

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

9616211

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS PARÂMETROS DE
FERMENTAÇÃO POR *Beijerinckia* sp**

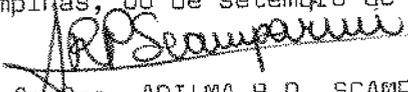
IRIANI RODRIGUES MALDONADE

Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
Orientadora

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por IRIANI RODRIGUES MALDONADE e aprovada pela Comissão Julgadora em 06.09.96.

Campinas, 06 de setembro de 1996


Profa. Dra. ADILMA R.P. SCAMPARINI
Presidente da Banca

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas, 06 de setembro de 1996.

CM 00092797-8

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TUNICAMP
	M293c
V.	Es.
TIPO BC/	28732
PROC.	667/96
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	02/10/96
N.º CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M293c

Maldonade, Iriani Rodrigues

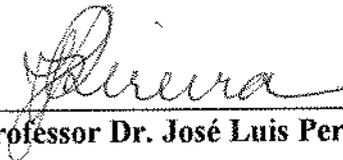
Contribuição ao estudo dos parâmetros de fermentação por
Beijerinckia sp / Iriani Rodrigues Maldonade.-- Campinas, SP: [s.n.],
1996.

Orientador: Adilma Regina Pippa Scamparini
Dissertação de (mestrado)-Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Beijerinckia* sp. 2. Fermentação. 3. Polissacarídeos. *Biomassa
celular. I. Scamparini, Adilma Regina Pippa. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III. Título.



Professora Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini



Professor Dr. José Luis Pereira



Professora Dra. Gláucia Pastore

Professora Dra. Claire Vendruscolo

Dedico este trabalho,

aos meus amores,

Júlia e Paulo

AGRADECIMENTOS

Às minhas duas famílias que, com amor e compreensão, ajudaram-me a desenvolver este trabalho; sobretudo Irene e Odete que muitas vezes me substituíram como mãe.

À minha orientadora Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini pela sua orientação, amizade e compreensão.

Ao Paulo pela paciência e compreensão.

À Luciana pela colaboração e incentivo.

À Helena pelo incentivo e empenho em resolver problemas operacionais.

À Ivani pelo incentivo e amizade.

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

Ao CNPq - Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, pelo apoio financeiro.

O meu agradecimento muito especial aos amigos e colegas que diretamente trabalharam comigo: Adriana, Ana Maria, Ana Paula, Alessandro, Cláudio, Daniela, Gisele, Jardete, Karla, Luciene, Lúcio, Luis, Maria Silvia, Marcelo, Masaharu, Priscila e Ronaldo.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este projeto se tornasse realidade.

ÍNDICE

	Página
Agradecimentos.....	i
Índice.....	ii
Índice de Tabelas.....	iv
Índice de Figuras.....	vi
Nomenclatura.....	x
Resumo.....	xi
Summary.....	xii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Materiais.....	13
3.1.1 Equipamentos.....	13
3.1.2 Material de consumo.....	14
3.1.3 Microrganismo.....	14
3.1.4 Composição do meio de manutenção.....	14
3.1.5 Composição do meio de produção de células.....	15
3.1.6 Composição do meio alternativo.....	15
3.2 Métodos.....	16
3.2.1 Métodos de fermentação.....	16
3.2.1.1 Preparação da cultura estoque.....	16
3.2.1.2 Preparação do pré-inóculo.....	16
3.2.1.3 Estudo das condições de fermentação.....	17
3.2.1.3.1 Estudo da concentração de glicose e sacarose.....	17
3.2.1.3.2 Influência da temperatura.....	17
3.2.1.3.3 Influência da concentração de sais.....	17
3.2.1.3.4 Influência da concentração do extrato de levedura.....	19
3.2.1.3.5 Influência da concentração do extrato de malte.....	20
3.2.1.3.6 Influência da concentração de peptona.....	20
3.2.1.3.7 Influência da concentração da pasta de levedura.....	20
3.2.1.3.8 Influência da concentração de melão.....	21
3.2.1.3.9 Influência da aeração.....	21
3.2.1.3.10 Influência do pH.....	21

3.2.1.4	Determinação dos parâmetros cinéticos.....	22
3.2.1.4.1	Fermentação padrão.....	22
3.2.1.4.2	Fermentação com meio alternativo.....	22
3.2.1.4.3	Fermentação de batelada alimentada.....	23
3.2.2	Métodos analíticos.....	25
3.2.2.1	Determinação do crescimento celular.....	25
3.2.2.2	Determinação de biopolímero.....	26
3.2.2.3	Determinação de açúcares redutores totais.....	26
3.2.3.1	Velocidade de consumo de substrato.....	27
3.2.3.2	Taxa específica de crescimento.....	27
3.2.3.3	Massa celular no tempo t.....	28
3.2.3.4	Coefficiente de rendimento.....	28
3.2.3.5	Determinação do volume adicionado da alimentação ...	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1	Estudo da influência das condições de fermentação.....	29
4.1.1	Influência da concentração de glicose e sacarose.....	29
4.1.2	Influência da temperatura.....	30
4.1.3	Influência da concentração de sais.....	32
4.1.4	Influência do extrato de malte e levedura, peptona.....	37
4.1.5	Influência da concentração da pasta de levedura.....	37
4.1.6	Influência da concentração de melaço	39
4.1.7	Influência da aeração.....	41
4.1.8	Determinação do pH.....	42
4.2	Determinação dos parâmetros cinéticos de fermentação.....	42
4.2.1	Fermentação sem controle de pH.....	42
4.2.2	Fermentação padrão.....	43
4.2.3	Fermentação com meio alternativo.....	44
4.2.4	Fermentação em processo de batelada alimentada.....	45
5.	CONCLUSÕES.....	49
6.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	51

ÍNDICE DE TABELAS

	página
TABELA 01: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de K_2HPO_4 na fermentação de <i>Beijerinckia</i> 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.....	62
TABELA 02: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ na fermentação de <i>Beijerinckia</i> 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.....	63
TABELA 03: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de NH_4Cl na fermentação de <i>Beijerinckia</i> 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.....	64
TABELA 04: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de NH_4NO_3 na fermentação de <i>Beijerinckia</i> 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.....	65
TABELA 05: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ na fermentação de <i>Beijerinckia</i> 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.....	66
TABELA 06: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de pasta de levedura por <i>Beijerinckia</i> 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.....	67
TABELA 07: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de melaço por <i>Beijerinckia</i> 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão sem sacarose a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.....	68

TABELA 08: Valores dos parâmetros cinéticos, que foram determinados nas fermentações em fermentador SF 116, contendo meio padrão (com e sem controle de pH em 6,5) e meio alternativo, incubados a 25°C, 400 rpm por 24 horas.....69

TABELA 09: Valores dos parâmetros cinéticos determinados à partir das fermentações em fermentador SF 116, através de processo de batelada com adição exponencial de sacarose, contendo meio padrão a 25°C, pH 6,5, 400 rpm por 20 horas.....70

TABELA 10: Valores dos parâmetros cinéticos determinados à partir das fermentações em fermentador SF 116, através de processo de batelada com adição linear de sacarose, contendo meio padrão a 25°C, pH 6,5, 400 rpm por 20 horas.....71

ÍNDICE DAS FIGURAS

	página
FIGURA 01: Estudo do efeito da concentração de glicose em meio padrão no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero. Condições de fermentação: 30°C, 200 rpm por 20 horas.....	72
FIGURA 02: Estudo do efeito da concentração de sacarose em meio padrão no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero. Condições de fermentação: 30°C, 200 rpm por 20 horas.....	73
FIGURA 03: Estudo do efeito da temperatura no crescimento celular de <i>Beijerinckia</i> 7070, na variação de pH, no consumo de açúcares e na produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: pH inicial 6,7 a 450 rpm.....	74
FIGURA 04: Influência da concentração de K_2HPO_4 no crescimento celular, consumo de açúcares, variação de pH e produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	75
FIGURA 05: Influência da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	76
FIGURA 06: Influência da concentração de NH_4Cl no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	77
FIGURA 07: Influência da concentração de NH_4NO_3 no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	78

FIGURA 08: Influência da concentração de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	79
FIGURA 09: Estudo do efeito da concentração de extrato de levedura, extrato de malte e peptona no crescimento celular de <i>Beijerinckia</i> 7070, em fermentador de bancada contendo o meio padrão sem as fontes de nitrogênio. As condições de fermentação foram: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	80
FIGURA 10: Influência da concentração de pasta de levedura com sacarose a 1% (p/v) no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	81
FIGURA 11: Estudo do efeito da concentração de pasta e extrato de levedura no crescimento de <i>Beijerinckia</i> 7070 em fermentador de bancada. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	82
FIGURA 12: Estudo do efeito da concentração de melaço no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão sem sacarose. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	83
FIGURA 13: Estudo do efeito da aeração no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.....	84
FIGURA 14: Efeito da variação do pH no crescimento celular, no consumo de açúcares e na produção de biopolímero, em meio padrão, a 25°C, 400 rpm, em fermentador SF 116, através da adição de NH_4OH 2N.....	85

FIGURA 15: Comparação entre as soluções alcalinas de NaOH 2N e NH ₄ OH 2N, utilizadas para controle do pH durante o crescimento de <i>Beijerinckia</i> 7070, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 20 horas.....	86
FIGURA 16: Cinética de crescimento celular em fermentador SF 116, contendo 4 litros de meio padrão, pH inicial de 6,7, a 25°C, 400 rpm por 24 horas.....	87
FIGURA 17: Cinética da fermentação padrão com pH mantido em 6,5, pela adição de NH ₄ OH 2N, em fermentador SF 116, contendo meio padrão, 400 rpm a 25°C.....	88
FIGURA 18: Fermentação com meio alternativo (pasta de levedura e melaço) com pH a 6,5, incubados a 25°C, 400 rpm por 24 horas.....	89
FIGURA 19: Cinética do crescimento celular em função da concentração de sacarose na solução de alimentação com vazão exponencial, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 20 horas.....	90
FIGURA 20: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 10% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.....	91
FIGURA 21: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 30% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.....	92
FIGURA 22: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 45% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.....	93
FIGURA 23: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 60% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.....	94
FIGURA 24: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 75% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.....	95

FIGURA 25: Comportamento da cultura com adição linear de solução de sacarose a 45% (p/v) em meio padrão, pH a 6,5, 400 rpm por 20 horas..... 96

FIGURA 26: Comportamento da cultura com adição exponencial de melaço a 45% (p/v) de açúcares redutores totais, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 24 horas.....97

FIGURA 27: Comportamento da cultura com adição de exponencial de melaço 45% (p/v) em meio alternativo. Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 24 horas.....98

NOMENCLATURA

AT = Açúcares redutores totais (g/L)

ATc = Teor de açúcar redutor total consumido (g/L)

B = Massa de biopolímero (g/L)

B₀ = Massa de biopolímero seco inicial (g/L)

B_f = Massa de biopolímero seco final (g/L)

MS = Massa celular seca (g/L)

q_s = Velocidade de consumo de substrato (sacarose) (g/Lh)

R = Rendimento em relação a massa celular da fermentação padrão, em fermentador SF 116 (%)

S = Concentração de substrato (g/L)

X = Massa celular no tempo t (g/L)

X₀ = Massa celular seca inicial (g/L)

X_f = Massa celular seca final (g/L)

Y_{X/S} = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

Y_{B/S} = Coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

μ = Taxa específica de crescimento (1/h)

μ_{max} = Taxa específica máxima de crescimento (1/h)

RESUMO

Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar os parâmetros que afetam a produção de células de *Beijerinckia* 7070. Esta bactéria foi isolada e identificada de solo canavieiro da região oeste do estado de São Paulo. Sua principal importância está relacionada com o fato de fixar nitrogênio atmosférico em culturas de cana-de-açúcar.

Neste estudo, realizaram-se ensaios em erlenmeyers sob agitação, variando-se as concentrações de glicose e sacarose no meio de fermentação. Escolheu-se a concentração de 1% de sacarose para produção de células. Em fermentadores de bancada, foram determinadas as condições ótimas de temperatura, concentrações de sais, concentrações de pasta de levedura e melaço de cana-de-açúcar. O maior rendimento de massa celular e biopolímero ocorreu a 25°C. O crescimento celular foi estimulado pela adição de K_2HPO_4 , enquanto que a produção de biopolímero foi favorecida pelo aumento da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e até a concentração de 0,10% de NH_4Cl . A adição de NH_4NO_3 inibiu o crescimento celular e a produção de polissacarídeo. A substituição de sacarose por melaço mostrou ser uma boa alternativa como fonte de carbono, uma vez que favoreceu a produção de células e biopolímero. O aumento da concentração de pasta de levedura ocasionou um aumento na concentração de massa celular.

Em escala semi-piloto, determinou-se que o valor ótimo de pH para crescimento de *Beijerinckia* 7070 foi de 6,5, o qual foi mantido pela adição de uma solução alcalina de hidróxido de sódio ou hidróxido de amônio. Posteriormente, estudou-se o processo de batelada alimentada com vazão de alimentação exponencial e constante. A concentração de sacarose da solução de alimentação com vazão exponencial, variou de 10 a 75% (p/v), sendo que na concentração de 45% obteve-se o melhor rendimento em termos de crescimento celular.

A fermentação com vazão constante de carboidrato, apresentou um bom rendimento em termos de produção de células, mas apresentou também um acúmulo de sacarose no caldo fermentado. O meio alternativo, composto por melaço e pasta de levedura, mostrou ser um meio com menor custo para a fermentação de *Beijerinckia* 7070.

SUMMARY

This study was carried out to characterize the parameters affecting the fermentation of *Beijerinckia* 7070. This bacteria was isolated and identified from soil of sugar cane plantation of North East region of São Paulo State. The greatest importance of this bacteria is to fix atmospheric nitrogen in sugar cane plantation.

