Os resultados do tratamento térmico da solução do biopolímero B-27 a 6% em pH 7.0, podem ser vistos nas Figuras 24 e 25. O tratamento térmico a 121 °C por 30 minutos reduziu a viscosidade aparente das soluções do biopolímero, para aproximadamente 30% do valor inicial, quando a temperatura aumentou de 25 °C para 65 °C, o que indica uma provável ruptura da molécula no tratamento térmico. Observa-se também que o

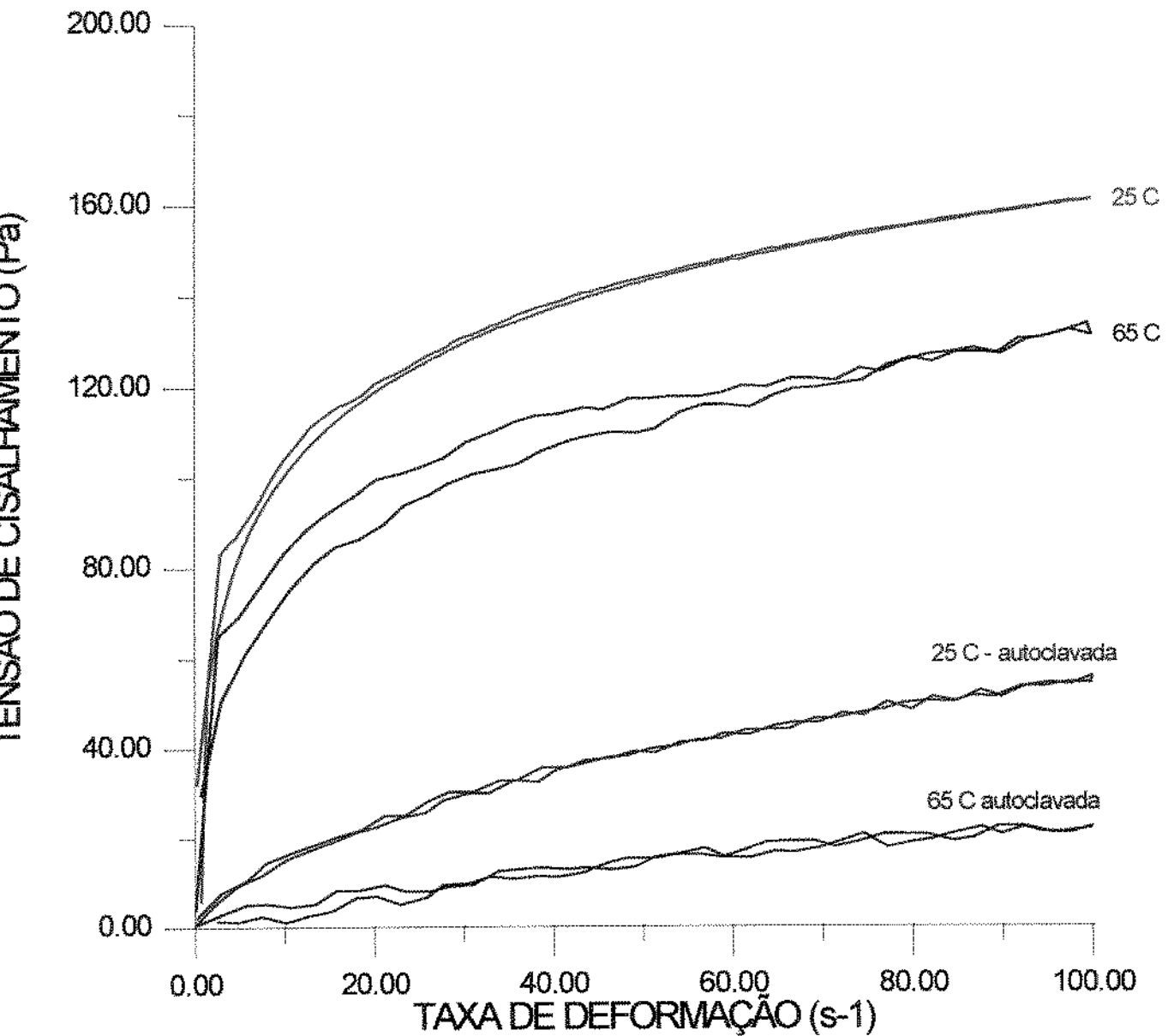


Figura 24 Efeito do tratamento térmico no comportamento reológico de soluções aquosas contendo 6% de biopolímero B-27 a pH 7, determinado em reômetro Haake a 25 e 65 oC.

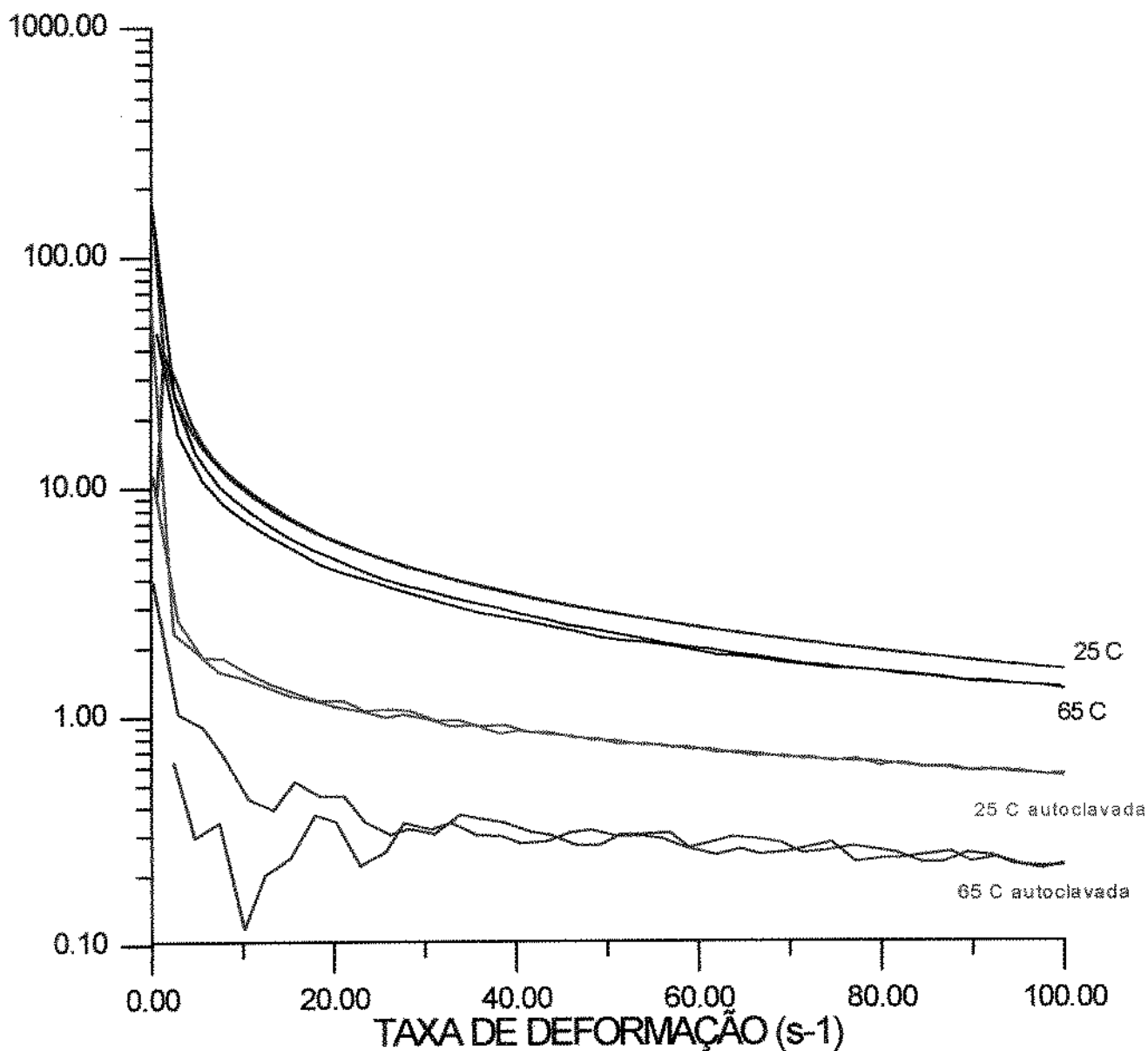


Figura 25 Viscosidade vs. Taxa de Deformação, da solução aquosa de biopolímero B-27 a 6%, submetidas ou não ao tratamento termico. As curvas foram obtidas nas determinações com reômetro Haake a 25 e 65 oC.

tratamento térmico não eliminou a histerese apresentada antes do tratamento térmico. No entanto, a solução manteve-se estável quanto à viscosidade quando o tratamento térmico foi de 100 °C e a medida foi efetuada na amostra resfriada a 25 °C.

As Figuras 22 e 23 mostram os resultados das medidas de viscosidade de soluções a 6% do biopolímero, obtidas na fermentação a 27 °C para três temperaturas. Esses resultados indicam que o biopolímero em questão é relativamente estável à temperatura, uma vez que a queda da viscosidade com o aumento da temperatura não foi acentuada. As soluções de biopolímeros são geralmente estáveis a temperaturas de até 100 °C, como demonstrado para soluções de goma xantana a 1% por WHITCOMB & MACOSKO (1978), e por SANDFORD (1982) tanto para xantana como para o polissacarídeo PS-7 produzido por *Beijerinckia indica*. No entanto, os únicos biopolímeros cujas soluções mantêm estabilidade em temperaturas superiores a 100°C são a curdulana (MIWA et alii, 1993) e a wellana, que apresentam estabilidade em temperaturas superiores a 150 °C (KANG et alii 1983). As soluções do polissacarídeo produzido por *Pseudomonas* PB1(NCIB 11264), estudado por WILLIAMS et alii (1979) apresentaram estabilidade na viscosidade somente até 60 °C, decrescendo sensivelmente até 100 °C, quando se preservou menos de 30 % da viscosidade inicial. O mesmo ocorreu com o polissacarídeo natural PS-60, produzido por *Pseudomonas elodea* (SANDFORD, 1982).

Os resultados da viscosidade aparente das soluções a 1%, 3% e 6% do biopolímero B-27, em pH 7, que foram 160 cP a 1% ; 5700 cP a 3% e 78000 cP a 6% na taxa de deformação de 0,3 s⁻¹, confirmam que há, usualmente, uma relação direta e não linear entre viscosidade e a concentração do polissacarídeo (VENDRUSCOLO, 1990). A não-linearidade entre viscosidade de soluções e concentrações do biopolímero indica ser este biopolímero um colóide linear cujas partículas interagem em solução.