In shaker, diferents concentrations of glucose and sucrose were added to the medium, and 1% (w/v) showed to be the best for cells production. In the laboratory fermenter, the optimal conditions of temperature, concentrations of salts, concentrations of Brewers yeast autolyzate and molasses were determined. The higher yield of biomass and polymer were at 25°C. The biomass production was stimulated by addition of K_2HPO_4 and the biopolymer production was stimulated by addition of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and NH_4Cl , but NH_4NO_3 inhibited the growth and biopolymer production. The replacement of sucrose by molasses increased the biopolymer production and high nitrogen concentrations gave highest yield of biomass.

In semi-pilot escale was determined the optimum pH. The optimal growth rate by *Beijerinckia* 7070 was at pH 6,50. Afterwards, the fermentations were carried out as fed-batch process. Sucrose supplementation was added in the solution of NH_4OH , increasing cells yields. The productivity was higher at 45% (w/v) of inicial supplementation sucrose. The fermentation out put obtained with fed-batch process had highest yield of biomass production. Sugar cane molasses and Brewers yeast autolyzate were good alternative to produce cells of *Beijerinckia*, making the fermentation process cheaper.

1 - INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos de origem microbiana, conhecidos como biopolímeros, são capazes de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso mesmo em baixas concentrações. Os biopolímeros apresentam algumas vantagens em relação aos polissacarídeos de origem vegetal e animal, tais como: reprodutibilidade das propriedades físico-químicas além de custo e suprimento estáveis. Devido às estas características, os biopolímeros têm sido objeto de intensa pesquisa, visando o seu alto potencial de aplicação.

Na indústria de alimentos, os polissacarídeos podem ser utilizados essencialmente como agentes emulsificantes, espessantes e gelificantes em doces, conservas, sorvetes, pudins de frutas, molhos, iogurtes, coberturas de bolos, creme para café e outros. O seu uso tem aumentado ano a ano, principalmente, na proporção em que cresce o número de novos produtos desenvolvidos da linha "diet" e "light" (RINAUDO, 1993).

Na agricultura, os biopolímeros são usados como agentes de suspensão para inseticidas e, somente em 1993 foram feitas referências ao seu uso na recuperação do solo do deserto do Saara, como agente retentor de água (PAINTER, 1993). Outros estudos foram também realizados por SARIG (1993), referente a relação entre polissacarídeos, produzidos por microrganismos fixadores de nitrogênio, e estrutura física do solo do deserto do Negev. Este autor verificou que o biopolímero presente no solo forma complexo com metais, servindo como agente de ligação entre as partículas inorgânicas do solo, o que causa uma agregação estável do solo.

Selecionar variedades de microrganismos que produzam polissacarídeos em quantidades e com propriedades interessantes é um desafio que vem sendo enfrentado por vários pesquisadores em todo o mundo. Com a finalidade de selecionar bactérias produtoras de novos exopolissacarídeos, VENDRUSCOLO (1995) identificou uma linhagem de *Beijerinckia* sp, denominando-a de 7070. Esta bactéria, além de ser produtora de exopolissacarídeo é, também, fixadora de nitrogênio.

As bactérias do gênero *Beijerinckia* são encontradas em solos cultivados por cana-de-açúcar, sugerindo que esta cultura pode ser beneficiada significativamente do nitrogênio proporcionado pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico no solo (DÖBEREINER, 1958).

Sabe-se que a cana-de-açúcar é uma das mais importantes culturas que influi na economia do nosso país, e nos últimos anos, por incentivo do Proálcool, tem-se expandido significativamente em direção às áreas de campo-cerrado, onde geralmente a fertilidade dos solos é baixa (CARVALHO, 1983). Essa cultura em conjunto com o café e a soja consomem mais de 50% dos adubos utilizados no Brasil, sendo que nos últimos anos a participação da cana-de-açúcar tem sido cada vez maior (MALAVOLTA, 1981).

A presença de bactérias fixadoras de nitrogênio no solo canavieiro já foi estudada no Brasil sem que se correlacionasse à produção de biopolímeros por estas bactérias (DÖBEREINER, 1955). A presença das bactérias *Beijerinckia* em solos de cana-de-açúcar poderia explicar, em parte, as boas produções até por mais de trinta anos no Brasil, sem uso de adubação (URQUIAGA, 1987).

As bactérias do gênero *Beijerinckia* produzem uma goma hidrossolúvel que circunda os talos de cana-de-açúcar e, podem intervir na capacidade de agregação do solo. Provavelmente, o polímero serve como ponte física entre o microrganismo fixador de nitrogênio e a raiz da planta, assim como para conservar as células das bactérias com um teor de umidade adequado, evitando injúrias metabólicas ou mesmo a morte (BORZANI, 1986).

O polímero produzido pela *Beijerinckia* 7070, possui características pseudoplásticas e apresenta viscosidade muito maior do que a da goma xantana (VENDRUSCOLO e SCAMPARINI 1993; GLICSMAN 1982), porém é degradado quando o pH é superior a 12 ou inferior a 3. Essa propriedade permite a esta goma, o seu uso no fraturamento hidráulico do petróleo, pois após o seu uso na fratura da rocha o polímero deve ser recuperado através de bombeamento da goma liquefeita.

Entretanto, estudos recentes relativos a *Beijerinckia* sp, concentram-se no uso desta bactéria em tratamentos de resíduos, para oxidação de compostos aromáticos (RESNICK e GIBSON, 1993; MURAI, 1990; MAHFFEY et alii, 1988; STUCKI e ALEXANDER, 1987) e de compostos orgânicos sulfurosos (BLINKOVSKY e DORDICK, 1994; LABORDE et alii, 1977).

Estudos realizados por SCAMPARINI et alii (1994), demonstraram que a aspersão de uma solução contendo *Beijerinckia* 7070 em mudas de bananas, acarretou numa melhora da qualidade das mudas em termos de massa seca.

No Brasil encontram-se diferentes linhagens de bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Alcaligenes* que produzem biopolímeros além de PHB (polihidroxibutirato) como substâncias de reservas, sendo que o PHB pode ser utilizado na produção de plástico biodegradável. Hoje estão sendo produzidos comercialmente, no Reino Unido, os bioplásticos por bactérias do gênero *Azotobacter*. Estes plásticos são filmes biodegradáveis que podem substituir os filmes de PVC. A demanda para o uso de plásticos degradáveis é estimada, até o ano 2000, em um milhão e meio de toneladas por ano (PAGE, 1993).

O presente trabalho teve como objetivo principal o estudo da influência dos parâmetros cinéticos (concentração de nutrientes, pH, temperatura, aeração) além do estudo da influência da vazão de adição de sacarose e melaço na produção de células de *Beijerinckia* 7070.

O interesse pelo estudo de bactérias do gênero *Beijerinckia* se deve ao fato de estas bactérias serem produtoras de biopolímero com características físico-químicas adequadas à aplicação industrial de polihidroxibutirato, que é utilizado na produção de plásticos biodegradáveis, além de serem fixadoras de nitrogênio em culturas de cana-de-açúcar.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A bactéria *Azotobacter indicum* foi descrita como sendo uma nova espécie bacteriana por STARKEY e DE em 1939, a qual foi isolada em amostras de solos asiáticos que tinham pH baixos. A tolerância deste microrganismo a solos ácido da Malásia já havia sido observada por ALTSON em 1936, que constatou que esta nova espécie de *Azotobacter* não era facilmente recuperada do solo pelos meios clássicos usados na época. Além do mais, notou a inibição do crescimento desta bactéria em presença de carbonato de cálcio. Devido às estas características, ALTSON conseguiu cultivar a nova espécie em placas de sílica-gel. Este meio foi desenvolvido por WINOGRADSKY em 1932, o qual peneirou as amostras de solo em malhas finas sobre as placas de sílica-gel, sendo incubadas a 30°C por 10 dias.

Em 1950, DERX durante o isolamento de microrganismos em solos da Indonésia, encontrou a bactéria *Azotobacter indicum*, a qual através de características morfológicas e fisiológicas, foi classificada como pertencente ao gênero *Beijerinckia*. As espécies identificadas foram classificadas como *Beijerinckia indica* (DERX, 1950) e *Beijerinckia mobilis* (DERX, 1950a).

Segundo DERX (1953), a ocorrência de *Beijerinckia* em solos tropicais, pode ser atribuído a um fator específico que se encontra somente nestes solos, como certos tipos de plantas ou ao equilíbrio microbiano típicos de tais solos.

Em 1956, TCHAN isolou e identificou uma nova espécie de *Beijerinckia* e a classificou como *Beijerinckia derxii*. Esta nova espécie produzia um pigmento verde-amarelado, além de grande quantidade de polihidroxibutirato.

NEWTON e SAID em 1957, estudaram a correlação entre a ocorrência de *Beijerinckia* sp e o pH do solo. Eles observaram que a adição de molibdênio em solos da Indonésia, ocasionou um maior rendimento na fixação biológica de nitrogênio. Verificaram, também, que bactérias do gênero *Beijerinckia* são encontradas

preferencialmente em solos tropicais, sendo que nenhum solo com pH menor que 4,0 e maior que 7,4 continha estas bactérias.

DÖBEREINER e RUSCHELL (1958) identificaram, durante o isolamento de microrganismos fixadores de nitrogênio presentes nos solos da baixada fluminense, uma nova espécie de bactéria *Beijerinckia*, classificando-a como *Beijerinckia fluminensis*.

DÖBEREINER e LEMOS (1958) estudaram várias fontes de carbono para o crescimento de bactérias do gênero *Beijerinckia*, e verificaram que a sacarose foi a que acarretou numa melhor taxa de crescimento deste gênero de bactéria.

DÖBEREINER (1959) encontrou bactérias do gênero *Beijerinckia* em solos de vários estados brasileiros: Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Pará, constatando que existe uma correlação entre o crescimento destas bactérias e plantações de cana-de-açúcar, uma vez que todas amostras colhidas de solo canavieiro continha bactérias do gênero *Beijerinckia*. No mesmo ano também foi observado (DÖBEREINER, 1959a), através de outros estudos, que a maior contribuição de fixação de nitrogênio por microrganismo, ocorre na superfície radicular e na rizosfera da cana-de-açúcar. A cultura de cana é considerada altamente extrativa em nutrientes do solo, sendo que 100 toneladas de colmo de cana/hectare extrai em média de 120 a 180 Kg de nitrogênio do solo/hectare de solo.

Durante estudos sobre a ocorrência de *Beijerinckia* nos solos brasileiros em 1961, DÖBEREINER constatou que 95% dos solos da área açucareira continha *Beijerinckia* sp, enquanto que, em apenas 8% desta área açucareira, foi encontrado *Azotobacter* sp. Desde o descobrimento de *Beijerinckia* sp de forma preferencial na área de influência do sistema radicular da cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1961), diversos autores têm sugerido que esta cultura pode ser beneficiada significativamente do nitrogênio proporcionado pela fixação biológica, o que poderia explicar em parte, a baixa resposta da cana à adubação nitrogenada no Brasil e, em muitos casos, pode ter contribuído para garantir boas produções até por mais de trinta anos, sem uso de adubação (ALVAREZ et alii, 1957).

BECKING (1961) concluiu que embora as bactérias do gênero *Beijerinckia* sejam preferencialmente encontradas em solos tropicais, a temperatura não é um fator limitante para sua distribuição, tendo um bom crescimento entre 16-30°C, e não crescendo acima de 37°C. A *Beijerinckia* sp encontrada em regiões tropicais cresce entre 15 e 35°C, e a *B. fluminensis* tem o seu melhor crescimento entre 26 a 33°C. Essas bactérias são termosensíveis: não resistem a temperaturas superiores a 50°C e apresentam boa resistência ao frio, sobrevivendo a -4°C por 3 a 4 meses sem que suas células percam a viabilidade.

As bactérias do gênero *Beijerinckia* são organismos estritamente aeróbios, porém crescem e fixam nitrogênio em meios com baixo teor de oxigênio, razão pela qual se desenvolvem em solos encharcados. As bactérias do gênero *Beijerinckia* são Gram negativas, podendo ser uni ou bicelulares, constituídas de até 35% (p/p) de glóbulos de poli-β-hidroxibutirato (PHB) envoltos por uma membrana, indicando que estes poderiam ser excretados através da membrana citoplasmática (BECKING, 1961; BORZANI et alii, 1986).

BECKING (1961a) verificou que as bactérias do gênero *Beijerinckia* necessitam de ferro para crescer e fixar nitrogênio, e que resistem a altas concentrações de ferro (0,2 %p/v) no meio de crescimento. Foi verificado que a máxima fixação de nitrogênio ocorreu entre 0,002 a 0,004 % de ferro (p/v) e, com o aumento de fosfato inorgânico houve um aumento da taxa de nitrogênio fixado, enquanto que nas mesmas condições as bactérias do gênero *Azotobacter* não tiveram nenhum crescimento. A máxima fixação de nitrogênio se deu na concentração de 0,11% de fosfato (p/v) a pH 4,5.

JONES et alii (1963) realizaram fermentação para produção do polissacarídeo de *Azotobacter indicum*. O ensaio foi realizado em um frasco de erlenmeyer de 1 litro contendo 300 mL de meio, constituído de (% p/v): glicose, 5,0; peptona, 0,1; K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄·7H₂O, 0,02; NaCl, 0,02; CaSO₄, 0,01; traços FeCl₃·6H₂O e CaCO₃, 2,0. A temperatura de fermentação foi de 25°C. O polissacarídeo foi obtido através de precipitação com acetona, após 38 dias de fermentação. O rendimento do polissacarídeo

em relação a fonte de carbono foi de 2% após 6 dias e de 18% após 38 dias de fermentação.

PARIKH e JONES (1963) realizaram ensaios em shaker, a fim de caracterizar o polímero sintetizado por *Beijerinckia indica*. O meio utilizado foi o mesmo de JONES et alii (1963), em que a fermentação foi realizada a $23 \pm 3^\circ\text{C}$. O pH inicial do meio não foi ajustado. Os autores concluíram que o polissacarídeo era formado por duas frações, sendo o polímero ácido a maior fração. Com base nos resultados, os autores propuseram que o polissacarídeo ácido tinha uma estrutura linear, composta por unidades repetidas de ácido D-glucurônico, D-glicose e D-glicero-manoheptose.

ANDERSON (1966) durante o isolamento de microrganismo de solos ácido do Canadá, identificou colônias de *Beijerinckia* sp que tinham capacidade de fixar nitrogênio atmosférico a valores baixos de pH. Entretanto, o pigmento produzido por esta bactéria tinha uma coloração laranja, diferente dos pigmentos produzidos pelas outras bactérias desse mesmo gênero.

LÓPEZ e BECKING (1968) produziram um biopolímero sintetizado de *Beijerinckia* sp, através de fermentação em meio contendo (% p/v): glicose, 2,0; K_2HPO_4 , 0,08; KH_2PO_4 , 0,02; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0025 e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,0005. O pH foi ajustado para 7,2 e o rendimento do polímero foi de 5,4 g/L após 5 dias de fermentação.

DALTON e POSTGATE (1969) verificaram que o aumento da taxa de respiração das bactérias do gênero *Azotobacter* inibe a atividade da nitrogenase, impedindo a fixação de nitrogênio atmosférico. Testes de redução de acetileno, mostraram que a redução ocorre parcialmente, ou totalmente sob condições de anaerobiose. Este fato explica porque os microrganismos aeróbicos, que fixam nitrogênio, só o fazem na ausência total ou parcial de oxigênio.

HAUG e LARSEN (1970) determinaram que o polissacarídeo extracelular produzido por *Beijerinckia indica* era formado de glicose, ramnose e ácido glucurônico

na proporção molar de 6,6: 1,5 e 1,0, respectivamente. Este polímero foi precipitado com álcool após 6 dias de fermentação em meio. *B. indica* produz um polímero mais resistente e elástico em pH ácido do que em pH alcalino.

Ensaio realizado por BECKING (1974) a 30°C com o seguinte meio (%): glicose, 2; K₂HPO₄, 0,08; KH₂PO₄, 0,02; MgSO₄·7H₂O, 0,05; FeCl₂·H₂O, 0,005; CaCl₂·2H₂O, 0,005; MnSO₄·2H₂O, 0,0005; ZnSO₄·6H₂O, 0,0005; CuSO₄·5H₂O, 0,0004 e Na₂MoO₄·2H₂O, 0,0005, pH 6,9, mostraram que a quantidade de polissacarídeo produzido aumentou até 9 dias de fermentação. Entretanto, após este tempo, a bactéria *Beijerinckia* continuou a crescer utilizando o polissacarídeo como fonte de carbono, pois a glicose já havia sido totalmente consumida, e após 15 dias todo o polissacarídeo foi consumido. Depois do décimo segundo dia de fermentação, o pH que até então decrescia, aumentou para 6,5. Isso foi devido ao fato de as células utilizarem juntamente com o polissacarídeo o ácido acético produzido pela bactéria. Também em 1974 BECKING constatou que o polissacarídeo tem a função de proteger as células de oxigênio, inibindo assim a ação da nitrogenase. O crescimento de *Beijerinckia* em meio livre de nitrogênio é muito lento, podendo a fase lag durar de 5 a 7 dias, quando então as colônias aparecem em meio sólido. Uma maneira de acelerar o crescimento, neste caso, seria a adição de pequenas quantidades de polímero, o qual envolveria as células, protegendo a célula do oxigênio e, conseqüentemente, haveria aumento de atividade da enzima nitrogenase.

SPIFF e ODU, em 1973, estudando a ação da nitrogenase de *Beijerinckia*, observaram que a nitrogenase tem alta atividade sob condições de anaerobiose. Estes autores concluíram que a ação da nitrogenase, nestas condições, poderia ocorrer, também, no meio de fermentação.

COOKE e PERCIVAL (1975) realizaram diversas fermentações com *Beijerinckia indica* em erlenmeyers sob agitação, variando as concentrações de glicose de 38 a 58% e proteína de 10 a 20%. O pré-inóculo foi feito em meio contendo citrato de amônio, o qual foi incubado a 26°C por 3 dias. Transferiu-se 20 mL deste inóculo para um meio contendo nitrato de potássio, o qual foi incubado a 26°C por 4 dias a 200

rpm. O biopolímero foi obtido, após centrifugação do meio, por precipitação com álcool. O rendimento médio do polissacarídeo foi de 30% em relação a fonte de carbono, e a quantidade de massa celular produzida foi de 15 g/L. Este polímero foi identificado como sendo formado por 85% de uma fração ácida e 15% de uma fração neutra.

McNEELY e KANG (1977) descreveram um meio típico para produção de *Azotobacter indicum* composto por (% p/v): K_2HPO_4 , 0,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01; NH_4NO_3 , 0,09; promosoy, 0,05 e glicose, 3,0. Estes autores observaram que se o pH fosse controlado com uma solução alcalina, a concentração de fosfato poderia ser reduzida a 0,01 % (p/v). A concentração mínima de oxigênio dissolvido no meio deveria ser da ordem de 0,25 V/V/M.

Segundo o Manual BERGEY'S (1984), as bactérias do gênero *Beijerinckia* assimilam muito pouco ou não assimilam nitrato, assim como as bactérias *Azomonas agilis*, enquanto que as bactérias *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter chroococcum* assimilam nitrato. A *B. mobilis* apresenta um bom crescimento celular na presença de sais de amônio e nitrato (ao contrário da *B. indica*), porém tem seu crescimento reduzido em meio contendo uréia, glicina e tirosina. A *Beijerinckia indica* apresenta um pequeno crescimento na presença do extrato de malte e não cresce em meio sólido com peptona. As bactérias do gênero *Beijerinckia* produzem polissacarídeos extracelular com diferentes composições, dependendo da espécie. No caso de *B. mobilis* e *B. fluminensis* o biopolímero é mais consistente. A *B. mobilis* é considerada uma variante de *B. indica* ou *Azotobacter indicum*. Ela é encontrada nos solos de regiões tropicais, produzindo quantidades menores de polissacarídeo do que a *B. indica*, de maneira que durante a fermentação há tendência de formar película no meio. A *Beijerinckia mobilis* tem o seu melhor crescimento entre pH 4-5, *B. indica* entre pH 4-10 e a *B. dextrii* entre pH 6-7. As bactérias do gênero *Beijerinckia*, ao contrário das do gênero *Azotobacter*, podem crescer em meio ácido, tendo a máxima fixação de nitrogênio ocorre em pH 4,5.

NAUMOV et alii (1985) estudaram o efeito de diferentes concentrações de peptona na produção de biopolímero por *Beijerinckia* sp. A bactéria foi cultivada a 28°C

em meio contendo glicose, peptona e sais minerais. A concentração de peptona variou de 0,01 à 0,15 % (p/v), sendo que só houve um aumento na biomassa celular para concentrações de peptona acima de 0,12% (p/v). De acordo com este estudo, a concentração ótima de fosfato para a produção de massa celular de *Beijerinckia* foi de 0,53% (p/v).

Culturas puras de *Beijerinckia* mostraram ter baixa atividade da enzima nitrogenase, sob condições de aeração; porém, quando o teor de oxigênio dissolvido no meio de fermentação foi reduzido a 10%, houve um aumento na atividade enzimática da nitrogenase (MURTY, 1985).

Segundo BORZANI (1986) as bactérias do gênero *Beijerinckia* estão intimamente relacionadas às do gênero *Azotobacter*. Os dados que dizem respeito à quantidade de nitrogênio fixado por esses microrganismos são bastante variáveis, podendo-se estimar uma média de 5 a 10 kg de nitrogênio fixado por hectare/ano. Entretanto, quando se fornece uma boa fonte de carbono e as condições são adequadas às bactérias, o rendimento de fixação de nitrogênio pode ser maior. As bactérias do gênero *Beijerinckia* consomem uma série de compostos orgânicos, principalmente, açúcares, porém não se utilizam de ácidos orgânicos. Não se conhece bem o efeito de compostos nitrogenados, mas sabe-se que a *Beijerinckia indica* não se desenvolve na presença de peptonas. A faixa de pH para o crescimento destas bactérias vai de 4,0 a 7,5. O valor do pH ótimo em meio de cultura é da ordem de 6,2, devendo esse valor ser superior ao do pH do solo. A faixa de pH dos solos de ocorrência destas bactérias é de 5,5 a 5,9. O cálcio não estimula o crescimento nem a fixação de nitrogênio por estas bactérias, podendo até ter um efeito desfavorável. Assim como para os outros microrganismos fixadores de nitrogênio, o molibdênio em doses diminutas é essencial para as bactérias do gênero *Beijerinckia*.

BARBOSA et alii (1986) isolaram e identificaram a bactéria *Beijerinckia dextrii* de solo coberto por vegetação de cerrado. O estudo de algumas das características fisiológicas deste microrganismo mostrou que a bactéria não apresentou atividade nitrato-nitrito redutase, além disso a incubação desta bactéria em meio isento de carbono

orgânico e de nitrogênio indicou que a nitrogenase permaneceu ativa durante cerca de 100 horas.

A fixação de nitrogênio por *Beijerinckia* sp (JOERGER, 1988) é diminuída na ausência de molibdênio. Segundo este autor, quando *Beijerinckia mobilis* foi cultivada em meio sem molibdênio, fixou de 18 a 53% do nitrogênio fixado na presença de molibdênio.

O crescimento de bactérias do gênero *Beijerinckia* é exponencial quando se utiliza carboidrato como fonte de carbono. Entretanto, quando se utiliza compostos aromáticos como fonte de carbono, o crescimento é aritmético (STUCKY e ALEXANDER, 1987). A capacidade de utilizar compostos orgânicos aromáticos e sulfurosos como fonte de carbono, sob condições de anaerobiose, permitem que estas bactérias sejam usadas em tratamentos de resíduos (MALIK, 1978; LABORDE, 1977).

Existem vários estudos a respeito da utilização da *Beijerinckia* na dessulfurização de petróleo (KLECKA, 1980; MALIK, 1978; LABORDE, 1977) em substituição ao método químico. Estes compostos sulfurosos podem ser removidos por um processo químico como a hidrossulfurização, porém muitos fatores limitam a utilização deste método, pois na queima de componentes sulfurosos, ocorre a formação de dióxido de enxofre, que é um grave poluente.

BALASUBRAMANYA e BHATAWDEKAR (1988) utilizaram a *Beijerinckia mobilis* como biofertilizante e aspergiram em culturas de arroz, promovendo o aumento do teor proteico na cultura inoculada.

HAYWOOD et alii (1989) selecionaram algumas linhagens que tinham capacidade de produzir PHB a partir de várias fontes de carbono, e observaram que a *Beijerinckia* acumulava 20% (p/p) de PHB quando se usava glicose. Verificaram, também, que a quantidade de PHB depende da fonte de carbono utilizada para o crescimento de microrganismo.

AMBEDKAR (1991) obteve uma variante de *B. indica*, através de radiação UV, que produzia penicilina em quantidades superiores a 100% em relação a outros microrganismos e a 168% quando comparado com a linhagem parental. Este mutante apresentou-se mais resistente ao catabólico repressor da glicose. As condições utilizadas para o crescimento deste variante foi (% p/v): extrato de levedura, 0,50; KH_2PO_4 , 0,1; água de maceração de milho, 3,0; glicose, 1,0. Tal experimento foi realizado a 25°C, e o pH foi ajustado para 6-6,5.

BARBOSA e ALTERTHUM (1992) estudaram o efeito da extração do polissacarídeo na viabilidade celular e na atividade da nitrogenase de *Beijerinckia*, quando incubados em meios contendo N_2 ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio. Estes autores concluíram que, após a remoção do polissacarídeo, as células incubadas em meio com N_2 apresentaram uma diminuição da atividade da nitrogenase, além de perderem a viabilidade. Entretanto, quando as células foram incubadas em meio contendo NH_4^+ , a atividade da nitrogenase e a viabilidade das células não foram afetadas.

VENDRUSCOLO (1995) quando produziu células da linhagem 7070 de *Beijerinckia*, utilizou como fonte de carbono a sacarose na concentração de 0,1 a 5,0% (p/v), observando que o melhor resultado foi obtido com 1% de sacarose. A fase logarítmica de crescimento celular variou de 15 a 18 horas. O melhor meio testado para a produção do biopolímero tinha a seguinte composição (% p/v): K_2HPO_4 , 0,2; KH_2PO_4 , 1,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,27; extrato de levedura, 0,02; triptose, 0,2 e sacarose, 0,5. As melhores condições foram: pH inicial de 6,50, 20°C e 200 rpm por 96 horas. Dos meios de fermentação estudados, o que apresentou menor rendimento em termos de produção de goma, foi o que continha NH_4NO_3 .

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - Equipamentos

Incubador - Agitador com Ambiente Controlado da New Brunswick Scientific, modelo G25 e G27

Fermentador Multigen da New Brunswick de 1,6 litros

Fermentador SF 116 da New Brunswick de 16 litros

Espectrofotômetro marca Beckman, modelo DU-70

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

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 Shimadzu

Potenciômetro marca Digimed, modelo DMPH-2

Microscópio óptico binocular Olympus - CBA

Balança Semi- analítica, Micronal modelo B-600

Balança Analítica A & D, modelo FR-200

Bomba peristáltica da marca MLW SP 3

3.1.2 - Material de consumo

Os reagentes utilizados (p.a.) foram das marcas Merck, Ecibra, Vetec e Sigma. Os meios de cultura utilizados foram da marca Difco. O melaço contendo 61% de açúcares redutores totais foi cedido pela empresa CONTROLPAV e a pasta de levedura (82°BRIX) pela empresa PRODESA. O açúcar cristal utilizado foi da marca UNIÃO. É importante ressaltar que tanto o melaço quanto a pasta de levedura pertenciam a um único lote.