O mesmo foi observado por SCHAMS & JAMES (1983), na caracterização do exopolissacarídeo produzido por *Corinebacterium* #98, quando em soluções cujas concentrações variaram de 0,5 a 2,5%. Também MARQUÉS et alii (1986), para o polissacarídeo sintetizado por *Pseudomonas* sp. cepa EPS-5028, obtiveram um aumento de viscosidade das soluções com o acréscimo da concentração, quando utilizaram sete concentrações entre 0.25 e 3.0% . Esses autores mostraram também um decréscimo da viscosidade com o aumento da taxa de deformação. Resultados semelhantes foram obtidos por

MANRESA et alii (1987) para estudos comparativos de concentrações de 0.25 até 2.0 % de polissacarídeo GSP-910 e goma xantana, onde o aumento de viscosidade das soluções foi praticamente o mesmo para as concentrações de 1.5 e 2.0%, para os dois biopolímeros. Para concentrações inferiores a essas, o aumento da viscosidade foi superior para o polissacarídeo GSP-910.

Polissacarídeos como a κ -carragenana e a λ -carragenana, também confirmam a relação direta e não linear entre a concentração e a viscosidade. A solução a 6% mostrou, na temperatura de 60 °C uma viscosidade aparente de 8000 cP e 3000 cP, respectivamente; enquanto que, para uma concentração de 3%, a viscosidade foi de 2000 cP e 500 cP (LARA, 1991).

Os resultados da influência do pH para soluções do biopolímero B-27, a 1% e 3%, podem ser vistos nas Figuras 26 e 27, onde é mostrado que se pode considerar a existência de estabilidade ao pH, visto que, para soluções a 1% a mudança de pH praticamente não altera o comportamento da solução do biopolímero B-27. No entanto, para soluções a 3%, a diferença em pH 3 é visível; possivelmente, este descréscimo ocorra devido à conformação que a molécula adquire em meio ácido, pois quando se retornou a pH 7, houve recuperação da viscosidade. A diferença de viscosidade aparente é menor para o pH 11, quando comparada ao pH 7,0.

Os resultados da adição de CaCl_2 na solução aquosa a 1% do biopolímero, podem ser vistos na figura 28. É mostrado que este sal tem influência na viscosidade, tanto para a adição de 0.5%, como 1% deste sal, em soluções a pH 3.0, pois modificaram sensivelmente a viscosidade nestas condições. Já nas soluções aquosas a 1% do biopolímero a pH 7.0, não houve alteração da viscosidade mesmo quando foi adicionado 1% de CaCl_2 . SANDFORD (1982) mostrou que não apenas o CaCl_2 , mas também outros sais como NaCl , MgCl_2 e FeCl_2 , quando adicionados nas concentrações de 1, 3, 5, 10, 15 e 20 %, em soluções a 0.5% de scleroglucana aumentaram a viscosidade das soluções. Para o polímero PS-60, produzido por *Pseudomonas elodea*, a adição de CaCl_2 na concentração de 0.1% em solução a 1,0 % do biopolímero foi suficiente para aumentar a força do gel (KANG et alii, 1982). No entanto, a adição de NaCl , nas concentrações de 0.1 a 1.0% não alteraram a viscosidade das soluções contendo 0.1% a 1.0 %, de xantana (PETTITT, 1982).

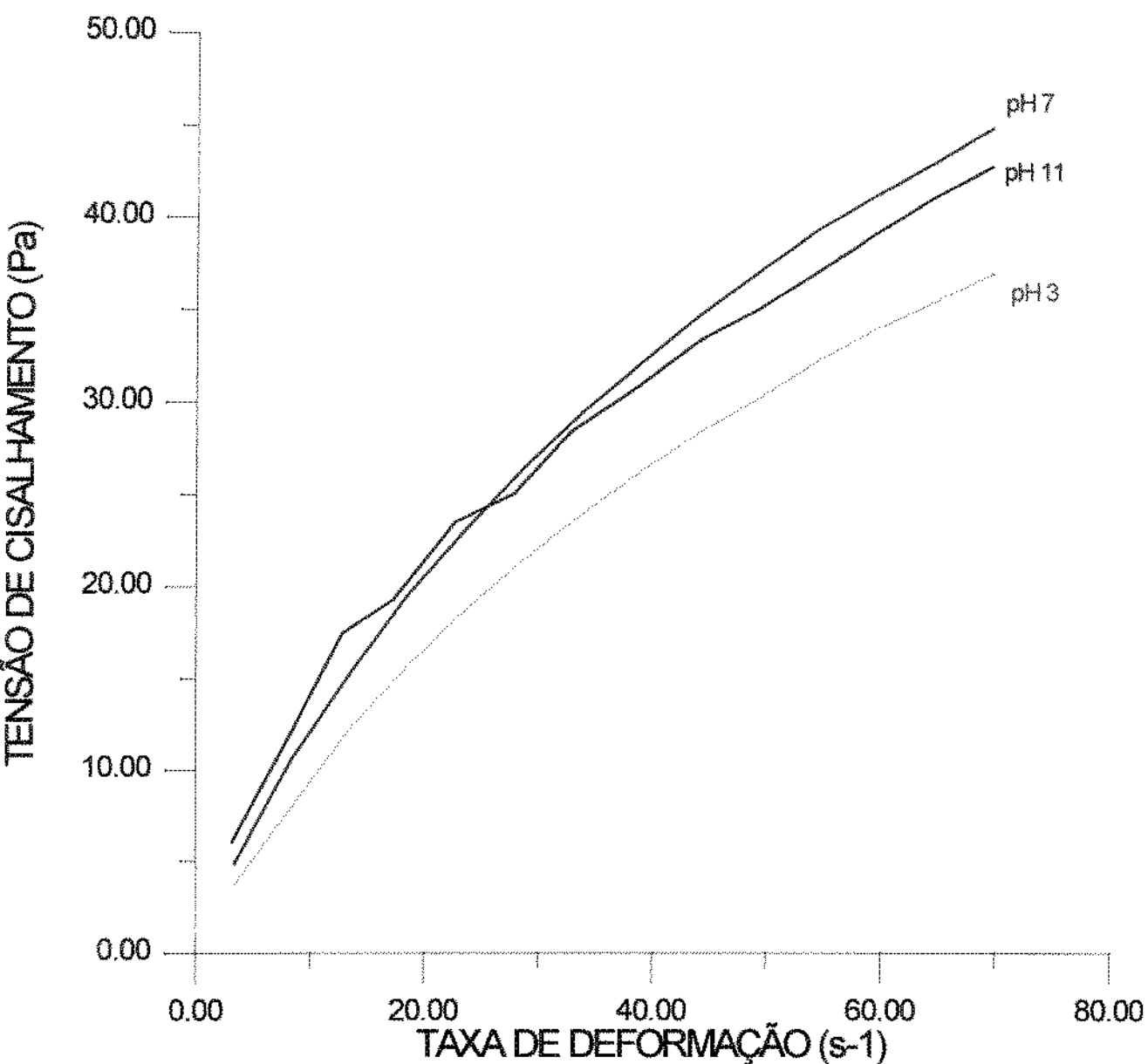


Figura 26 Comportamento reológico das soluções de 1% de biopolímero B-27 em pH 3.0, 7.0, e 11. Determinado em reômetro Brookfield LV, spindle SC4-31 a 25 oC.

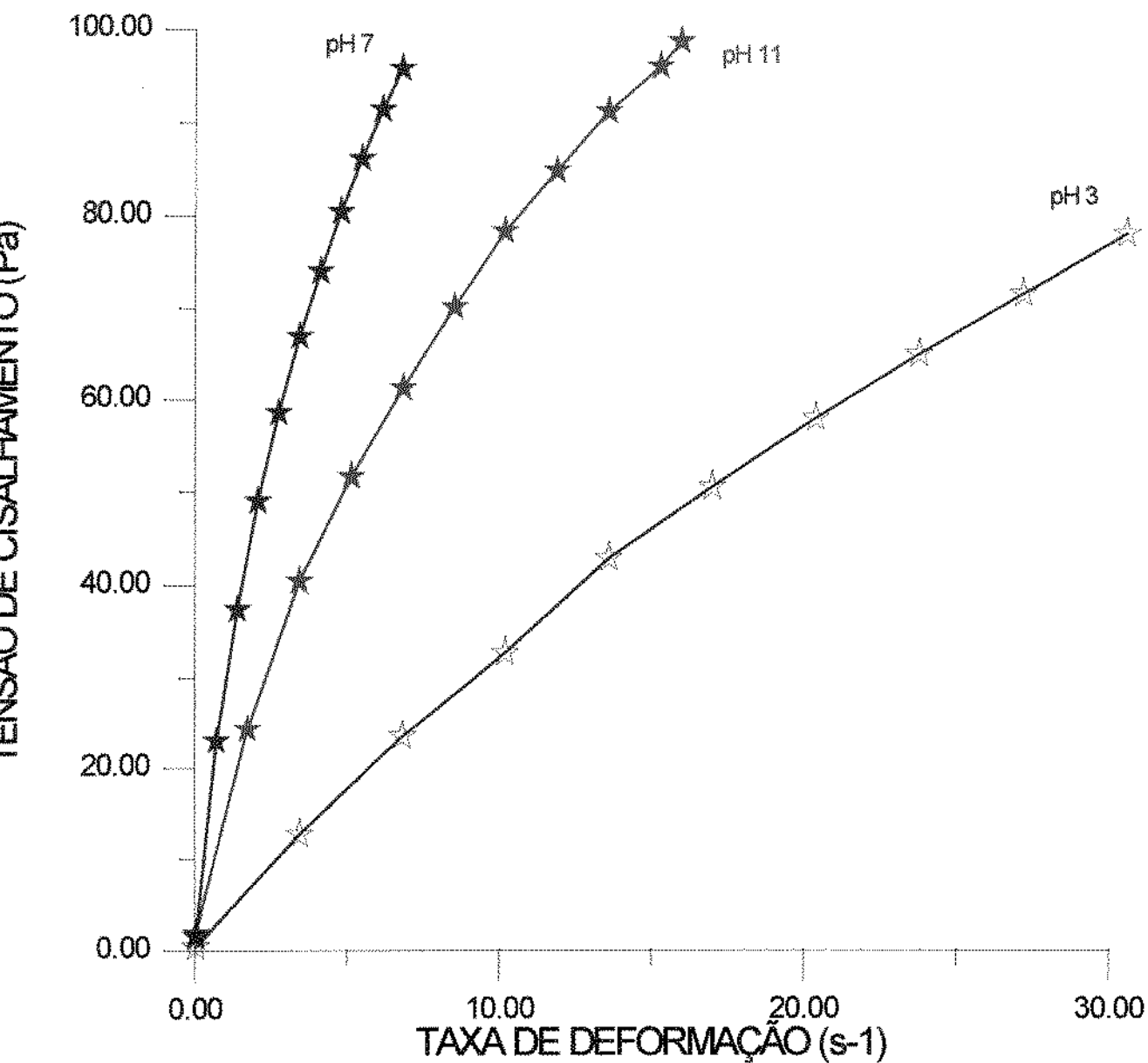


Figura 27 Comportamento reológico de soluções aquosas a 3% de biopolímero B-27 a pH 3.0, 7.0 e 11, determinados em reômetro Brookfield LV, spindle SC4-31.

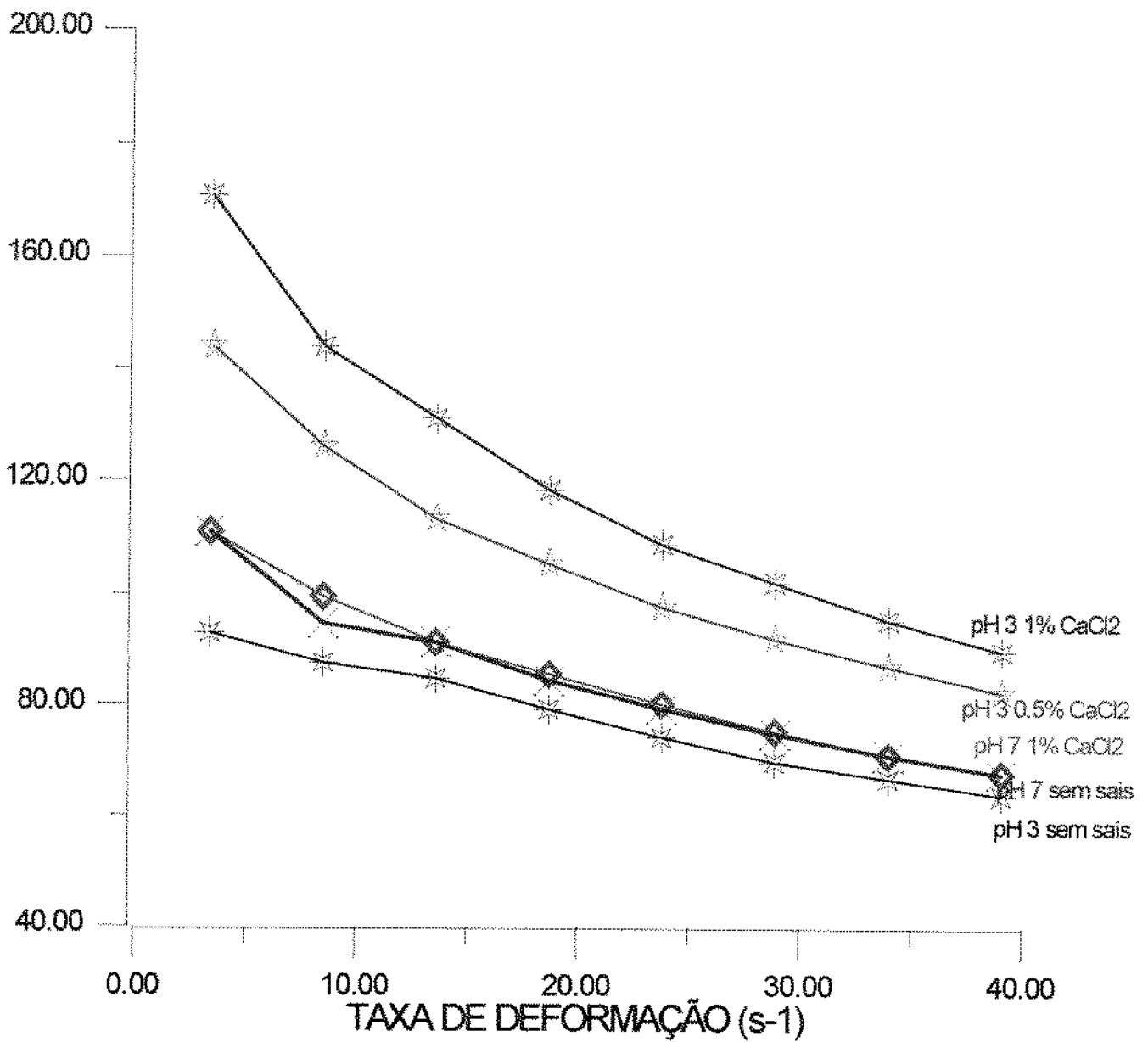


Figura 28 Viscosidade das soluções aquosas a 1% do biopolímero B-27 a pH 3 com 0.5 ou 1% de CaCl₂, pH 7 com 1% CaCl₂ ou sem sais.

5.6.2 Determinação das características elásticas do biopolímero e Espectros mecânicos das soluções

Pode-se observar, na Figura 29, para a solução a 6% de biopolímero na temperatura de 0°C, que a resposta elástica ou sólida (G') predomina sobre a resposta viscosa (G'') em toda a extensão do espectro de frequência testado. Também se observa uma baixa dependência dos dois módulos com a frequência. De acordo com MORRIS (1984) esse tipo de espectro representa que a substância forma um gel típico o qual, no caso limite, se comporta como um sólido perfeito, quando os módulos G' e G'' resultam em retas paralelas independentes da frequência. O mesmo autor afirma ainda que esse comportamento é típico para géis com ligações cruzadas não covalentes, com tendência a formarem redes tridimensionais permanentes.

A Figura 30 mostra o espectro mecânico quando se adicionou 30% de sacarose à solução contendo 6 % do biopolímero B-27. Comparado-se com a Figura 29, é possível observar que a sacarose teve pouca influência no comportamento do biopolímero, resultando em leve redução dos módulos de elasticidade e viscosidade, à medida em que se aumentou a frequência de oscilação. Conseqüentemente, a sacarose como co-soluto não foi efetiva na indução da geleificação do biopolímero B-27, contrariando a afirmativa de BACK et alli 1979, citados por OAKENFULL (1984).

Na Figura 31, é mostrado o espectro mecânico obtido para a goma Gelrite, um biopolímero produzido por bactéria, consagrado no mercado como excelente substituto do agar como agente geleificante (KELCO, 1989). Esta figura mostra que a Gelrite apresenta módulos de elasticidade e de viscosidade bastante semelhantes ao do biopolímero em questão. Nas Figuras 32 e 33, são mostrados, respectivamente, os espectros mecânicos desse biopolímero em solução aquosa a 3 % associado a 0,6 %, de goma guar e do biopolímero em solução aquosa a 6 %, contendo 50 mM de CaCl_2 . Como pode ser visto os espectros mecânicos são bastantes semelhantes ao da goma Gelrite, em que o módulo de elasticidade é superior ao módulo de viscosidade, mostrando pouca dependência da frequência de oscilação, ao contrário do módulo de viscosidade.

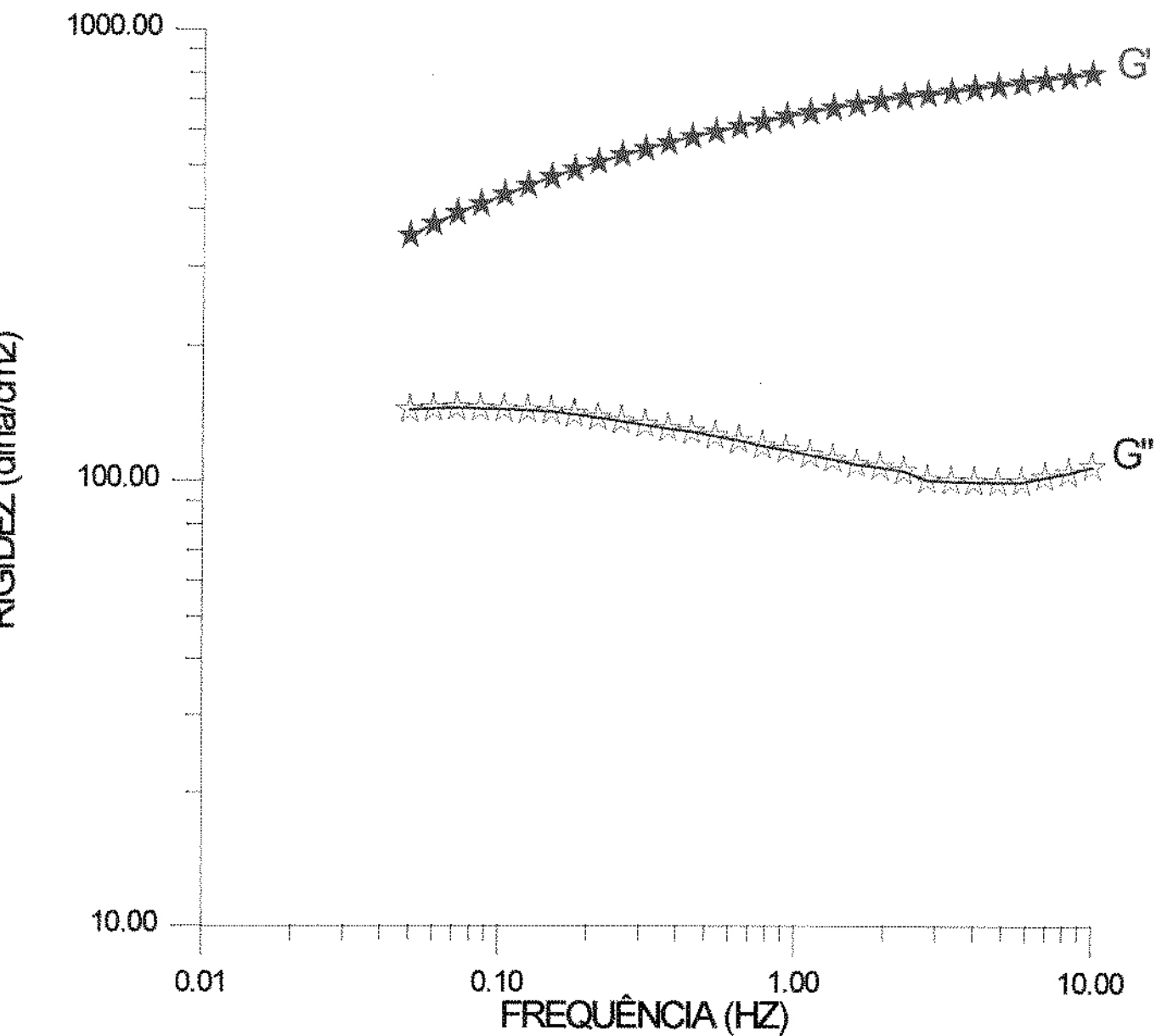


Figura 29 Espectro mecânico da solução aquosa com 6% de biopolímero B-27, determinado no VILASTIC a 0 oC.