3.1.3 - Microrganismo

A cepa da bactéria utilizada neste projeto pertence ao gênero *Beijerinckia* denominada 7070. Esta bactéria foi isolada do solo de plantação de cana-de-açúcar na região de Ribeirão Preto-SP, e identificada por VENDRUSCOLO em 1995.

3.1.4 - Composição do meio de manutenção do microrganismo

O meio de manutenção de células utilizado tinha a seguinte composição:

Extrato de levedura.....	0,3%
Extrato de Malte.....	0,3%
Peptona Bacteriológica.....	0,5%
Sacarose.....	1,0%
Ágar.....	2,0%
Água Destilada.....	q. s. p.

O pH do meio foi ajustado para 6,7, utilizando-se NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Este meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos, em tubos de ensaios.

3.1.5 - Composição do meio de produção de células: Meio padrão

O meio de produção de células utilizado como padrão, foi o YM modificado, tendo a seguinte composição:

Extrato de levedura.....	0,3%
Extrato de Malte.....	0,3%
Peptona Bacteriológica.....	0,5%
Sacarose.....	1,0%
Água Destilada.....	q.s.p.

O pH do meio foi ajustado para 6,7, utilizando-se NaOH 0,1N ou HCl 0,1N. Este meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos.

3.1.6 - Composição do meio alternativo

A composição do meio alternativo foi o seguinte:

Melaço.....	1,6%
Pasta de levedura.....	2,0%
Água destilada.....	q.s.p.

O pH inicial foi ajustado para 6,7. Este meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - MÉTODOS DE FERMENTAÇÃO

3.2.1.1 - Preparação da cultura estoque

A cultura estoque foi preparada de uma colônia selecionada por isolamento em placas feito por VENDRUSCOLO (1995), e inoculada através do uso de alça níquel-cromo em tubos de ensaio, contendo o meio de manutenção com superfície inclinada, os quais foram incubados a 30°C por 24 horas em estufa. A cultura estoque foi mantida sob refrigeração em geladeira e a repicagem foi feita mensalmente.

3.2.1.2 - Preparação do inóculo

O inóculo preparado para as fermentações realizadas em erlenmeyers sob agitação, foi realizado em frascos de erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio padrão. Estes frascos foram esterilizados a 121°C por 15 minutos em autoclave e, posteriormente resfriados e inoculados com alça níquel-cromo da cultura estoque. A incubação foi a 30°C e 250 rpm, por 24 horas em agitadores rotatórios G25 ou G27. Após a incubação 10 mL do meio de cultura foi transferido para os erlenmeyers através de pipetas estéreis, fazendo-se uso do fluxo laminar.

Para preparação do inóculo para os fermentadores SF 116 e MULTIGEN, foram utilizados erlenmeyers de 500 mL e 250 mL com respiro, contendo 200 mL e 50 mL de meio padrão (item 3.1.5), respectivamente. Após a esterilização a 121°C por 15 minutos em autoclave, estes frascos foram inoculados com alça níquel-cromo da cultura estoque, e incubados em agitadores rotatórios G25 ou G27 a 30°C e 250 rpm, por 24 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi transferido para os fermentadores, através de auxílio de bombas peristálticas.

3.2.1.3 - Estudo da influência das condições de fermentação para a produção de células

3.2.1.3.1 - Estudo da influência da concentração de glicose e sacarose

O estudo da influência da concentração de açúcares teve o seguinte procedimento: 10 mL do inóculo foram adicionados através de pipeta estéril em 200 mL do meio padrão, contidos em erlenmeyers de 500 mL, variando-se as concentrações de glicose e sacarose de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 10% (p/v), separadamente. A incubação foi feita a 30°C a 250 rpm por 20 horas em agitadores rotatórios G 27.

3.2.1.3.2 - Estudo da influência da temperatura

O estudo da influência da temperatura foi feito da seguinte maneira: 50 mL de inóculo foram adicionados, através de bomba peristáltica, a 1 litro de meio padrão em fermentador de bancada MULTIGEN da New Brunswick. A temperatura da fermentação foi controlada através do banho de alta refrigeração com circulação de água. As temperaturas estudadas foram: 15, 20, 25, 30 e 35°C a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.3 - Estudo da influência da concentração de sais no meio padrão

3.2.1.3.3.1 - Estudo da influência da concentração de K_2HPO_4

Para o estudo do efeito da concentração de K_2HPO_4 foram adicionados ao fermentador de bancada MULTIGEN contendo meio padrão, soluções de K_2HPO_4 previamente esterilizados em erlenmeyers de 250 mL com respiro da Millipore, em quantidades adequadas para que se obtivesse no final 1 litro de meio, com as

seguintes concentrações: 0,05; 0,10; 0,50; 1,0 e 1,5% (p/v). Para a adição das soluções salinas e do inóculo (50 mL) foi usada uma bomba peristáltica. O pH das soluções salinas foi ajustado para 6,7 com HCl 0,5N ou NaOH 0,5N. As fermentações foram realizadas a 25°C, a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.3.2 - Estudo da influência da concentração de MgSO₄·7H₂O

Para o estudo do efeito da concentração de MgSO₄·7H₂O foram adicionados ao fermentador de bancada MULTIGEN, soluções de MgSO₄·7H₂O previamente esterilizados em erlenmeyers de 250 mL com respiro da Millipore, em quantidades adequadas para que se obtivesse no final 1 litro de meio, com as seguintes concentrações: 0,05; 0,10; 0,50; 1,0 e 1,5% (p/v). Para a adição das soluções salinas e do inóculo (50 mL) foi usada uma bomba peristáltica. O pH das soluções salinas foi ajustado para 6,7 com HCl 0,5N ou NaOH 0,5N. As fermentações foram realizadas a 25°C, a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.3.3 - Estudo da influência da concentração de NH₄Cl

Para o estudo do efeito da concentração de NH₄Cl, foram adicionados ao fermentador de bancada MULTIGEN contendo meio padrão, soluções de NH₄Cl previamente esterilizados em erlenmeyers de 250 mL com respiro da Millipore, em quantidades adequadas para se obter no final 1 litro de meio, com as seguintes concentrações: 0,01; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 1,50 e 2,00% (p/v). A adição das soluções salinas e do inóculo (50 mL) foi feita através de uma bomba peristáltica. O pH das soluções salinas foi ajustado para 6,7 com HCl 0,5N ou NaOH 0,5N. As fermentações foram realizadas a 25°C, a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.3.4 - Estudo da influência da concentração de NH_4NO_3

Para o estudo do efeito da concentração de NH_4NO_3 , foram adicionados ao fermentador de bancada MULTIGEN contendo meio padrão, soluções de NH_4NO_3 previamente esterilizados em erlenmeyers de 250 mL com respiro da Millipore, em quantidades adequadas para se obter no final 1 litro de meio, com as seguintes concentrações: 0,01; 0,05; 0,10; 0,50 e 1,00% (p/v). A adição das soluções salinas e do inóculo (50 mL) foi feita através de uma bomba peristáltica. O pH das soluções salinas foi ajustado para 6,7 com HCl 0,5N ou NaOH 0,5N. As fermentações foram realizadas a 25°C, a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.3.5 - Estudo da influência da concentração de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Para o estudo do efeito da concentração de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, foram adicionados ao fermentador de bancada MULTIGEN contendo meio padrão, soluções de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ previamente esterilizados em erlenmeyers de 250 mL com respiro da Millipore, em quantidades adequadas para se obter no final 1 litro de meio, com as seguintes concentrações: 0,01; 0,05; 0,10 e 0,50% (p/v). A adição das soluções salinas e do inóculo (50 mL) foi feita através de uma bomba peristáltica. O pH das soluções salinas foi ajustado para 6,7 com HCl 0,5N ou NaOH 0,5N. As fermentações foram realizadas a 25°C, a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.4 - Estudo da influência da concentração do extrato de levedura

O estudo da influência da concentração do extrato de levedura teve o seguinte procedimento: 50 mL do inóculo foram adicionados ao fermentador MULTIGEN, através de bomba peristáltica, contendo 1 litro de meio padrão, no qual as fontes de nitrogênio foram substituídas pelas seguintes concentrações de extrato de levedura: 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 e 2,0% (p/v). As fermentações foram realizadas a 25°C, pH inicial 6,7, a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.5 - Estudo da influência da concentração do extrato de malte

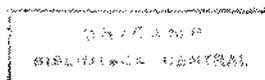
O estudo da influência da concentração do extrato de malte teve o seguinte procedimento: 50 mL do inóculo foram adicionados ao fermentador MULTIGEN, através de bomba peristáltica, contendo 1 litro de meio padrão, no qual as fontes de nitrogênio foram substituídas pelas seguintes concentrações de extrato de malte: 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 e 2,0% (p/v). As fermentações foram realizadas a 25°C, pH inicial 6,7, a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.6 - Estudo da influência da concentração de peptona

O estudo da influência da concentração de peptona teve o seguinte procedimento: 50 mL do inóculo foram adicionados ao fermentador MULTIGEN, através de bomba peristáltica, contendo 1 litro de meio padrão, no qual as fontes de nitrogênio foram substituídas pelas seguintes concentrações de peptona: 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 e 2,0% (p/v). As fermentações foram realizadas a 25°C, pH inicial 6,7, a 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.7 - Estudo da influência da concentração da Pasta de Levedura

O estudo da influência da concentração da pasta de levedura (82°BRIX) teve o seguinte procedimento: 50 mL do inóculo foram adicionados ao fermentador MULTIGEN, através de bomba peristáltica, contendo 1 litro de meio padrão, no qual as fontes de nitrogênio foram substituídas pelas seguintes concentrações de pasta de levedura: 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 e 2,0% (p/v). As fermentações foram realizadas a 25°C, pH inicial 6,7, a 450 rpm por 20 horas.



3.2.1.3.8 - Influência da concentração de melaço

O estudo da influência da concentração de melaço teve o seguinte procedimento: 50 mL do inóculo foram adicionados ao fermentador MULTIGEN, através de bomba peristáltica, contendo 1 litro de meio padrão, no qual a sacarose foi substituída pelas seguintes concentrações de melaço: 1,0; 1,50; 3,0; 4,0; 4,5 e 5,0% (p/v). Este melaço continha 61% de açúcares redutores totais. O pH inicial das soluções de melaço foi ajustado para 6,7. As fermentações foram realizadas a 25°C, 450 rpm por 20 horas.

3.2.1.3.9 - Estudo da influência da aeração

O estudo da influência da concentração do extrato de levedura teve o seguinte procedimento: 50 mL do inóculo foram adicionados ao fermentador MULTIGEN, através de bomba peristáltica, contendo 1 litro de meio padrão, o qual foi aerado a uma taxa de 2 V/V/M. A fermentação foi realizada a 25°C, pH inicial 6,7, a 450 rpm por 20 horas. Para efeito de comparação, realizou-se um ensaio nas mesmas condições descritas acima com taxa de aeração igual a zero.

3.2.1.3.10 - Estudo da influência do pH

O estudo da influência do pH teve o seguinte procedimento: 200 mL de inóculo foram adicionados a 4 litros de meio padrão em fermentador SF 116 da New Brunswick. A fermentação foi feita a 25°C, a 400 rpm por 20 horas. Os valores de pH estudados foram 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5. Em um tipo de ensaio o pH foi mantido constante através da adição da solução de hidróxido de sódio 2N, o qual foi esterilizada por 15 minutos a 121°C em erlenmeyers de 1 litro equipado de respiro com filtro esterilizante da Millipore. Noutro tipo de ensaio, o pH foi mantido constante através da adição da solução de hidróxido de amônio, o qual foi feita da seguinte maneira: 83 mL de hidróxido de amônio foi adicionado a 220 mL de água

previamente esterilizada em erlenmeyers de 1 litro, seguindo o procedimento descrito para a solução de hidróxido de sódio.

3.2.1.4 - Determinação dos parâmetros cinéticos de fermentação

3.2.1.4.1 - Fermentação padrão

A fim de se calcular a taxa de consumo de açúcar para o cálculo da vazão de adição de substrato com fluxo constante, realizou-se um ensaio com o seguinte procedimento: 200 mL de inóculo foram adicionados a 4 litros de meio padrão estéril contidos em fermentador SF 116. As condições de fermentação foram as seguintes: 25°C, a 400 rpm, pH 6,5 por 24 horas. O pH foi mantido constante pela adição de solução de hidróxido de amônio, preparada conforme descrita no item 3.2.1.3.10.

3.2.1.4.2 - Fermentação com meio alternativo

Uma vez estudado a influência das concentrações de pasta de levedura e melão, separadamente (itens 3.2.1.3.7 e 3.2.1.3.8, respectivamente), foi realizada uma fermentação com o seguinte procedimento: 200 mL de inóculo foram adicionados a 4 litros de meio alternativo estéril contidos em fermentador SF 116. As condições de fermentação foram as seguintes: 25°C, a 400 rpm, pH 6,5 por 24 horas. O pH foi mantido constante pela adição de solução de hidróxido de amônio, preparada conforme descrita no item 3.2.3.10. O meio alternativo era composto por melão 1,6 % (p/v) e pasta de levedura, 2,0 % (p/v).

3.2.1.4.3 - Fermentação de batelada alimentada

3.2.1.4.3.1 - Fermentação com adição exponencial de soluções de sacarose

O procedimento deste ensaio foi o seguinte: 200 mL de inóculo foram adicionados a 4 litros de meio padrão contidos em fermentador SF 116. O pH foi mantido constante em 6,5 pela adição de soluções de sacarose com hidróxido de amônio. Estas soluções foram preparadas da seguinte maneira: 83 mL de hidróxido de amônio foram adicionados a 220 mL de soluções de sacarose previamente esterilizadas, de modo que o volume final destas soluções tivessem as seguintes concentrações: 10, 30, 45, 60 e 75% (p/v). Estas soluções de sacarose da solução de alimentação foram esterilizadas em erlenmeyers de 1 litro com respiro, a 121°C por 15 minutos, em autoclave. Então, estas soluções foram acopladas ao fermentador de escala semi-piloto SF 116, para controle de pH através do sistema de controle automático. As condições de operação foram: 25°C a 400 rpm por 24 horas.