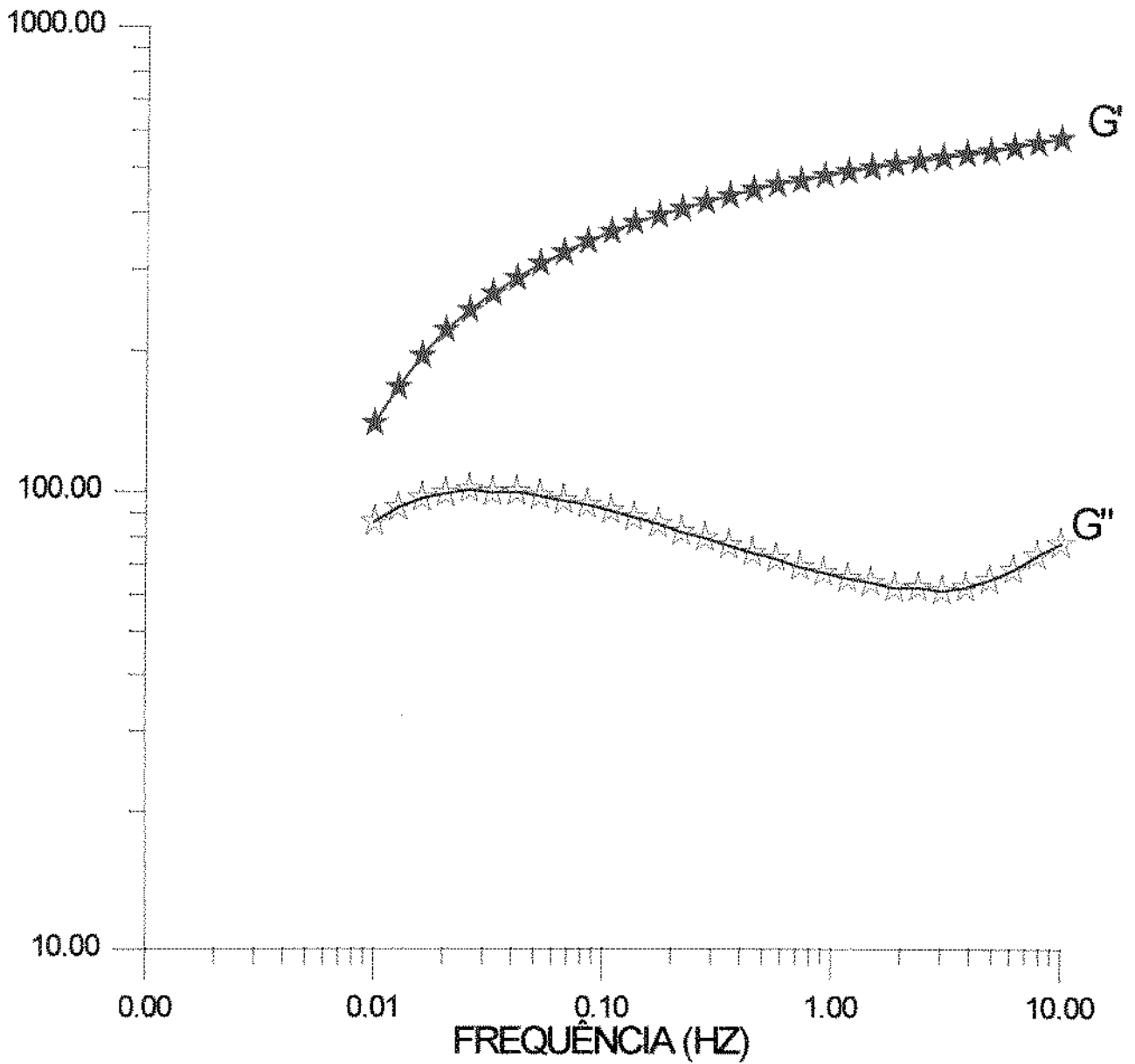


Figura 30 Espectro mecânico da solução aquosa com 6% de biopolímero B-27 e 30% de sacarose, determinado no VILASTIC a 0 oC.

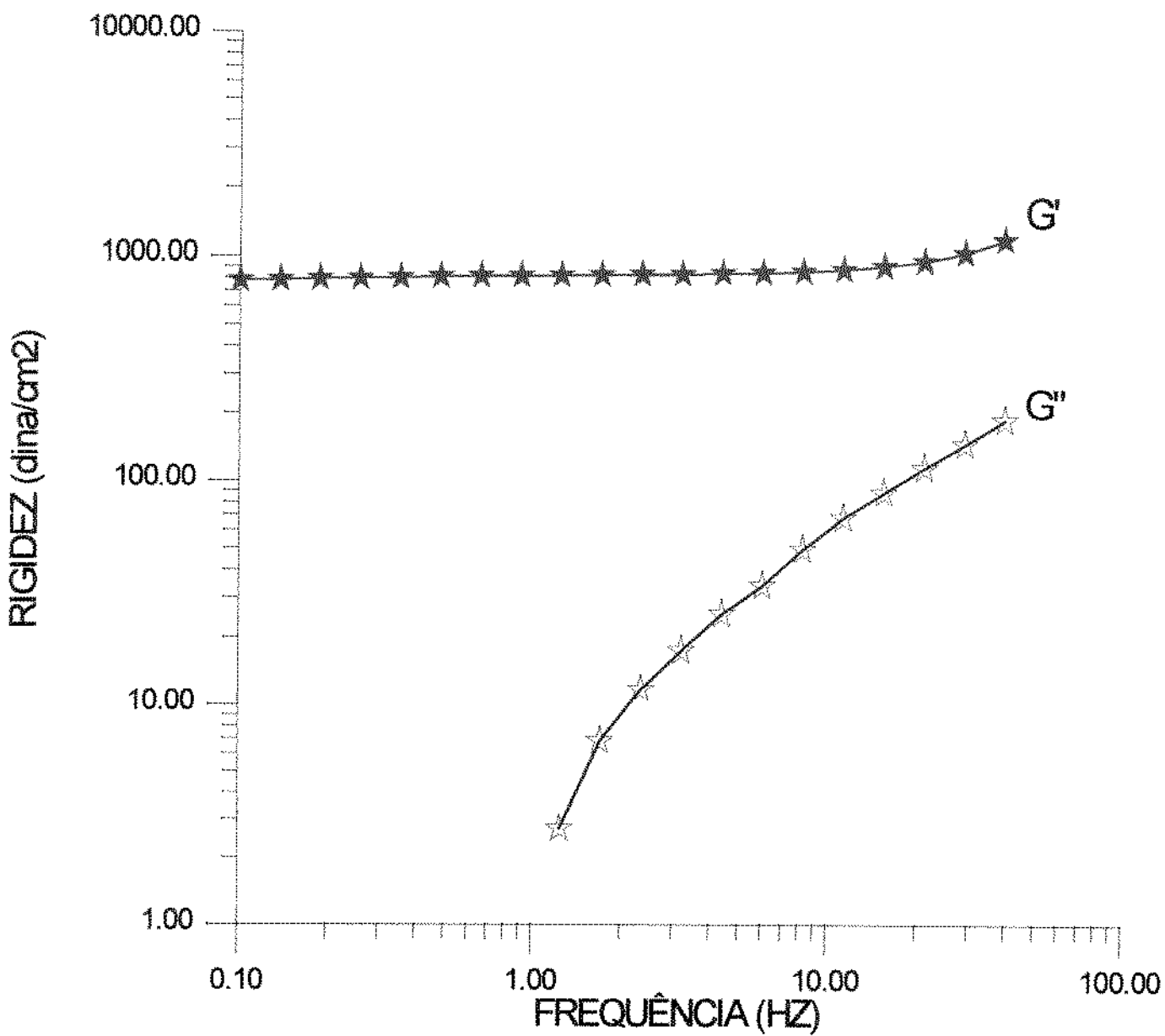


Figura 31 Espectro mecânico da solução aquosa com 1% de gelrite, determinado no VILASTIC a 0 oC.

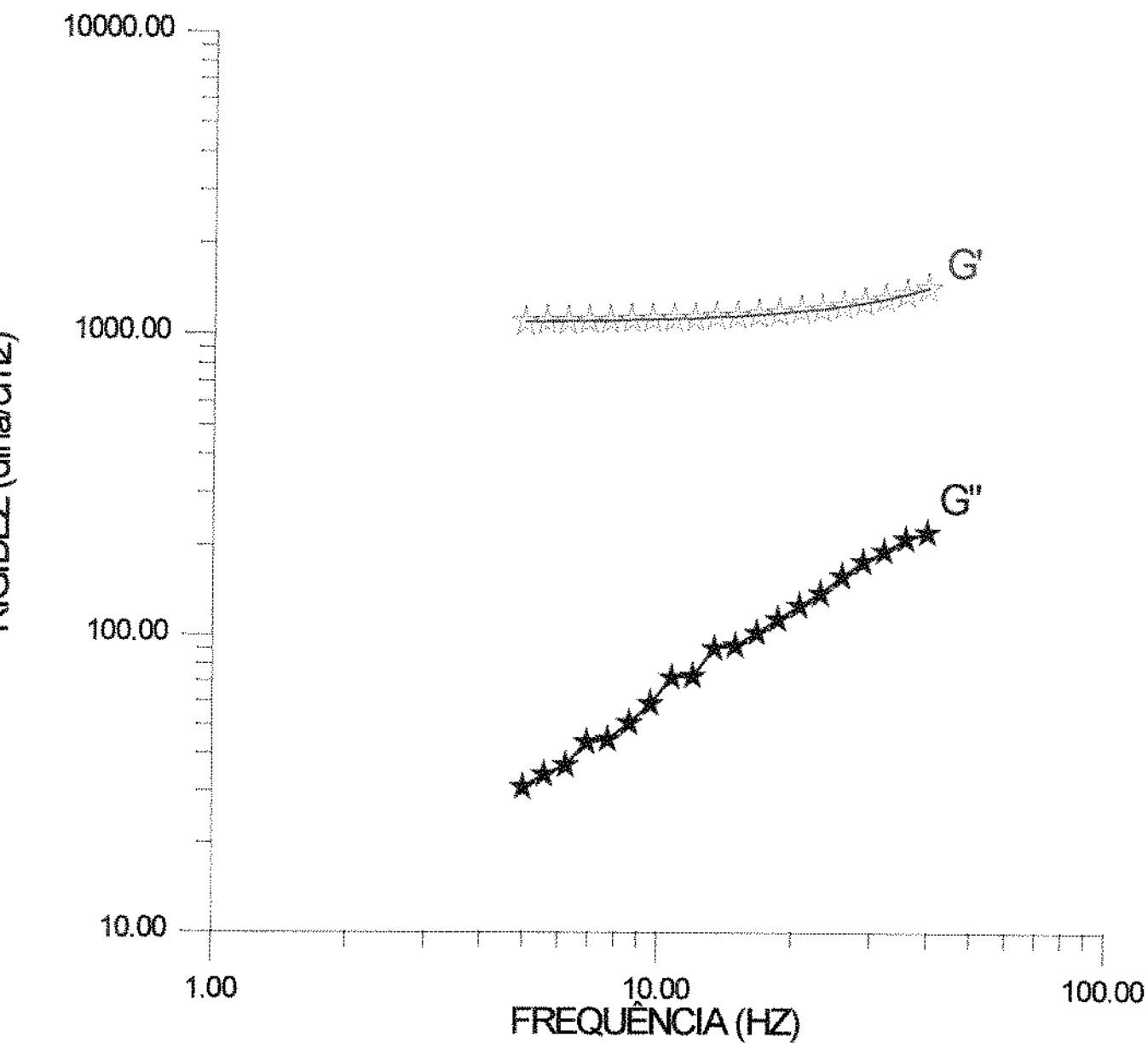


Figura 32 Espectro mecânico da solução aquosa com 3% de biopolímero B-27 e 1% de goma guar, determinado no VILASTIC a 0 oC.

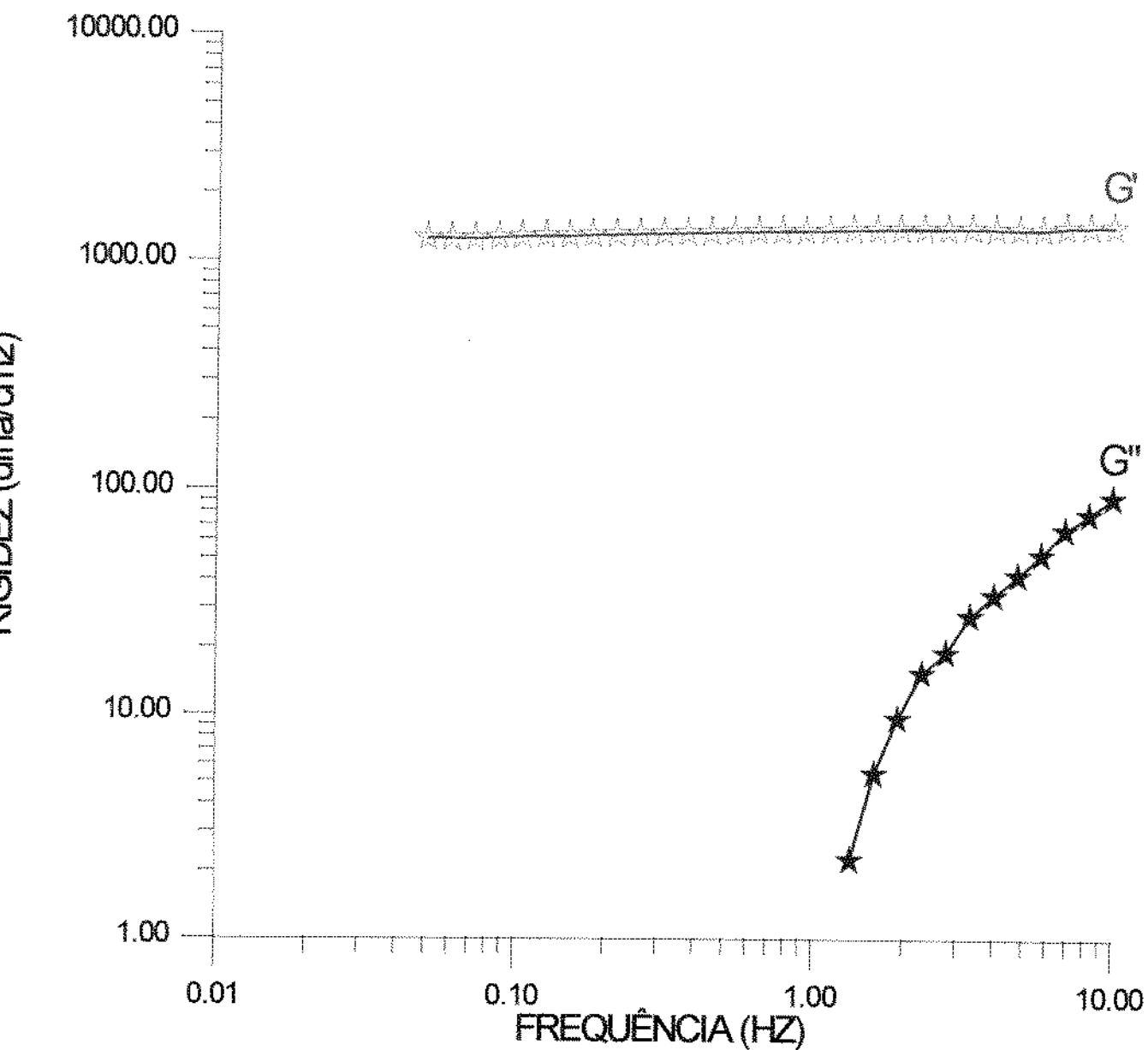


Figura 33 Espectro mecânico da solução aquosa a 6% de biopolímero B-27 contendo 50 mM de CaCl_2 , determinado no VILASTIC a 0 °C.

Deve ser ressaltado que o estudo dos espectros mecânicos das soluções do biopolímero B-27 se limitou a dar algumas indicações com respeito à capacidade de o biopolímero obtido formar géis verdadeiros. Esse ramo da Reologia é associado à Físico-Química, altamente específico e complexo, com recentes e inéditas técnicas e resultados. O presente trabalho abre um vasto campo de pesquisa, que certamente deverá ser explorado em futuro próximo. Os poucos ensaios realizados foram em condições aparentemente bastante favoráveis à formação de gel. Entretanto, MIYOSHI et alli (1993) afirmam que, se em um espectro mecânico, uma substância apresentar uma resposta elástica maior que a resposta viscosa em algum ponto dentro de um amplo espectro de frequência de oscilação, ela é altamente viável de formar gel, modificando-se as condições iniciais. Essas modificações incluem, dentre outras, a concentração, a temperatura, a adição de sais, a adição de co-solutos e a associação com outras gomas. Exemplificando essa afirmação, os autores em questão constataram que soluções da goma gelana formam géis fracos ou se comportam como soluções diluídas, quando testadas de 0 °C até 30 °C, na concentração de 2%, enquanto que a adição de sais permite a formação de géis fortes. De modo contrário, pode-se referir à goma arábica, que não forma gel em soluções de até 50 %, sendo que a adição de cátions diminui ainda mais a viscosidade das soluções (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Finalizando, pode-se afirmar que os ensaios efetuados indicam possuir o biopolímero obtido, boas características geleificantes. Entretanto, sugerem-se estudos mais aprofundados, visando a determinar os limites da sua aplicação industrial.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, fez-se o isolamento de um microrganismo para o qual foram examinados os seguintes aspectos : 1. cinética de crescimento; 2. desenvolvimento de um meio de produção de biopolímero; 3. parâmetros de produção de biopolímero; 4. composição do biopolímero e 5. reologia das soluções aquosas destes biopolímeros.

1. Os microrganismos isolados e selecionados do solo cultivado com cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto, S.P., foram identificados como *Beijerinckia* sp e as cepas foram denominadas 7070 e 9102AA'.

2. O estudo da cinética de crescimento do microrganismo em meio YM, contendo 1% de sacarose, mostrou que a cepa 7070 tem um crescimento rápido, tendo sido a fase logarítmica de crescimento, completada em 18 horas.

3. No estudo da determinação dos parâmetros para a obtenção do biopolímero, concluiu-se que :

3.1. O meio VIII, com 2% ou 5% de glicose ou sacarose, desenvolvido neste trabalho, mostrou ser eficiente para produção do biopolímero pelas cepas 7070 e 9102AA';

3.2. A influência do pH foi limitante para a produção do biopolímero. Na faixa estudada de 5,8 a 7,0, obteve-se o maior rendimento em pH em torno de 6,5;

3.3. A influência da temperatura também foi limitante na produção de biopolímero. As temperaturas estudadas foram 15, 20, 24, 27 e 30°C. A temperatura em que se obteve maior produção de biopolímero está na faixa de 20 a 24° C. Também a temperatura de fermentação mostrou influência na viscosidade aparente de soluções aquosas do biopolímero;

3.4. O tipo de açúcar influenciou no rendimento e na qualidade do biopolímero produzido. Para o meio VIII, contendo 5% de glicose ou sacarose, obteve-se maior rendimento com sacarose. Os rendimentos foram, aproximadamente 20% e 22%, respectivamente. As viscosidades aparentes

medidas a 25°C de soluções aquosas a 6% do biopolímero foram sempre maiores para os biopolímeros fermentados com sacarose. Para a sacarose, a viscosidade mínima, 39.000 cP, foi obtida a 15°C, e a máxima, 175.000 cP, a 24°C. Para a glicose, a viscosidade mínima, 19.000 cP, foi obtida a 15°C, e a máxima, 81.000 cP, a 24°C. A concentração inicial de açúcar no meio também influenciou na quantidade de biopolímero obtido, que foi maior para a concentração a 5% do que para a 2%;

3.5. O volume do meio no frasco de fermentação influenciou o rendimento do biopolímero. Obteve-se maior rendimento para os volumes de 200 e 300 ml (11,7g/l que corresponde ao rendimento de 23%). O rendimento foi 14,4% menor para o volume de 100 ml (4,5g/l igual a 9% de rendimento) e 5,4% menor para o volume de 400 ml (9,0g/l igual a 18% de rendimento).

3.6. O volume de células no meio teve influência significativa no rendimento, obtendo-se um acréscimo de 12,5% de rendimento (17,02g/l igual a 34% de rendimento), quando se usou o sobrenadante em relação a quando se utilizou o meio de células não centrifugado, (10,74g/l igual a 21,5% de rendimento).

4. O biopolímero tem a seguinte composição : glicose, galactose , manose, ácido galacturônico e ácido glucurônico.

5. Os estudos dos espectros mecânicos indicam que as soluções do biopolímero B-27 a 3% contendo 0,6% de goma guar, e as soluções a 6% do biopolímero contendo 50 mM de CaCl₂, são capazes de formar gel.

Conclusão Final

A cepa 7070 de *Beijerinckia* sp é produtora de biopolímero extracelular. O rendimento, o comportamento reológico , a estabilidade ao pH, à temperatura e ao tempo, das soluções aquosas, satisfazem as exigências mínimas necessárias para viabilizar a produção em nível industrial.

7 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

Considerando-se a experiência adquirida com o desenvolvimento deste trabalho, sugere-se:

Desenvolver, em função dos resultados encontrados, um estudo de otimização de produção de biopolímero, em fermentadores contínuos;

Determinar se a ação para produção do biopolímero é de enzima extracelular ou intracelular;

Verificar se a temperatura de fermentação influi na composição do biopolímero;

Determinar a estrutura química deste biopolímero através de cromatografia gasosa; acoplada a espectrometria de massa e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); RNM de protons e C¹³.