3.2.1.4.3.2 - Fermentação com adição da alimentação com fluxo constante

Através dos resultados obtidos no ensaio descrito no item (3.2.1.4.1), foram calculados os parâmetros cinéticos (item 3.2.3) para se obter um fluxo constante de alimentação da solução de sacarose com hidróxido de amônio. O procedimento desta fermentação foi o seguinte: 200 mL de inóculo foram adicionados a 4 litros de meio padrão estéril contidos no fermentador SF 116. O pH foi mantido constante em 6,5 pela adição da solução de alimentação formada por 45% de sacarose (p/v) e hidróxido de amônio, a uma vazão constante de 60 mL/h. Esta solução foi adicionada ao fermentador através de uma bomba peristáltica, previamente calibrada para esta vazão. Os ensaios foram mantidos a 25°C a 400 rpm por 24 horas.

3.2.1.4.3.3 -Fermentação com adição exponencial de melação em meio padrão

Para estudar o efeito da adição de melação na solução de alimentação, foi realizado ensaio da seguinte maneira: 200 mL de inóculo foram adicionados a 4 litros de meio padrão estéril contidos no fermentados SF 116. O pH foi mantido automaticamente constante em 6,5 pela adição de uma solução contendo de melação e hidróxido de amônio. Esta solução de alimentação foi preparada do seguinte modo: 83 mL de solução de hidróxido de amônio foram adicionados a 220 mL de soluções de melação contendo 61% (p/v) de açúcares redutores totais, previamente esterilizadas, de modo que no volume final desta solução tivesse a concentração de 45% (p/v) de açúcares totais. Esta solução de alimentação foi esterilizada em erlenmeyer de 1 litro com respiro, a 121°C por 15 minutos em autoclave. A fermentação foi mantida a 25°C, 400 rpm por 20 horas.

3.2.1.4.3.4 - Fermentação com adição exponencial de melação em meio alternativo

Esta fermentação seguiu como o procedimento descrito no item 3.2.1.4.3.3, no qual o meio padrão foi substituído pelo meio alternativo (item 3.1.6) estéril.

3.2.2 - MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.2.1 - Métodos para determinação do crescimento celular

3.2.2.1.1 - Método direto

As células foram obtidas após o término da fermentação, através de centrifugação de 1 litro do caldo fermentado a 16.000×g a 5°C por 20 minutos. A quantidade de massa celular produzida, foi determinada através da secagem destas células em estufa a 55°C até peso constante.

3.2.2.1.2 - Método indireto

O crescimento dos microrganismos, durante os ensaios da fermentações em escala semi-piloto (fermentador SF 116), foi determinado através da leitura da absorbância a 650 nm em espectrofotômetro Beckman DU-70.

Durante as fermentações, foram retiradas alíquotas de 10 mL do caldo fermentado e centrifugadas a 16.000×g por 20 minutos a 5°C. O sobrenadante foi armazenado a -15°C para posterior análise de açúcares redutores totais, e as células foram ressuspensas três vezes em 10 mL de água destilada estéril e centrifugadas nas condições usadas para a separação destas células. A massa celular obtida da última lavagem foi ressuspensa em 10 mL de água destilada. A medida de absorbância a 650 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 70, foi feita após a diluição de 1:10 desta suspensão celular com água destilada. Para a determinação da massa celular foi construída uma curva padrão da absorbância em função da massa celular.

3.2.2.2 - Determinação da quantidade de biopolímero

Após o término da fermentação, o caldo fermentado foi centrifugado a $16.000\times g$ a $5^{\circ}C$, por 20 minutos, sendo que 10 mL do sobrenadante foi reservado para fazer análise de açúcares redutores totais.

O biopolímero foi precipitado pela adição de etanol 96% ao sobrenadante na proporção respectiva de 3:1. O precipitado foi recuperado através de filtração em peneiras e a secagem foi feita a $55^{\circ}C$ em estufa até peso constante.

3.2.2.3 - Determinação de Açúcares Redutores Totais

A quantidade de açúcares redutores totais foi determinada segundo o método de DNS (MILLER, 1959) após hidrólise ácida da amostra. Para conversão do substrato em açúcares redutores, adicionou-se 2 mL de HCl 2N a 2 mL do sobrenadante do caldo fermentado, sendo que esta mistura foi aquecida à ebulição por 5 minutos. Após o resfriamento da mistura em banho de gelo, adicionou-se 2 mL de solução de NaOH 2N para neutralizar a amostra. Após esta hidrólise, retirou-se 1 mL para fazer o teste de DNS.

O teste de DNS consiste em misturar 1 mL da amostra diluída com 1 mL do reagente de DNS e aquecer esta mistura, em banho maria, a $100^{\circ}C$ por 5 minutos. Resfria-se a mistura imediatamente em banho de gelo e adiciona-se 16 mL de solução de tartarato de sódio e potássio (11,25 g/L). O branco é feito substituindo-se a amostra por 1 mL de água destilada. A leitura da absorbância de cada amostra é feita a 540 nm.

O valor obtido da absorbância foi convertido em açúcares redutores totais, através do uso de uma curva padrão de açúcares redutores totais em função da absorbância, previamente estabelecida.

3.2.3 - CÁLCULOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros cinéticos foram determinados na fase exponencial de crescimento celular de acordo com as fórmulas descritas abaixo, através dos dados obtidos nos gráficos de concentração celular e de substrato em função do tempo.

3.2.3.1 - Velocidade de consumo de substrato (qs):

$$q_s = \frac{1}{X} \left(- \frac{dS}{dt} \right)$$

q_s = velocidade de consumo de substrato (sacarose) (g/g.h)

X = massa celular seca no tempo t (g/L)

S = concentração de substrato (g/L)

3.2.3.2 - Taxa específica de crescimento (μ):

$$\mu = \frac{1}{X} \left(\frac{dX}{dt} \right)$$

X = massa celular no tempo t (g/L)

μ = taxa específica de crescimento (1/h)

3.2.3.3 - Massa celular no tempo t :

$$X = X_0 e^{\mu_{MAX} t}$$

X = massa celular seca no tempo t (g/L)

X_0 = massa celular seca inicial (g/L)

μ_{\max} = taxa específica máxima de crescimento (1/h)

3.2.3.4 - Coeficiente de rendimento:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{ATc} \quad (\%)$$

$$Y_{B/S} = \frac{(B_f - B_0)}{ATc} \quad (\%)$$

X_0 = massa celular seca inicial (g/L)

X_f = massa celular seca final (g/L)

B_f = massa de biopolímero seco final (g/L)

B_0 = massa de biopolímero seco inicial (g/L)

ATc = teor de açúcar redutor total consumido (g/L)

$Y_{X/S}$ = coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao açúcar consumido

$Y_{B/S}$ = coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

3.2.3.5 - Determinação do volume da solução de alimentação adicionada, nas fermentações de batelada alimentada

O volume da solução de alimentação adicionado foi estimado, dividindo-se a massa obtida pela pesagem contínua do frasco contendo a solução de alimentação (descontando-se a massa do frasco), em balança semi-analítica, pela densidade da solução. A densidade da solução foi medida por densímetro a temperatura de 25°C.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Estudo da influência das condições de fermentação para a produção de células

4.1.1 - Estudo da influência da concentração de glicose e sacarose

Considerando que a fonte de carbono desempenha um papel importante no crescimento de microrganismos, e que as principais fontes de carbono para o crescimento celular de *Beijerinckia* sp são glicose, sacarose e frutose (BECKING, 1974), foram testadas concentrações de glicose e sacarose variando-se de 0,5 a 10% (p/v), para o crescimento da linhagem 7070 de *Beijerinckia*. A temperatura utilizada nestes ensaios foi de 30°C, conforme usado em ensaios realizados por HAUG et alii, 1970.

As Figuras 01 e 02 mostram os resultados obtidos no estudo da variação da concentração de glicose e sacarose sobre a produção de massa celular, o consumo de açúcar, a variação de pH final e produção de biopolímero. Através da Figura 01 observou-se que a quantidade de massa celular produzida aumentou de 1,75 g/L para 4,80 g/L, quando aumentou as concentrações de 0,5% para 10,0% de glicose. O pH final diminuiu de 5,00 para 4,50 com o aumento da concentração de glicose, enquanto que a produção de biopolímero teve a sua produção máxima de 1,8 g/L quando a concentração de glicose foi de 3%. A diminuição do pH final do caldo de fermentação provavelmente foi devido à formação de ácidos orgânicos, principalmente o ácido acético, segundo BECKING (1974). Na Figura 02 observou-se, também, que o aumento da concentração de sacarose de 0,5 até 7,0%, resultou em um aumento na produção de células de 2,1 g/L a 3,75 g/L, e acima de 7% de sacarose houve uma estabilização no crescimento celular. O pH diminuiu de 4,95 para 4,40 com o aumento da concentração de sacarose de 0,5 para 10%, sendo que a produção de biopolímero máxima se deu na concentração de 3% de sacarose.

Os resultados demonstram que a sacarose e glicose foram boas fontes de carbono para o crescimento celular da linhagem 7070 de *Beijerinckia*, sendo que a sacarose foi melhor fonte que a glicose até a concentração de 7%. Estes resultados estão de acordo com os estudos de DÖBEREINER (1961), que concluiu que a sacarose é melhor fonte de carbono para o crescimento de *Beijerinckia*. Provavelmente, a sacarose que é exudada pela cana-de-açúcar, é o fator responsável pela presença desta bactéria em solos canavieiros.

Estes resultados mostraram que para a produção de biopolímero a sacarose foi melhor do que a glicose, sendo que o mesmo fato foi observado por CRUZ (1983), que estudando o uso de diferentes concentrações de sacarose e glicose no meio de fermentação para a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris*, constatou que a melhor concentração de sacarose para produção deste biopolímero foi de 4% (p/v). Também, SOUW e DEMAIN (1979) obtiveram rendimentos maiores de massa celular de *Xanthomonas campestris*, quando utilizaram sacarose ao invés de glicose como fonte de carbono, para produção da goma xantana.

Levando-se em conta que o teor de açúcar residual tanto para a glicose quanto para a sacarose aumentou com o aumento da concentração destes açúcares no meio de fermentação; que a quantidade de massa celular produzida foi maior com o uso de sacarose do que glicose, quando usou-se uma concentração de até 7% de açúcar; que no Brasil o custo da sacarose é menor do que o da glicose; que os ensaios realizados por VENDRUSCOLO (1995) mostraram que a melhor concentração de sacarose para a produção de células foi de 1% e que nos próximos ensaios de fermentação seria feita a adição gradual de sacarose, então fixou-se a concentração de 1% de sacarose para a produção de células nos ensaios de fermentação deste trabalho.

4.1.2 - Estudo da influência da temperatura

Uma vez que a temperatura exerce um papel fundamental na produção de células e biopolímero, foi estudado o efeito da temperatura no crescimento de *Beijerinckia*

7070. As temperaturas estudadas foram 15, 20, 25, 30 e 35°C em fermentador de bancada contendo 1 litro de meio padrão como descrito no ítem 3.1.5.

Na Figura 03 estão apresentados os resultados do efeito da temperatura no crescimento celular, na quantidade de açúcar consumido, na produção de biopolímero e no pH final do caldo fermentado. Obsevou-se que a temperatura de crescimento da linhagem 7070 de *Beijerinckia* está em torno de 25°C, além de que esta temperatura foi a melhor para a produção de biopolímero (0,35 g/L), assim como foi nesta temperatura que houve maior consumo de açúcares. O pH final variou 5,0 para 4,7. É interessante notar que nas temperaturas de 15 e 20°C, houve um acúmulo de açúcar residual no meio fermentado, mostrando que a fonte de carbono não foi devidamente aproveitada.

Estudos realizados por VENDRUSCOLO (1995) indicaram que a temperatura influenciou a produção de células e biopolímero da cepa 7070 de *Beijerinckia*, em meio contendo glicose ou sacarose na concentração de 6% (p/v) após 96 horas de fermentação e a pH inicial a 6,5. Neste experimento verificou-se que o maior rendimento de biopolímero obtido foi de 12,0 g/L entre 20 e 25°C, enquanto que a maior produção celular obtida foi de 0,80 g/L entre 25 e 30°C. O rendimento de biopolímeros de 5,4 g/L foi superior ao citado por LÓPEZ e BECKING (1968), utilizando *Beijerinckia indica* Hawai 2.

A temperatura ótima para o crescimento celular está de acordo com a citada na literatura. Segundo BERGEY'S (1984), as bactérias do gênero *Beijerinckia* se desenvolvem bem entre 10 e 35°C, sendo que a temperatura ótima se encontra na faixa de 20 a 30°C. Também a temperatura ótima para a produção de biopolímero está de acordo com a literatura, já que JONES et alii (1963) e AMBEDKAR et alii (1991) usaram a temperatura de 25°C para produção do biopolímero por *Beijerinckia indica*, apesar de SPIFF et alii (1973) utilizarem a temperatura de 30°C para o crescimento desta bactéria.

4.1.3 - Estudo da influência da concentração de sais no meio padrão

4.1.3.1 - Estudo da influência da concentração de K_2HPO_4

A Tabela 01 mostra os resultados do efeito da concentração de K_2HPO_4 de 0,05 a 1,50%, nos parâmetros cinéticos da fermentação de *Beijerinckia 7070*, em fermentador de bancada contendo meio padrão, a 25°C, pH inicial 6,7 a 450 rpm por 20 horas. Com o aumento da concentração de 0,05 para 1,5% de K_2HPO_4 , o coeficiente de rendimento celular em relação a fonte de carbono ($Y_{X/S}$) aumentou de 0,213 para 0,292. Estes resultados indicam claramente que a adição de fosfato inorgânico no meio de fermentação, ocasiona um aumento no crescimento celular. Do mesmo modo, verificou-se que a adição deste sal ocasionou um aumento na produção de biopolímeros, já que o coeficiente de rendimento de biopolímero em relação a fonte de carbono ($Y_{B/S}$) aumentou de 0,069 para 0,148, quando a concentração de K_2HPO_4 aumentou de 0,05 para 1,5%.