Determinar o peso molecular deste biopolímero por centrifugação;

Determinar em estudos mais aprofundados, o comportamento reológico do biopolímero obtido quando associado a outros biopolímeros; o estudo dos espectros mecânicos das soluções deste biopolímero, deverá ser melhor explorado;

Verificar a capacidade de fixação de Nitrogênio desta cepa 7070 de *Beijerinckia* sp em gramíneas;

Verificar a capacidade de retenção de água no solo, pela aplicação deste biopolímero na forma de pó ou de soluções.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIA -Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. **Compêndio da Legislação de Alimentos: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos** . 5 rev. São Paulo, 1992. v.1 (Decreto lei nº 55871; 1965)
- ALSOP, L. Industrial production of dextran. **Progress in Industrial Microbiol.** **18**:1-44, 1983.
- AMEMURA, A. & HARADA, T. Structural studies on extracelullar acidic polysaccharides secreted by three non-nodulatin *Rhizobia*. **Carbohydrate Research** **115**:165-174, 1983.
- ASPINALL, G. O. & JIANG, K. S. Rapeaseed hull pectin. **Carbohydrate Research** **38**:247-255, 1974.
- BECKING, J. H. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. **Soil Science.** **118**(3) : 196-212, 1974.
- BECKING, J. H. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I. Geographical and ecological distribution in soil. **Plant and Soil.** **14** : 49-81, 1961a.
- BERGDOLL, M. S. **Método de conservação de bactéria em porcelana.** Campinas, FEA, 1993. (Comunicação pessoal)
- BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. v.1. R. KRIEG. ed., Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. 964 p.
- BETZ, D. A. Xanthan gum - a biosynthetic polysaccharide for the food industry. **Food Technology in Australia** **31**:11-16, 1979.
- BEYER, R.; MELTON, D.L.; KENNEDY, D.L. Viscosity studies on the polysaccharide gum from *Rhizobium* strain CB744. **J. Sci. Food. Agric.****39**:151-161, 1987.

- BIRD, R. B.; ARMSTRONG, R.C.; HASSAGER, O. **Dynamics of polymeric liquids**. v. 1, Fluid Mechanics. New York, JohnWiley, 1977. p. 76-208.
- BJURSTROM, E. E. Fermentation systems and processes. In: KNORR, D. ed. **Food Biotechnology**. New York, Marcel Dekker, 1987.
- BLAKE, J.D. & RICHARDS, G.N. A critical reexamination of problems inherent in compositional analysis of hemicelluloses by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research** **14**:375-387, 1970.
- BORZANI, W. Cinética de processo fermentativo. In: BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. ed. **Engenharia bioquímica**. São Paulo, Edgard Blucher, 1986. p. 165-184. (Biotecnologia, v. 3)
- BOURNE, M.C. **Food Texture and Viscosity**. New York, Academic Press.1982. 325 p.
- BRUNELLO, G. & CONCONE, B. R. V. Agitação e aeração em fermentadores. In: BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. ed. **Engenharia Bioquímica**, São Paulo, Edgard Blucher, 1986. p. 137-167.
- CADMUS, M.C.; BURTON, K.A.; SLODKI, M.E. Growth-related substituent changes in exopolysaccharide of fast-growing *Rhizobia*. **Applied and Environmental Microbiology** **44**(1):242-245, 1982.
- CADMUS, M. C.; ROGOVIN, S. P.; BURTON, K. A.; PITTSLEY, J. E.; NUTSON, C. A.; JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Can J. Microbiol.** **22**:942-948, 1976.
- CAMERON, J. R. & PRUD'HOMME, R. K. Fracturing-fluid flow behavior. In: GIDLEY, J. ed. **Recent Advances in Hydraulic Fracturing Fluid Flow Behavior**. Society of Petroleum Engineers, 1990. p.177-209 (SPE Monograph Ser. v.12)

- CARROLL, V.; CHILVERS, R. G.; FRANKLIN, D.; MILES, J. M.; MORRIS, J. V., RING, G.S. Rheology and microstructure of solutions of the microbial polysaccharide from *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research** **114**: 181-191, 1983.
- CASTRO, A. F. P. Curva de crescimento bacteriano e noções sobre bacteriologia quantitativa. Campinas, UNICAMP, 1993. 25 p. (apostila de TCI).
- CERNING, C. J.; DESMAZEAUD, M. J.; BOUILLANNE, L. M. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide. **Biotechnology Letters** **8(9)**:625-628, 1986.
- CHEN, W. P.; CHENG, S. L.; LAI, C. L. Studies on gum production II. Cultivation conditions in laboratory. Report of Taiwan Sugar Research Institute, Tainan, Taiwan. Republic of China. **Taiwan sugar** **69**:45-52, 1975.
- CHEN, W. P. & TSOU, C. H. A new potential product from sucrose microbial gum. Taiwan Sugar Research Institute, Taipei, Taiwan. Republic of China. **Taiwan Sugar** **23**:14-16, 1976.
- CHENG, S. L.; CHEN, W. P.; LAI, C. L. Studies on industrial gum production by fermentation. V. An investigation on the recovery of industrial gum. Dep. by Prod. Util. Taiwan Sugar Research Institute, Tainan, Taiwan. Republic of China, **Taiwan sugar** **78**:81-87, 1978.
- CHRISTENSEN, B. E.; KJOSBAKKEN, J.; SMIDSROD, O. 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, 1985.
- CLARK, A. H. & ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Advances Polymer Science** **83**:57-192, 1987.

- CONGREGADO, F.; ESTAÑOL, I.; ESPUNY, M. J.; FUSTÉ, M.C.; MANRESA, M.A.; MARQUES, A. M.; GUINÉA, J.; SIMON-PUJOL, M. D. Preliminary studies on the production and composition of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp* EPS-5028. **Biotechnology Letters** 7(12): 883-888, 1985.
- COOKE, A. A. & PERCIVAL, E. Structural investigation of the extracellular polysaccharides elaborated by *Beijerinckia mobilis*. **Carbohydrate Research** 43:117-132, 1975.
- CORPE, W. A. Factors influencing growth and polysaccharide formation by strains of *Chromobacterium violaceum*. **J. Bacteriol.** 88:1433-1441, 1964.
- COSTILLOW, R.F. General Microbiology Laboratory. Michigan State University, East Lansing, 1974. 504 p.
- COTTRELL, I.W. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides In: SANDEFORD, P. A. & MATSUDA, K. ed. Washigton, D. C. American Chemical Society, 1979. p. 251-270 (ACS Symposium Series, 126)
- CRESCENZI, V.; DENTINI, M.; DEA, I. C. M. The influence of side-chains on the dilute solution properties of three structurally related bacterial anionic polysaccharides. **Carbohydrate Res.** 160:283-302. 1987.
- CRESCENZI, V.; DENTINI, M.; RIZZO, R.; COVIELLO, T. Comparative analysis of the behavior of gellan gum (S-60) and welan gum (S-130) in dilute aqueous solution. **Carbohydrate Research** 149:425-432, 1986.
- CRUZ, C. H. G. Contribuição ao estudo dos fatores envolvidos na produção de goma xantana por *Xanthomonas manihotis*. Campinas, 1983. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.

- DEAVIN, L.; JARMAN, T. R.; LAWSON, C. J.; RIGHELATO, R. C.; SLOCOMBE, S. The production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in batch and continuous culture. In: SANDFORD, P. A. & LASKIN, A. ed. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington D. C., American Chemical Society, 1977. p. 14-26.
- DERX, H. G. *Beijerinckia*, a new genus of nitrogen-fixing bacteria occurring in tropical soil. **Koninkl. ned. Akad. Wetenschap. Proc.** **53**:140-147, 1950.
- DERX, H. G. Further researches on *Beijerinckia*. **Ann. Bogorienses** **1**:1-11, 1950a
- DISCHE, Z. Color reactions of hexuronic acids. **Methods in Biochemical Analysis I**. New York, Interscience, 1962. p.497-501
- DISCHE, Z. New color reactions for determination of sugar in polysaccharide. **Methods in Biochemical Analysis II**. New York, Interscience, 1955.
- DOBEREINER, J. & RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia** **1**(3/4):260-271, 1958.
- DOBEREINER, J. & CASTRO, A. F. Ocorrência e capacidade de fixação de nitrogênio de bactérias do gênero *Beijerinckia* nas séries de solos da área territorial do CNEPA. **Bol. Inst. Ecol. Exp. Agric.** **16**:1-18, 1955.
- DOBEREINER, J. & LEMOS, P. Ação da sacarose e de *Beijerinckia* na fixação de nitrogênio e agregação do solo. **Bol. Inst. Ecol. Exp. Agr.** **20**:1-45, 1958.
- DOBEREINER, J. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns Estados do Brasil. **Rev. Brasil. Biol.** **19**(2): 151-160, 1959.
- DOBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Rev. Brasil. Biol.** **19**:252-258, 1959b.
- DOBEREINER, J. Nitrogen fixing bacteria of genus *Beijerinckia* derx in the rizosphere of sugar cane. **Plant and Soil.** **14**:211-217, 1961.

- DOBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas. **Rev. Brasil. Cie. Solo** **1**:1-9, 1976.
- DOMMERGUES, Y. Distribution des *Azotobacter* et des *Beijerinckia* dans les principaux types de sol de L'Ouest Africain. **Ann. Inst. Pasteur**, Paris, **105**:179-187, 1963.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** **28**(3):350-356, 1956.
- DUSSAP, C. G.; DE VITA, D.; PONS, A. Modeling growth and succinoglucan production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 9042 in batch cultures. **Biotechnology and Bioengineering** **38**:65-74, 1991.
- FAO - Food and Agriculture Organization. **Production Yearbook**. 1990
- FENANTES, E. G. Polisacáridos microbianos. In: **Prospectiva de la Biotecnología em Mexico**. Mexico, Conacit, 1985. p. 65-92.
- FETT, W.F.; OSMAN, F.S., DUNN, F.M. Characterization of expolysaccharides produced by plant-associated fluorescent *Pseudomonas*. **Applied Environmental Microbiology** **55**(3):579-583, 1989.
- FLORENZANO, G; BALLONI, W.; MATERASSI, R. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* in Venezuelan soils. Trans., 9. Intern. Congr. Soil Sci., Adelaide, 9. Australia, 1968. v.2 p.125-128
- FUKAGAWA, K.; YAMAGUCHI, ; H., UOTANI, O.; TSUIMOTO, T.; YONIZAWA, D. Structural studies of fucogalactan produced by *Rhodotorula glutinis* K-24: characterization of acetyl ester and application of sequential periodate oxidation. **Agric. Biol. Chem.** **39**(9):1703-1710, 1975.

- GAMINI, A.; CIVITARESE, G.; CESARO, A.; DELBEN, F.; PAOLETTI, S. Gelation mechanism of ionic polysaccharides. **Makromol. Chem.; Macromol. Symp.** **39**:143-154, 1990
- GLICKSMAN, M. Curdlan. In : GLICKSMAN, M. ed. **Food Hydrocolloids** Boca Raton, CRC Press, 1982. v. 1, p. 151-155.
- GLICKSMAN, M. Comparative properties of hydrocolloids. In: GLICKSMAN, M. ed., **Food hydrocolloids**. Boca Raton, CRC Press, 1982. v. 1. p. 3-18 168-199.
- HARADA, T. Succinoglucan 10C3: a new acidic polysaccharide of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenese*, **Arch. Biochem. Biophys.** **112**:65-69, 1965.
- HARADA, T In: BLANSHARD, J. M. V. & MITCHELL, J. M. ed. **Polysaccharides in Food**. London, Butterworths, 1979. p. 283-300.
- HARADA, T. Production, properties and application of curdlan. In: SANDFORD, P. A. & LASKIN, A. ed. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, D. C., A.C.S., 1977. p. 265-283.
- HARADA, T. & AMEMURA, A. Bacterial β -glycans: succinoglycan and curdlan. Mem. Inst. Sci. Ind. Res. **Osaka Univ.** **38**:37-, 1981.
- HARADA, T.; MASADA, M.; FUJIMORI, K.; MAEDA, I. Curdlan. **Agr. Biol. Chem.** **30**:196-204, 1966.
- HARADA, T.; MISAKI, A.; SAITO, H. Curdlan: a bacterial gel-forming β -1,3 glucan **Archives of Biochemistry and Biophysics.** **124**:292-298, 1986.
- HAUG, A. & LARSEN, B. An extracellular polysaccharide from *Beijerinckia indica*, containing L-guluronic acid residues. **Acta Chem. Scand.** **24**(5):1855-1856, 1970.

- HOLDSWORTH, S.D. Applicability of rheological models to the interpretation of flow and processing behavior of fluid food products. **J. of Texture Studies** 2:393-418, 1971.
- IELPI, L.; COUSO, R. O.; DANKERT, M. A. Xanthan gum biosynthesis acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar stage. **Biochemistry International**. 6:323-333, 1983.
- IIDA, H.; OCHI, T.; OHASHI, S.; KOHYAMA, K.; NISHINARI, K.; WILLIAMS, P. A.; PHILLIPS, G. O. Large deformation rheology of mixed gels of konjac-kappa-carrageenan. **Food Hydrocolloids**, Plenum Press, New York, 1993. 510 p.
- JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydr. Res.** 45:275-285, 1975.
- JEANES, A. R.; WILHAM, C. A.; MIERS, J. C. Preparation and characterization of dextran from *Leuconostoc mesenteroides*. **J. Biol. Chem.** 176:603-615, 1948.
- JEANES, A. R. In: SANDFORD, P. & LASKIN, A. ed. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, American Chemical Society, 1977. p. 284-298
- JEANES, A. R. Preparation of dextran from growings *Leuconostoc* cultures. **Methods in Carbohydrate Chemistry** 5:118-132, 1965.
- JEANES, A. R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. Polysaccharide of *Xanthomonas campestris* NRRL-B- 1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. ARS-NC-51. Washington, D. C. Agriculture Research Service, U.S. Department of Agriculture, 1976.
- JARMAN, T. R. & GOVAN, J. R. W. U.S. Patent 4 235 966, 1980.

- KANEKO, T. & KANG, K. S. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species - taxonomical studies In: Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 79 Los Angeles, CA, 4/8 may, 1979. **Abstracts** p.101
- KANG, K. S. & McNEELY, W. Patente U.S. 3 960 832. 1976
- KANG, K. S. & McNEELY, W. PS-7 - A new bacterial heteropolysaccharide In: SANDFORD, P. A. & LASKIN, A. ed. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, D. C. American Chemical Society, 1977. p. 220-230. (A.C.S. Symposium Series, 45).
- KANG; K.S.; VEEDER, G.T. ; MIRRASOUL, P.J.; KANEKO, T.; COTTRELL, I.W. PS-60-agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology** 43(5):1086-1091, 1982.
- KANG, K. S., VEEDER, G. T., COTTRELL, I. W. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. In: BUSHELL, M. E. ed. **Progress in Industrial Microbiology** 18:231-257, 1983.
- KELCO The preparation of kelcogel gellan gum gels. Kelco Division of Merck Co., New Jersey, USA, 1989. (Technical bulletin RC-137)
- KLUYVER, A. J. & BECKING, J. H. Some observations on the nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* derx. **Ann. Acad. Sci. Fenn.**, A II, 60: 367-380, 1954.
- KREBS, K.G.; HEUSSER, D.; WIMMER, H. Spray reagents. In: STAHL, E. ed. **Thin layer chromatography**. 2.ed. New York, Springer Verlag, 1969. p. 854-905.
- LAWFORD, H.G.; PHILLIPS, K.R.; LAWFORD, G.R. A two stage continuous process for the production of thermogelable curdlan type exopolysaccharide. **Biotechnol. Lett.** 4(11):669-694, 1982.

- LAPASIN, R.; PRICL, S.; BERTOCCHI, C.; NAVARINI, L.; CESARO, A.; PHILLIPS, R. Rheology of culture broths and exopolysaccharide of *Cyanospira capsulata* at different stages of growth. **Carbohydrate Polymers** **17**: 1-10, 1992
- LARA, S. H. Tecnologia geral de aplicação de carragena. In: SIMPÓSIO SOBRE HIDROCOLÓIDES. Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 25/25 abril 1991. **Anais** p. 22-50
- LAWRENCE, A. A. **Edible gums and related substances**. Park Ridge, Noyes Data, 1973. 339 p.
- LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E. B. O valor das gomas para indústria. **Ciência Hoje** **12**(71): 65-67, 1991.
- LÓPEZ, R. & BACKING, J. H. Polysaccharide production by *Beijerinckia* and *Azotobacter*. **Microbiol. Españ.** **21**:53-75, 1968.
- MAEDA, I.; SAITO, H.; MASADA, M.; MISAKI, A.; HARADA, T. Properties of gels formed by heat treatment of curdulan, a bacterial β -1,3 glucan. **Agr. Biol. Chem.** **31**(10) 1184, 1967.
- MANRESA, A.; ESPUNY, M. J.; GIUNEA, J.; COMELLES, F. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas sp* GSP-910. **Applied and Microbiology Biotechnology** **26**:347-351, 1987.
- MARIUZZO, D. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; SOUZA, M.; MAZIERO, G. C.; VENDRUSCOLO, C. T. **Use of xanthan gum in non-fat dairy desserts**. In: GUM AND STABILIZERS FOR THE FOOD INDUSTRY CONFERENCE, 7., 1993. Wrexhan, Reino Unido. **Abstracts** p. 87
- MARKOVITZ, A. & SYLVAN, S. Effect of sodium sulphate and magnesium sulphate on heteropolysaccharide synthesis in gram-negative soil bacteria. **Journal of Bacteriology** **83**:483-489, 1962.

- MARQUÉS, A.M.; ESTANOL, I.; ALSINA, J.M.; FUSTÉ, C.; SIMON-PUJOL, D.; GUINEA, J.; CONGREGADO, F. Production and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp* strain ESP-5028. **Applied Environmental Microbiology** **52**(5):1221-1223, 1986.
- MASAKUNI, T. & MASAHIRO, K. Rheological properties of welan gum in aqueous media. **Agric. Biol. Chem.** **54**:3079-3084, 1990.
- MATSUMOTO, T. & MASHICO, K. Viscoelastic properties of alginate aqueous solutions in the presence of salts. **Biopolymers**, **29**:1707-1713 1990.
- MAUGERI FILHO, F. Produção de dextrana-sacarase; Relatório Científico Processo nº 85/0845-9, Campinas, FEA. UNICAMP. 1988. 99 p.
- McCOMB, E.A. & McCREADY, R.M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. **Anal. Chem.** **29**:818-821, 1957.
- MIAN, A.F.; JARMAN, R.T.; RIGHELATO, C.R. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology** **134**(2):418-422, 1978.
- MISAKI, A. Structural aspects of some functional polysaccharides. In : NISHINARI, K. & DOI, E. ed. **Food hydrocolloids**. . New York, Plenum Press, 1993. p.1-20.
- MIWA, M.; NAKAO, Y.; NARA, K. Food applications of curdulan. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. **Food hydrocolloids**. New York, Plenum Press, 1993. p. 119-124.
- MIYOSHI, E.; TANAKA, T.; NISHINARI, K. Gel - sol transition in gellan gum solutions. I - Rheological studies on the effects of salts. Seminário apresentado por K. NISHINARI, FEA - UNICAMP 1993.

- MOCHI, A. C. & SCAMPARINI, A. R. P. Determinação dos parâmetros para produção da goma xantana. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 13. São Paulo, 1992. **Programa e resumos** p. 243.
- MOCHI, A. C. & SCAMPARINI, A. R. P. Xanthan gum production from Brazilian strains. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. **Food hydrocolloids**. New York, Plenum Press, 1993. p. 147-150.
- MOHSEENIN, N. N. **Rheology**. In: Inciclopedia of food science. Westport, AVI, 1976. p. 663-669
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Review of Microbiology** 3:371-393, 1949.
- MORAINÉ, R. A. & ROGOVIN, P. Kinetics of the xanthan fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 15:225-237, 1973.
- MORITAKA, H.; NISHINARI, K.; NAKAMURA, N.; FUKUBA, H. Effect of potassium chloride and sodium chloride on the thermal, properties of gellan gum gels. **Biosci. Biotech. Biochem.** 56(4): 595-599, 1992.
- MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. ed. **Gums and stabilisers for the food industry**. Oxford, Pergamon Press, 1984. p.57-78
- MORRIS, E. R.; CUTLER, A. N.; ROSS-MURPHY, S. B.; REES, D. A. Concentration of shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solution. **Carbohydr. Polym.** 13:85, 1981.
- MORRIS, R. Rheological and organoleptic properties of food hydrocolloids. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. **Food Hydrocolloids**. New York, Plenum Press, 1993. p. 201-210
- MORRIS, V. Biotechnically produced carbohydrates with functional properties for use in food systems. **Food Biotechnology** 4(1):45-57, 1990.