A Figura 04 mostra os resultados das curvas de crescimento celular, de produção de biopolímero, de variação de pH e de teor de açúcar residual em função da variação da concentração de K_2HPO_4 a 25°C, pH inicial de 6,7, após 20 horas de fermentação de *Beijerinckia 7070* em fermentador de bancada contendo meio padrão. O pH final aumentou de 4,50 para 5,80 com o aumento da concentração deste sal, o que provavelmente se deve ao seu efeito tamponante. A massa celular aumentou de 1,9 a 2,2 g/L e a produção de biopolímero de 0,6 a 1,2 g/L, com o aumento da concentração de K_2HPO_4 de 0,05 para 1,5% (p/v). Este resultado mostra que apesar do aumento da massa celular e da produção de biopolímero, o alto teor de açúcar residual no meio indica um melhor aproveitamento da fonte de carbono utilizada, com o aumento da concentração de fosfato. A produção de biopolímero aumentou cerca de 50%, quando aumentou-se a concentração de fosfato de 1,00 (0,80 g/L) para 1,50 % (1,20 g/L).

De acordo com o estudo realizado por NAUMOV et alii (1985) a concentração de K_2HPO_4 , para a produção de massa celular de *Beijerinckia* foi de 0,53% (p/v). Os

dados da Figura 04 mostram que a maior taxa de crescimento celular se deu na faixa de concentração de 0,1 a 0,5% (p/v) de K_2HPO_4 .

Estudos realizados por CRUZ (1983) mostraram que produção de goma xantana foi prejudicada por concentrações superiores a 0,43% (p/v) de K_2HPO_4 , por *Xanthomonas campestris*, quando fermentado a 30°C.

4.1.3.2 - Estudo da influência da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

A Tabela 02 apresenta os resultados do efeito do aumento da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ de 0,05 para 1,5% (p/v) nos parâmetros cinéticos da fermentação de *Beijerinckia* 7070 em fermentador de bancada, contendo meio padrão a 25°C, 450 rpm, pH inicial de 6,7 por 20 horas. O aumento da concentração de Mg na forma de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ praticamente não afetou o crescimento, já que o coeficiente de rendimento de massa celular diminuiu insignificativamente de 0,233 para 0,223. Entretanto, o coeficiente de rendimento de biopolímero aumentou de 0,076 para 0,330, indicando que o aumento da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ resulta em uma maior produção de biopolímero.

A Figura 05 mostra que o aumento da concentração do sal $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ de 0,05 para 1,50% (p/v) no meio de fermentação, ocasionou um aumento na quantidade de biopolímero de 0,60 para 3,50 g/L. A produção de massa celular e o pH final não sofreram variação significativa com o aumento da concentração de sulfato de magnésio. Entretanto, o teor de açúcar residual no meio de fermentação teve o seu menor valor de 0,90 g/L na concentração de 0,1% (p/v) de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

Provavelmente este estudo explica o fato de VENDRUSCOLO (1995) ter obtido maior produção de biopolímero da linhagem 7070 de *Beijerinckia* no meio o qual continha $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ em sua composição.

Entretanto, em outros estudos relativos à adição de sais de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ para a produção de biopolímero, ROSEIRO et alii (1993) observaram que a redução da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ de 0,59% para 0,49%, ocasionou uma diminuição na produção de biopolímero de 10,0 g/L para 6,0 g/L e um aumento na produção de massa celular de 0,037 para 0,091 g/Lh, quando realizaram uma fermentação de *Xanthomonas campestris*.

4.1.3.3 - Estudo da influência da concentração de NH_4Cl

Devido ao fato da *Beijerinckia mobilis* apresentar um bom crescimento na utilização de sais de amônio como fonte de nitrogênio, diferentemente da *B. indica* que cresce pouco ou não cresce na presença destes sais (BERGEY'S, 1984), foi testado neste trabalho a influência de sais de amônio no crescimento da bactéria *Beijerinckia* 7070.

Na Tabela 03 estão apresentados os resultados do efeito da concentração de NH_4Cl nos parâmetros cinéticos da fermentação, em fermentador de bancada contendo meio padrão, pH inicial 6,7, a 25°C, 450 rpm por 20 horas. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 03, o aumento da concentração de NH_4Cl de 0,01 até 2,0% não afetou de modo significativo o coeficiente de rendimento de massa celular (Y_{XS}), mostrando que a adição deste sal não afeta o crescimento celular. Com o aumento da concentração de NH_4Cl acima de 0,10%, houve uma diminuição na produção de biopolímero, que pode ser observado através do coeficiente de rendimento de biopolímero (Y_{BS}), que diminuiu de 0,080 para 0,012.

A Figura 06 mostra os resultados do teor residual de açúcar, variação de pH, produção de massa celular e produção de biopolímero em função da concentração NH_4Cl . Observou-se que na concentração de 0,10 % (p/v) de NH_4Cl obteve-se a maior quantidade de biopolímero (0,62 g/L), sendo que acima desta concentração a produção de biopolímero decresceu para 0,18 g/L. A massa celular teve um aumento de 1,92 g/L para 2,05 g/L e teve um valor máximo de 2,25 g/L, quando a concentração de NH_4Cl foi

de 0,01%. O pH final permaneceu praticamente constante entre 4,71 a 4,90, e com o aumento da concentração de NH_4Cl o teor de açúcar residual permaneceu praticamente constante em torno de 1,85 g/L.

4.1.3.4 - Estudo da influência da concentração de NH_4NO_3

A Tabela 04 apresenta os resultados do efeito do aumento da concentração de 0,01 para 1,0 % de NH_4NO_3 nos parâmetros cinéticos da fermentação de *Beijerinckia* 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, 450 rpm, pH inicial de 6,7 por 20 horas. Com o aumento da concentração de NH_4NO_3 , o crescimento celular e a produção de biopolímero diminuíram. O coeficiente de rendimento de massa celular ($Y_{X/S}$) decresceu de 0,253 para 0,202, enquanto que o coeficiente de rendimento de biopolímero ($Y_{B/S}$) decresceu de 0,032 para 0,015, quando a concentração de NH_4NO_3 aumentou de 0,01 e 1,0%. Estes resultados indicam claramente que a adição de NH_4NO_3 inibiu o crescimento e a produção de biopolímero pela bactéria *Beijerinckia* 7070.

Através da Figura 07, observou-se que concentrações acima de 0,01% (p/v) de NH_4NO_3 promoveram um efeito negativo na produção de massa celular e de biopolímero. A massa celular diminuiu de 1,94 para 0,91 g/L, enquanto que a produção de biopolímero diminuiu de 0,25 para 0,07 g/L, quando a concentração de NH_4NO_3 aumentou de 0,01 para 1,0%. O pH final aumentou de 4,90 para 5,57 quando a concentração de NH_4NO_3 aumentou de 0,01 para 0,1%. Em concentrações acima de 0,1%, o pH final permaneceu em torno de 5,5. O açúcar no meio de fermentação acumulou com o aumento da concentração de NH_4NO_3 , mostrando que o substrato não foi utilizado para a produção de massa celular e para a produção de biopolímero. Segundo BERGEY'S (1984), as bactérias do gênero *Beijerinckia* assimilam muito pouco ou não assimilam nitrato, assim como as bactérias *Azomonas agilis* e diferentemente das bactérias *Azotobacter vinelandii* e *Azotobacter chroococcum*. Este fato pode ser explicado pela quantidade de G + C do DNA de *Beijerinckia* e *Azomonas* serem iguais, diferindo da quantidade de G + C de *Azotobacter* (DE LEY e PARK, 1966).

Os resultados obtidos por VENDRUSCOLO (1995) mostraram que dentre os meios de fermentação testados, o que apresentou menor rendimento para a produção de biopolímero, foi o que continha NH_4NO_3 , o qual era constituído por (g/L): glicose, 30; K_2HPO_4 , 5,0; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1; NH_4NO_3 , 0,9 e promoso, 0,5.

Entretanto, CRUZ (1983) estudando o efeito da adição de nitrato de amônio no meio de fermentação para produção de biopolímero por *Xanthomonas campestris* pv *manihotis*, concluiu que o aumento da concentração de nitrato de amônio ocasionou um aumento na massa celular e uma diminuição na produção de biopolímero, sendo que concentrações até 0,96% (p/v) ocasionaram um aumento na massa celular e, concentrações superiores a 0,16% (p/v) diminuíram a produção de goma xantana.

4.1.3.5 - Estudo da influência da concentração de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$

A Tabela 05 mostra os resultados do efeito da concentração de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, o qual variou de 0,001 a 0,50%, nos parâmetros cinéticos da fermentação de *Beijerinckia* 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, pH inicial de 6,7 a 450 rpm por 20 horas. Com o aumento da concentração de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de 0,001 para 0,50%, o coeficiente de rendimento de massa celular (Y_{XS}) aumentou de 0,247 para 0,256. Estes resultados indicam que a adição de íons ferro no meio de fermentação, não afeta significativamente o crescimento celular. Do mesmo modo, verificou-se que o coeficiente de rendimento de biopolímero (Y_{BS}) não teve variação significativa, quando aumentou-se a concentração de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de 0,05 para 0,50%, aumentando de 0,012 para 0,014.

Através da Figura 08 observa-se que a variação da concentração de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ não influenciou o crescimento de *Beijerinckia* 7070. O crescimento celular e o teor de açúcar residual não sofreram variação significativa com o aumento da concentração do íon de ferro. A quantidade de biopolímero produzida foi menor do que nas fermentações realizadas com o meio padrão sem adição de sais. O pH final apresentou uma queda no seu valor de 4,80 para 4,56, quando houve um aumento na concentração de $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

4.1.4 - Estudo da influência da concentração de extrato de levedura, extrato de malte e peptona

A fim de se verificar o grau de influência das fontes de nitrogênio presentes no meio padrão no metabolismo bacteriano, foram realizados ensaios conforme descrito nos itens 3.2.1.3.4, 3.2.1.3.5 e 3.2.1.3.6. Os resultados estão na Figura 09 e mostram que a *Beijerinckia* 7070 utiliza todas as fontes de nitrogênio do meio padrão. Porém, observa-se que a peptona ocasiona um menor crescimento celular, quando comparado com o extrato de levedura e o extrato de malte. A fonte de nitrogênio que promoveu maior crescimento celular nas concentrações estudadas (0,3 a 2,0%), foi o extrato de levedura.

Segundo o manual BERGEY'S (1984), *Beijerinckia indica* apresenta um pequeno crescimento na presença do extrato de malte e não cresce em meio sólido com peptona; enquanto que *B. mobilis* cresce em meio sólido com extrato de malte e não há relatos, na literatura, sobre o seu crescimento em meio contendo peptona.

4.1.5 - Efeito da concentração da pasta de levedura

Como o custo da pasta de levedura é muito inferior ao do extrato de levedura, chegando até ser vinte vezes menor, como no momento atual, foram realizados ensaios com objetivo de estudar a influência das concentrações de 0,3; 0,6; 1,0; 1,5 e 2,0% de pasta de levedura no crescimento celular. A pasta de levedura é obtida pela autólise das leveduras de cervejaria, quando as endoproteases são ativadas pela temperatura de 50 a 60°C. Após autólise, todo material celular é separado por centrifugação e o caldo proteico é concentrado até 82°BRIX, formando a pasta de levedura (DZIMBA, 1993).

Na Tabela 06 estão apresentados os resultados do efeito da concentração de pasta de levedura nos parâmetros cinéticos da fermentação de *Beijerinckia* 7070, em fermentador de bancada contendo meio padrão sem as fontes de nitrogênio, pH inicial

6,7, a 25°C, 450 rpm por 20 horas. De acordo com os resultados, o aumento da concentração de pasta de levedura ocasionou um aumento dos valores dos coeficientes de rendimento de massa celular ($Y_{X/S}$) de 0,121 para 0,208, indicando que o aumento da concentração da pasta de levedura favorece o crescimento de *Beijerinckia* 7070. Quando a concentração de pasta de levedura aumentou acima de 1,0%, houve diminuição na produção de biopolímero, que pode ser observada através dos coeficientes de rendimento em biopolímero ($Y_{B/S}$), que aumentaram de 0,026 para 0,060, quando a concentração de pasta de levedura aumentou de 0,3 para 1,0% e diminuiu de 0,06 para 0,055 quando a concentração de pasta de levedura aumentou de 1,0 para 2,0%.

Através da Figura 10, verificou-se que o aumento da concentração da pasta de levedura de 0,3 para 2,0%, ocasionou um aumento na produção da massa celular de 0,93 para 1,96 g/L, e um aumento do pH de 4,57 para 5,36. Talvez o aumento de pH está relacionado a presença de aminoácidos e peptídios com poder tamponante (AMAYA-FARFAN, 1990). A maior produção de biopolímero (0,57 g/L) foi na concentração de 1% de pasta de levedura. Observou-se que a quantidade de massa celular obtida com a concentração de 2% de pasta de levedura é igual àquela que foi obtida com o meio padrão a 25°C (Figura 03). Verificou-se também que há um aumento na produção de biopolímero, com o aumento da concentração da pasta de levedura até 1,0%, com conseqüente redução do teor de açúcar residual. Levando-se em conta os resultados descritos anteriormente, podemos propor que as fontes de nitrogênio do meio padrão podem ser substituídas pela pasta de levedura, diminuindo consideravelmente o custo relativo da fermentação, já que a pasta de levedura tem custo menor do que o extrato de levedura, extrato de malte e peptona.