- MORRIS, V. J. Science, structure and applications of microbial polysaccharides. In: PHILLIPS, G.O.; WEDLOCK, D.J.; WILLIAMS, P. A. ed. **Gums and stabilisers for the food industry 6**. Oxford, IRL Press, 1992. p.315-328
- MOUREAUX, C. Quelques aspects microbiologiques de divers sols du cristallin central de Madagascar. INTERN. CONGR. SOIL SCI, 5 Leopoldville, 3:67-70, 1954.
- MURO, M. A. & LUCHI, M.R. **Preservação de Microorganismos**. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Toselo 1989. 64p.
- MURPHY, P. T. & WHISTLER, R. L. Dextrans. In: WHISTLER, R. L. & BEMILLER, J. N. ed. **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives** . 2.ed. New York, Academic Press, 1973. p. 513-542.
- NAKANISHI, I.; KIMURA, K.; KUSUI, S.; YAMAZAKI, E. Complex formation of gel-forming bacterial β -1,3 D-glucan with dyes in aqueous solution. **Carb. Res.** 32:47-52, 1974.
- NISHINARI, K. & DOI, E. ed. **Food Hydrocolloids**. New York, Plenum Press, 1993. 510p.
- OAKENFULL, D. **Gelling Agents**. CSIRO Division of Food Research. North Ryde, Australia, 1984. (paper accepted by CRC - Critical Review in Food Science and Nutrition)
- O'NEILL, M.; SELVENDRAN, R. R.; MORRIS, V. J. Structure of the acid extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research** 123:123-133, 1983.
- PELCZAR, M.; REIDE, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo, McGraw-Hill, v. 1, 1980.
- PETTITT, D. J. Xanthan gum. In: GLICKSMAN, M. ed. **Food Hydrocolloids**. Boca Raton, C.R.C. Press, 1982, p. 127-147.

- PONS, A.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Modelling *Xanthomonas campestris* bath fermentation in a bubble column. **Biotechnol. Bioeng.** **33**:394-403, 1989.
- QUEIRÓZ, J. H. Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides*. Campinas, 1987. 118 p. (Tese de Mestrado. FEA. UNICAMP).
- RAO, M. A. Rheological properties of foods. In: RAO, M. A. & RIZVI, S. S. **Engineering Properties of Foods**. New York, Marcel Dekker, 1986. p. 1-47
- RAO, M. A. & KENNY, J. F. Flow properties of selected food gums. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.** **8**:142-148, 1975.
- REED, G. Microbial biomass. Single cell protein and other microbial products. In: REED, G. ed. **Prescott & Dunn's Industrial Microbiology**. Westport, AVI, 1983 p. 543-557
- READ, R. R. & CONSTERTON, J. W. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Can. J. Microbiol.** **33**:1080-1090, 1987.
- RINAUDO, M. On the relation structure-properties of some polysaccharides used in the food industry. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. **Food hydrocolloids** New York. Plenum Press. 1993. 510p.
- ROCHAS, C. & RINAUDO, M. Calorimetric determination of the conformational transition of kappa-carrageenan. **Carbohydr. Res.** **105**:227-236, 1982.
- ROCHAS, C. & RINAUDO, M. Mechanism of gel formation in kappa-carrageenan. **Biopolymers** **23**:735-745. 1984.
- ROGOVIN, S. P.; ANDERSON, R. F.; CADMUS, M. C. Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. **J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.** **3**:51-, 1961.

- ROSATO, Y. B.; DESTEFANO, S.A.; DANIELS, M. J. Cloning of a locus involved in pathogenicity and production of extracellular polysaccharide and protease in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **SEMS - Microbiology Letters** **117**:41-46, 1994.
- ROGOVIN, S. P. & ALBRECHT, W. J.. Recovering microbial polysaccharides from their fermentation broths. U.S. Pat. 3.119.812, 1964.
- SANDERSON, G. R. & CLARK, R. C. Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing and texturizing agent. **Food Technology** **37**:63-70, 1983.
- SANDERSON, G. R. . Gellan gum. **Applied Science** **479**:201-232, 1990.
- SANDFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. **Adv. in Carb. Chem. and Biochem.** **36**:292-296, 1979.
- SANDFORD, P. A. Potential important microbial gums In: GLICKSMAN, M. **Food hydrocolloids**. ed., Boca Raton, C.R.C. Press, 1982. v. 1, p.168-199.
- SANDFORD, A. P.; COTTRELL, W. I.; PETTITT, D. J. Microbial polysaccharides: new products and their commercial applications. **Pure and Applied Chemistry** **56(7)**:879-892, 1984.
- SANDFORD, P. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; WATSON, P. R.; CADMUS, M. C.; JEANES, A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: SANDFORD, P. A. & LASKINS, A. ed. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washigton, D. C., American Chemical Society, 1977. p. 192-210.
- SANDVIK, E. I. & MAERKER, J. M. Application of xanthan gum for enhanced oil recovery. In: SANDFORD, P. A. & LASKINS, A. ed. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, DC American Chemical Society, 1977. p. 242-264

- SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana - Produção e Aplicação; Relatório do Projeto 2869/87. Campinas, FINEP / Departamento de Ciência de Alimentos - UNICAMP, 1987. 15 p.
- SCAMPARINI, A. R. P. Modification of xanthan gum. In: WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 8. Toronto, Canada, 1991. **Program and Abstracts**, p. 177.
- SCAMPARINI, A. R. P. Chemical modification of xanthan gum. AMOSTRA INTERNA DE TRABALHOS CIENTÍFICOS, 3. Campinas, FEA - UNICAMP, 1993. 7p.
- SCAMPARINI, A. R. P. & ROSATO, Y. B. Production of xanthan gum. In: EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, Amsterdam, June, 1987.
- SCAMPARINI, A. R. P.; PASTORE, G. M.; MACHADO; D. H. D.; VENDRUSCOLO, C. L. Stabilization of powder chocolate. CONFERENCE OF PROCEEDING OF FOOD INGREDIENTS. Asia. 1992. p. 72-84.
- SCAMPARINI, A. R. P.; ROSATO, Y. B.; TIBANA; R.M. Estabilidade ao pH e à temperatura de gomas produzidas por isolados de *Xanthomonas*. FENABIO/001/004 UNICAMP, 1994. p. 1-4
- SCAMPARINI, A. R. P.; VENDRUSCOLO, C. T.; SANTUCCI, F.; PEREIRA, J. L. Gellan gum: production and properties. In: INTERNATIONAL CONFERENCE AND INDUSTRIAL EXHIBITION OF FOOD HYDROCOLLOIDS. Tsukuba, nov. 1992a. **Abstracts**. p.23.
- SHAMS, M. A. & JAYNES, H.O. Characterization of exopolysaccharide produced by *Corynebacterium* #98 in cheese substrate. J. of Food Science 48:208-211, 1983.
- SILMAN, R. W. & ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation. **Biotechnol. Bioeng.** 12: 75-83, 1970.

- SLODKI, M. & CADMUS, M. Production of microbial polysaccharides. **Adv. Appl. Microbiol.** 26:19-, 1979.
- SLONEKER, H.; ORENTAS, D. G.; JANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Can. J. Chem.** 40:2066-2071, 1962.
- SOUW, P. & DEMIAN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Appl. Environm. Microbiol.** 37:1186-1192, 1979.
- STADING, M. Gel structure and rheology in theory and practice. Tese PhD. Dep. of Food Science, Chalmers University of Technology, Sweden, 1988. 119 p.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysacchrides - potential. **Process Biochemistry** 7(11):27-, 1972.
- SUTHERLAND, I. W. *Xanthomonas* polysaccharides improved methods for their comparison. **Carbohydrate Polymers** 1:107-115, 1981.
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysacchrides. **Advances in Microbial Physiology** 23:79-150, 1982.
- SUTHERLAND, I. W. 1983. Extracellular polysaccharide. In: DELLWEY, H. ed. **Biotechnology**. Weinhein, Verlag Chemie, 1983. v.3 p.553-574
- SZCZESNIAK, A. S. Rheological basis for selecting hydrocolloids for specific applications. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. ed. **Gums and stabilisers for the food industry**, 3. London, Elsevier, 1985. p 311-323
- TCHAN, Y. T. Presence of *Beijerinckia* in northern australia and geographic distribution. **Proc. Linn. Soc. N. S. Wales** 78:171-178, 1953.
- TAKO, M. & KIRIAKI, M. Rheological properties of wellan gum in aqueous media. **Agric. Biol. Chem.** 54(12): 3079-3084, 1990.

- TAKO, M. & NAKAMURA, S. Rheological properties of Ca salt of xanthan in aqueous media. **Agric. Biol. Chem.** 51(11):2919-2923, 1987.
- UHLINGER, D. J. & WHITE, D. C. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. **Appl. and Environmental Microbiology** 45(1):64-70, 1983.
- VENDRUSCOLO, C. T.; PEREIRA, J. L.; SCAMPARINI, A. R. P. Gellan gum - production and properties. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. **Food hydrocolloids**, New York, Plenum Press, 1993. p.91-95.
- VENDRUSCOLO, J. L. Reologia de alimentos fluidos. Seminário apresentado à Escola Politécnica da USP - Departamento de Engenharia Química. São Paulo, abril 1990. 20 p.
- VOLPATO, A. M. & SCAMPARINI, A. R. P. Cinética do crescimento de bactérias dos gêneros *Xanthomonas* sp e *Pseudomonas* sp. Projeto de Desenvolvimento de Tecnologia Industrial. DCA - FEA - UNICAMP 1993. (Relatório Técnico)
- VILOCHE BAZÁN, J. H. Estudo da produção enzimática da dextrana clínica. Campinas, 1994. 138 p. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.
- WELLS, J. A critical overview. In: SANDFORD, P. A. & LASKINS, A. ed. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, DC, American Chemical Society, 1977. p.299-325
- WHITCOMB, P. J. & MACOSKO, C. W. Rheology of xanthan gum. **Journal of Rheology** 22(5):493-505, 1978.
- WILKINSON, J. F. The extracellular polysaccharide of bacteria. **Bacteriological Review** 22:46-73, 1958.
- WILLIAMS, A. G.; WIMPENNY, J. W. T.; LAWSON, C. J. The production of an extracellular polysaccharide by a *Pseudomonas* - type microorganism. **Journal of General Microbiology** 5:76-77, 1973.

- WILLIAMS, A. G. & WIMPENNY, J. W. T.. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NC1B 11264 grown in batch culture. **Journal of General Microbiology** **102**:13-21, 1977.
- WILLIAMS, D. F. & SCHWARZHOFF, H. R. Nature of the swarming phenomenon in *Proteus*. **Annual Review Microbiology** **32**: 101-122, 1978.
- WILLIAMS, G. A.; WIMPENNY, T. W. J.; LAWSON, J. C. 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, 1979.
- WILLIAMS, P. A. Mixed polysaccharide gel formed between xanthan gum and glucomannan. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed. **Food Hydrocolloids**. New York, Plenum Press, 1993. p. 435-449
- ZAHORSKI, S. **Mechanics of viscoelastic fluids**. Hague, Martinus Nijhoff. 1982, 311p.