A influência da concentração de nitrogênio do meio de fermentação na produção de biopolímero por microrganismos, já foram estudados por outros autores que verificaram que o aumento da concentração de nitrogênio aumenta a produção celular (MORAINE e ROGOVIN, 1973) e a produção de biopolímero (KENNEDY et alii, 1980).

Na Figura 11 pode-se observar a comparação da variação da concentração entre pasta e extrato de levedura na produção celular, quando incubados nas mesmas condições: 25°C, 450 rpm por 20 horas. Pode-se notar que a partir da concentração de 5%, a produção da massa celular foi maior para a pasta de levedura do que para o extrato de levedura. Isto mostra que a pasta de levedura promove melhores resultados no crescimento de *Beijerinckia 7070*, tendo um custo inferior ao do extrato de levedura. Uma explicação para o fato do crescimento de *Beijerinckia 7070* ser maior na presença da pasta de levedura, pode ser que durante o processo de secagem do extrato de levedura, haja uma desnaturação das proteínas de modo irreversível, e assim como a também da reação de Maillard, impedindo a metabolização destas proteínas pelo microrganismo.

4.1.6 - Estudo da influência da concentração de melão

Na Tabela 07 estão apresentados os resultados do efeito das concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% de melão nos parâmetros cinéticos da fermentação de *Beijerinckia 7070* contendo meio padrão sem sacarose com pH inicial 6,7, a 25°C, 450 rpm por 20 horas, conforme descrito no item 3.2.1.3.8. Com o aumento da concentração de melão de 1,0 a 5,0%, o coeficiente de rendimento celular ($Y_{X/S}$) aumentou de 0,175 para 0,766. Estes resultados indicam, que o uso de melão de cana-de-açúcar, é uma boa alternativa como fonte de carbono para as fermentações de *Beijerinckia*. Do mesmo modo, verificou-se que o aumento da concentração de melão de 1,0 para 5,0%, ocasionou um aumento nos valores dos coeficientes de rendimento de biopolímero ($Y_{B/S}$) de 0,049 para 1,102, com conseqüente aumento na produção de biopolímero.

A Figura 12 mostra a influência da concentração do melão nos parâmetros de fermentação de *Beijerinckia 7070*. Pode-se observar que o aumento da concentração de melão de 1,0 para 5,0%, aumentou a produção de biopolímero de 0,45 para 4,33 g/L e massa celular de 1,62 a 3,01 g/L. Comparando-se o uso de melão com o de sacarose nas mesmas concentrações de açúcares redutores totais (Figura 02), observa-se que o uso de melão acarretou uma maior produção de biopolímero. Provavelmente, este

aumento pode ser explicado pela presença de ions de magnésio no melão, que podem influenciar no metabolismo da bactéria, aumentando a produção de biopolímero.

VASCONCELOS (1985) estudando a composição de melão, verificou que os principais macronutrientes identificados foram: CaO, MgO, N e P₂O₅ enquanto que os micronutrientes principais identificados foram o Fe⁺⁺ seguido de Mn⁺⁺, Zn⁺⁺ e Cu⁺. Também, não se pode descartar a hipótese de que outros sais, que não foram estudados neste trabalho, possam ter efeito benéfico na produção de biopolímeros. O pH final teve uma diminuição de 5,35 para 4,89, com o aumento da concentração de melão de 1,0 para 5,0%. Porém, comparando-se com a fermentação que continha meio padrão com diferentes concentrações de sacarose, o pH final deste experimento apresentou valores maiores quando as concentrações de melão e sacarose foram iguais, mostrando ter um efeito tamponante. Segundo OLBRICH (1974), esta ação tamponante do melão depende da sua composição química, sendo que os principais componentes desta ação estabilizadora são os ácidos carboxílicos e os aminoácidos. Este mesmo comportamento, a respeito do pH, foi também verificado por JEREZ (1993), quando estudava o efeito do melão na produção de álcool por *Zymomonas mobilis*.

A composição do melão varia, tornando difícil manter padrão de qualidade desta matéria-prima. Esta variação é devida à vários fatores, tais como: variedade, idade, grau de maturação, condições climáticas dentre outros para cana-de-açúcar. Dependem, também, do processo de extração e clarificação do caldo de cana-de-açúcar e tipo de açúcar produzido. OLBRICH (1974) analisando os componentes do melão de cana-de-açúcar, observou que 72% do melão corresponde a matéria orgânica, 20% a água e 8% a constituintes inorgânicos (K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Na⁺, Fe⁺⁺, P⁺⁺⁺, Al⁺⁺⁺, Cl⁻, CO₃). Dos constituintes orgânicos, cerca de 60% corresponde aos açúcares totais.

4.1.7 - Efeito da aeração

Aeração é um fator importante para fermentação de microrganismos aeróbicos, ocasionando um aumento na produção de massa microbiana. A Figura 13 apresenta os dados obtidos em fermentações realizadas, com e sem aeração, em fermentador de bancada contendo meio padrão a 25°C, 450 rpm por 20 horas. Na fermentação com aeração houve um aumento muito significativo na produção de biopolímero, mostrando que o valor do coeficiente de biopolímero foi de 39% ($Y_{B/S} = 0,39$). Este rendimento foi muito maior do que o rendimento máximo obtido por VENDRUSCOLO em 1995, que foi de 11% ($Y_{B/S} = 0,11$). A aeração teve uma grande influência no aumento da massa celular, o que já era esperado, uma vez que a *Beijerinckia* é um organismo aeróbio. Apesar da maior produção de células e de biopolímero no processo com aeração, o teor de açúcar residual foi duas vezes maior que no processo sem aeração, mostrando que houve melhor aproveitamento da fonte de carbono.

Segundo BECKING (1961), o polissacarídeo tem a função de proteger a célula do oxigênio, auxiliando a atividade da nitrogenase. O crescimento de *Beijerinckia* em meio livre de nitrogênio é muito lento, podendo a fase lag durar de 5 a 7 dias. Uma maneira de acelerar o processo de crescimento celular é adicionar pequenas quantidades de polissacarídeo ao meio, com a função de proteger a célula do oxigênio.

Estudos realizados por MORAINÉ e ROGOVIN (1973) mostraram que o aumento da taxa de aeração na produção de goma por *Xanthomonas campestris*, não influenciou o rendimento da produção de goma xantana. Entretanto, CADMUS et alii, (1976) verificaram que o aumento da aeração de 0,25 para 1,5 V/V/M na fermentação de *Xanthomonas campestris*, promoveu a formação de xantana com alto teor de piruvato, o que acarretou um acréscimo no rendimento na produção de biopolímero em até 10%.

4.1.8 - Determinação do pH ótimo de crescimento celular

Para determinação do pH ótimo de crescimento celular, adicionou-se uma solução de hidróxido de amônio, usando o sistema de controle automático de pH, do fermentador SF 116. A fermentação foi realizada, seguindo o mesmo procedimento descrito no item anterior, quando não se fez o controle de pH.

Através da Figura 14, observou-se que a maior quantidade de massa celular e de biopolímero, foram obtidas no pH de 6,5, sendo que neste pH obteve-se o maior consumo de açúcar. Quando o pH foi controlado com hidróxido de amônio, o rendimento em relação a massa celular foi maior do que quando se adiciona hidróxido de sódio (Figura 15).

Em estudo realizado por VENDRUSCOLO (1995), foi feita referência quanto ao melhor pH inicial na fermentação de *Beijerinckia* 7070. Neste trabalho, os melhores resultados para a produção de goma foram obtidos a pH inicial de 6,5.

De acordo com BECKING (1961), *Beijerinckia* sp cresce na faixa de pH de 4 a 10, sendo que a *B. mobilis* tem seu melhor crescimento entre pH 4-5 e *B. derxii* entre pH 6-7.

Estudos realizados por TSUCHIYA et alii (1952) constataram que fermentações realizadas com pH controlados, apresentaram maior rendimento na produção de goma. O controle de pH em processos fermentativos vem sendo usado mundialmente, alterando-se apenas a solução alcalina adicionada e sua concentração.

4.2 - Determinação dos parâmetros cinéticos de fermentação

4.2.1 - Fermentação sem controle de pH

A Figura 16 mostra as curvas típicas de açúcares residuais, pH e massa celular da linhagem 7070 de *Beijerinckia*, em ensaios realizados em fermentador SF 116 contendo 4 litros de meio padrão, pH inicial de 6,7, a 25°C, 400 rpm por 25 horas. É interessante notar que o pH diminui significativamente nas primeiras 5 horas de fermentação de 6,7 para 5,0, chegando a 4,7 no final do ensaio. Este comportamento indica que esta bactéria produz metabólitos ácidos durante o seu crescimento, sem que estes metabólitos inibam o crescimento da bactéria. Segundo BERGEY'S (1984), *Beijerinckia* sp é acidófila, suportando bem condições com pH baixo. Os teores de açúcares residuais permanecem ao final do experimento, em níveis de 2,0 g/L, sendo que o maior consumo de açúcar acontece nas primeiras 8 horas de fermentação. A máxima quantidade de células de 2,25 g/L foi obtida em torno de 17 horas.

4.2.2 - Fermentação padrão

Foi realizada uma fermentação padrão com pH controlado em 6,5, a fim de se obter dados para calcular a vazão da solução de alimentação, quando adicionada separada da solução alcalina de controle de pH. Os resultados estão representados na Figura 17.

Observa-se na Figura 17 que a fermentação em batelada simples com controle de pH a 6,5 atinge a fase estacionária após 15 horas. A maior parte do substrato é praticamente consumida até 9 horas de fermentação, sendo que a partir deste momento, há uma diminuição da taxa de consumo. A produção de biopolímero ocorre na fase estacionária, portanto a sua produção é muito reduzida na fase logarítmica. A quantidade de massa celular obtida foi de 2,20 g/L após 15 horas de experimento, quando não houve controle de pH (Figura 16), enquanto que no caso do pH controlado este valor foi

atingido em torno de 10 horas (Figura 17). Isto revela que o controle de pH pode reduzir o tempo de fermentação para produção de células.

Os resultados apresentados na Tabela 08, mostram a comparação entre os parâmetros dos ensaios realizados com meio padrão com e sem controle de pH, durante o tempo de fermentação. Estes dados revelam que a taxa de crescimento (μ_{max}) foi de 0,41 na fermentação com controle de pH e de 0,39 na fermentação sem controle e que os coeficientes de rendimento de massa celular foram iguais.

4.2.3 - Fermentação com meio alternativo

Baseando-se nos resultados obtidos com uso de melaço e pasta de levedura, isoladamente, nos ensaios em fermentadores de bancada, realizou-se uma fermentação utilizando 1,6 % (p/v) de melaço e 2,0 % (p/v) de pasta de levedura (meio alternativo). A fermentação foi feita a 25°C, 400 rpm por 24 horas.

A Tabela 08 mostra os resultados da fermentação com meio alternativo com pH controlado em 6,5. A taxa específica de crescimento foi de 0,37, enquanto que na fermentação padrão com pH de 6,5 foi de 0,41. O coeficiente de rendimento de massa celular aumentou no meio alternativo ($Y_{X/S} = 0,48$) em relação a fermentação padrão ($Y_{X/S} = 0,294$). Estes resultados indicam que o meio alternativo pode substituir com vantagens o meio padrão para a produção celular de *Beijerinckia 7070*, diminuindo o custo do processo fermentativo.

A Figura 18 mostra os resultados indicadores de consumo de açúcares redutores totais no meio de fermentação. O açúcar foi consumido rapidamente até as 9 primeiras horas de ensaio, e depois permaneceu praticamente constante. A curva de crescimento celular atingiu o início da fase estacionária após 16 horas de fermentação com concentração de 2,8 g/L.

O uso de pasta de levedura como fonte de nitrogênio já foi estudado por outros autores com o objetivo de diminuir o custo de processos de fermentação. CURRALERO (1993) estudou meios alternativos para a produção de dextrana-sacarase, sendo que a pasta de levedura foi a que apresentou melhores resultados em termos de atividade enzimática.

4.2.4 - Fermentação em processo de batelada alimentada

4.2.4.1 - Adição exponencial da solução de alimentação

Foi adicionada uma solução de alimentação, variando-se a concentração de sacarose de 10, 30, 45, 60 e 75 % (p/v). Esta solução foi adicionada juntamente com hidróxido de amônio para controle de pH. Verificou-se que o consumo desta solução foi exponencial durante o crescimento do microrganismo. Os ensaios foram conduzidos em fermentador SF 116, contendo 4 litros de meio padrão com pH 6,5, a 400 rpm por 24 horas e 25°C. Os dados estão apresentados na Figura 19.

Quanto ao efeito do aumento da concentração de açúcar de 10 para 75% na solução de alimentação, os resultados da Tabela 09 mostram que há uma diminuição na taxa específica de crescimento de 0,428 para 0,405. Apesar da taxa de crescimento diminuir com o aumento da concentração de açúcar da solução de alimentação, o rendimento em relação a massa celular aumentou em até 45% em relação a fermentação padrão.

Através da Figura 19, observou-se que a quantidade de massa celular aumentou com o aumento da concentração de sacarose na solução de alimentação, atingindo a máxima quantidade quando a concentração de sacarose foi de 60%.

As Figuras 20, 21, 22, 23 e 24 mostram o efeito da concentração de sacarose das soluções de alimentação na massa celular, no teor de açúcar residual. Verificou-se que com o aumento da concentração de sacarose na solução de alimentação de 10 para 60%,

ocorreu um aumento na massa celular de 2,80 para 3,60 g/L, assim como resultou num aumento do teor residual de açúcares redutores totais de 10,2 para 14,8 g/L. Comparando-se os resultados da fermentação em batelada alimentada exponencialmente com os da fermentação padrão, nota-se que a produção de massa celular foi superior na fermentação de batelada alimentada. Na fermentação que usou concentração de 60% de sacarose (p/v), a massa celular foi 45% maior do que aquela obtida na fermentação padrão, no mesmo tempo de ensaio. Notou-se que, nestas condições, a produção de biopolímero não foi influenciada pelo aumento da concentração de sacarose no meio, durante a fase de crescimento do microrganismo.

4.2.4.2 - Adição com vazão linear da solução de alimentação

Da Tabela 10, observa-se que o coeficiente de rendimento de massa celular ($Y_{x/s}$) diminuiu, enquanto que a taxa de crescimento máxima (μ_{max}) foi de 0,47 e, portanto, maior que o da fermentação com alimentação exponencial contendo de 45% de sacarose (p/v) a qual foi de 0,41. O rendimento celular foi 68% maior em relação ao rendimento da fermentação padrão. O baixo coeficiente de rendimento de massa celular foi devido ao acúmulo de sacarose no meio durante a fermentação, indicando que não houve um bom aproveitamento da fonte de carbono.

A Figura 25 mostra as curvas de crescimento celular, de açúcar redutor total adicionado e de açúcar redutor total consumido. Pode-se notar que o crescimento celular teve um comportamento similar àquele obtido no processo de batelada alimentada exponencialmente, ou seja, a massa celular aumentou durante a fermentação. Observa-se que com a adição de açúcar da solução de alimentação, houve um acúmulo de açúcar no meio. Este fato indica que a velocidade de consumo foi menor do que a velocidade de adição de açúcar.

Comparando-se as fermentações com alimentação linear e com alimentação exponencial, observou-se que na fermentação com alimentação linear há uma melhor produtividade em relação a massa celular, entretanto a concentração final de substrato

teve valores maiores do que na fermentação com alimentação exponencial, indicando uma perda de substrato e, portanto, um desperdício da fonte de carbono utilizada.

QUEIROZ et alii (1989) estudando a otimização da produção de dextran-sacarase de *Leuconostoc mesentroides*, concluiu que no processo de batelada alimentada com alimentação exponencial, ocorria um acúmulo menor do teor de açúcar no meio, do que com alimentação linear. Contudo, o processo de batelada alimentada mostrou-se superior ao processo de batelada simples com ganho de 30% de produtividade.

4.2.4.3 - Adição exponencial de melaço 45% (p/v) de açúcares totais, em meio padrão

Com a finalidade de verificar o efeito do melaço adicionado no meio de fermentação, realizou-se um ensaio onde a concentração de açúcares redutores totais era de 45% (p/v). Através da Figura 26, é interessante notar que a massa celular atinge o valor de 5,30 g/L após 20 horas de ensaio. O substrato tem o seu maior consumo nas primeiras 7 horas de fermentação, quando a taxa específica de crescimento é maior.

A fermentação que usou adição exponencial de solução de amônio e melaço contendo 45% (p/v) de açúcares redutores totais, produziu maior quantidade de massa celular daquela que usou a adição exponencial de solução de sacarose 45% (p/v), no mesmo tempo de fermentação.

4.2.4.4 - Adição exponencial de melaço 45% (p/v) de açúcares totais, em meio alternativo

A Figura 27 mostra que a substituição do meio padrão pelo meio alternativo, não ocasionou uma perda de produtividade de massa celular. Após 15 horas de fermentação, o crescimento celular atingiu o valor de 5,0 g/L. O açúcar total acumulou-se no meio de fermentação até 9 horas de ensaio, e a partir deste tempo foi sendo consumido.

O processo de batelada alimentada mostrou ser superior ao processo simples de fermentação, embora haja acúmulo de açúcar no meio durante os ensaios. A substituição, no processo de batelada alimentada de sacarose por melaço e do meio padrão pelo alternativo, aumentou o rendimento celular em relação ao açúcar residual, tornando menor o custo do processo.

Na fermentação com adição exponencial de sacarose, a quantidade máxima de massa celular (3,45 g/L) foi atingida após 16 horas de fermentação (Figura 22), enquanto que na fermentação com adição de melaço após 15 horas de fermentação, a quantidade de massa celular foi de 5,0 g/L.

5 - CONCLUSÕES

1 - A temperatura ótima para o crescimento celular da linhagem 7070 de *Beijerinckia* foi 25°C, nos ensaios em fermentadores de bancada MULTIGEN contendo meio padrão.

2 - A adição de K_2HPO_4 nas fermentações em fermentador de bancada MULTIGEN contendo meio padrão a pH inicial de 6,7, 25°C a 450 rpm, aumentou o crescimento celular enquanto que a adição de NH_4NO_3 diminuiu o crescimento celular nas mesmas condições.

3 - A adição de K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ nas fermentações contendo meio padrão, em fermentador de bancada MULTIGEN, a pH inicial 6,7, 25°C a 450 rpm aumentou a produção de biopolímero enquanto que a adição de NH_4Cl (em concentrações acima de 0,10 %) e NH_4NO_3 diminuíram a produção de biopolímeros nas mesmas condições.

4 - A adição de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e NH_4Cl nas fermentações em fermentador de bancada MULTIGEN, contendo o meio padrão a pH inicial de 6,7, 25°C a 450 rpm, não afetou o crescimento celular, enquanto que a adição de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, nas mesmas condições, não afetou o crescimento celular bem como a produção de biopolímero.

5 - O aumento da concentração de pasta de levedura aumentou o crescimento celular, enquanto que a produção máxima de biopolímero ocorreu quando a concentração de pasta de levedura foi de 1% nos ensaios em fermentador de bancada MULTIGEN, contendo o meio padrão sem fontes de nitrogênio a pH inicial 6,7, 25°C a 450 rpm.

6 - O aumento da concentração de melaço aumentou o crescimento celular e a produção de biopolímero nas fermentações em fermentador de bancada MULTIGEN, contendo meio padrão sem sacarose, pH inicial a 6,7, 25°C a 450 rpm. A produção de

células e de biopolímero foi maior em meio contendo melaço do que em meio contendo sacarose, considerando-se a mesma concentração de açúcares redutores totais.

7 - O uso de aeração nas fermentações em fermentadores de bancada MULTIGEN contendo meio padrão a pH inicial 6,7, 25°C a 450 rpm, aumentou de modo significativo o crescimento celular e a produção de biopolímero.

8 - O rendimento de células da linhagem 7070 de *Beijerinckia* foi maior em meio padrão, quando realizada em fermentador SF 116 a 25°C, 400 rpm com adição de solução de hidróxido de amônio para controle de pH. O pH ótimo para o crescimento e produção de biopolímero foi de 6,5.

9 - O controle de pH da fermentação conduzida em fermentador SF 116, contendo 4 litros de meio padrão a 25°C e 400 rpm, reduziu o tempo necessário para a obtenção da quantidade máxima de células da linhagem 7070 de *Beijerinckia*.

10 - O coeficiente de rendimento de massa celular em relação a fonte de carbono, foi maior no ensaio realizado em fermentador SF 116 contendo meio alternativo do que quando se utilizou meio padrão nas mesmas condições.

11 - A produção da biomassa celular de *Beijerinckia* 7070, foi maior na fermentação contendo 4 litros de meio padrão com alimentação linear, do que na fermentação com alimentação exponencial, quando realizada nas mesmas condições. Entretanto, o acúmulo de açúcar no caldo fermentado foi maior quando se usou adição linear de alimentação.

6 - REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AMAYA-FARFAN, J. - **Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos**. Editora da UNICAMP, p. 6 - 10, 1990.
- AMBEDKAR, S. S.; DESHPANDE, B. S.; SUDHAKARAN, V. K.; SHEWALE, J. G. - *Beijerinckia indica* var. *penicillanicum* penicillin V acylase: enhanced enzyme production by catabolite repression-resistant mutant and effect of solvents on enzyme activity. **Journal of Industrial Microbiology**, 7:209 - 214, 1991.
- ALVAREZ, R.; SEGALLA, A. L.; CATANI, R. - Adubação nitrogenada de cana-de-açúcar. **III Fertilizantes nitrogenados Bagantia**, 16:23, 1957.
- ALTSON, R. A. - Studies on *Azotobacter* in Malayan soils. **Journal Agricultural science**, 26:268 - 280, 1936.
- ANDERSON, G. R. - Identification of *Beijerinckia* from Pacific Northwest Soils. **Journal of bacteriology**, 2105 -2106, 1966.
- ARALOVA, G. D.; PANCHEV, I. N.; KRATCHANOV, C. G.; KIRCHEV, A. - Optimization of xanthan biosynthesis using *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 36. **Food Hydrocolloids**, 7(4):299 - 306, 1993.
- BALASUBRAMANYA, R.H.; BHATAWDEKAR, S.P. - Bioenrichment of agricultural wastes with a free living nitrogen fixing bacterium and a mushroom fungus. **Indian Journal Microbiology**, 28(3-4):220-225, 1988.
- BARBOSA, H.R.; ALTERTHUM, F. - The role of extracellular polysaccharide in cell viability and nitrogenase activity of *Beijerinckia dextrii*. **Canadian Journal of Microbiology**, 38(9):986-988, 1992.

- BARBOSA, R.M.; STUCKEL, Y.N.F.; ALMEIDA FILHO, R.C. - Nitrogenase activity of a negative nitrate reductase *Beijerinckia derxii* grow in a organic carbon less medium. **Revista microbiológica**, **17(3)**:264-269, 1986.
- 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, 1961.
- BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology. v.1. R. KRIEG. ed., Baltimore, Williams & Wilkins p. 964, 1984.
- BLINKOVSKY, A.M.; DORDICK, J.S. - Enzymatic conversion of coal in non-aqueous media. **Abstract Paper of American Chemical Society**, 207-211, 1994.
- BORZANI, W. - Cinética de processo fermentativo. In: BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. ed. **Engenharia bioquímica**. São Paulo, Edgard Blucher, p. 165 - 184 (Biotecnologia, V. 3), 1986.
- 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. **Canadian Journal of Microbiology**, **22**:942-948, 1976.
- CARNEGIE, P. R. - Biotechnology and the improvement of food quality. **Food Australia**, **42(1)**:14 -15, 1990.

- CARVALHO, L. C. C. - Adubação e a cana-de-açúcar no Brasil. IN: ORLANDO FILHO, S. Coordenador, **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba, IAA/PLANALSUGAR, p. 13-21, 1983.
- COOKE, A. A.; PERCIVAL, E. - Structural investigation of the extracellular polysaccharides elaborated by *Beijerinckia mobilis*. **Carbohydrate Research** **43**:117-132, 1975.
- CRUZ, C. H. G. - Contribuição ao estudo dos fatores envolvidos na produção de goma xantana por *Xanthomonas manihotis*. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP em Campinas-SP, 1983.
- CURRALERO, I.C. - Estudo da produção de dextrana de baixo peso molecular por via enzimática, para obtenção de ferro-dextrana. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP em Campinas-SP, 1993.
- DALTON, H.; POSTGATE, J. R. - Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. **Journal of genetic microbiology**, **54**:463 - 473, 1969.
- 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*. **Annals Bogorienses** **1**:1-11, 1950a.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. - Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia** **1**(3/4):260-271, 1958.
- DÖBEREINER, 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.

- DÖBEREINER, J.; LEMOS, P. - Ação da sacarose de *Beijerinckia* na fixação de nitrogênio e agregação do solo. **Bol. Inst. Ecol. Exp. Agr.** 20:1-45, 1958.
- DÖBEREINER, J. - Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns Estados do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, 19(2): 151-160, 1959.
- DÖBEREINER, J. - Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, 19:252-258, 1959a.
- DÖBEREINER, J. - Nitrogen fixing bacteria of genus *Beijerinckia* *derx* in the rizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, 14:211-217, 1961.
- DÖBEREINER, J. - Fixação de nitrogênio em gramíneas. **Revista Brasileira Ciência do Solo** 1:1-9, 1976.
- DZIMBA, C. - Obtenção do extrato proteico por autólise de leveduras. Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP em Campinas-SP, 1993.
- GLICKSMAN, M. - Comparative properties of hydrocolloids. In: GLICKSMAN, M. ed., **Food hydrocolloids**. Boca Raton, CRC Press. v(1):3-18, 168-199, 1982.
- HAUG, A.; LARSEN, B. - An extracellular polysaccharide from *Beijerinckia indica*, containing L-guluronic acid residues. **Acta Chemical Scandinava**, 24(5):1855-1856, 1970.
- HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. - A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. **Biotechnology letter**, 11(7):471-476, 1989.

- HINTON, S. M.; DEAN, D. - Biogenesis of molybdenum cofactors. **Critical Reviews in Microbiology**, **17(3)**:169 - 188, 1990.
- JEANES, A. R. In: SANDFORD, P.; LASKIN, A. ed. - **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, American Chemical Society p. 284-298, 1977.
- JEREZ, M. C. D. - Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melão de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* CP4. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, 1993.
- JOERGER, R. D.; BISHOP, P. E. - Bacterial alternative nitrogen fixation systems. **Critical Reviews in Microbiology**, **16**:1 - 12, 1988.
- JONES, J. K. N.; PERRY, M. B.; SOWA, W. - The occurrence of D-glycero-D-manno-heptose in the extracellular polysaccharide produced by *Azotobacter indicum*. **Canadian Journal of Chemistry**, **41**:2712 - 2715, 1963.
- 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 p. 220-230. (A.C.S. Symposium Series, 45), 1977.
- KLECKA, G. M.; GIBSON, D. T. - Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzo-p-dioxins by *Beijerinckia* species. **Applied and Environmental Microbiology**, **39(2)**:288-296, 1980.
- LABORDE, A. L.; GIBSON, D. T. - Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* species. **Applied and environmental microbiology**, **34(6)**:783 - 790, 1977.

- LÓPEZ, R.; BECKING, J. H. - Polysaccharide production by *Beijerinckia* and *Azotobacter*. **Microbiologi Espãna** 21:53-75, 1968.
- MAHAFFEY, W. R.; GIBSON, D. T.; CERNIGLIA, C. E. - Bacterial oxidation of chemical carcinogens formation of polycyclic aromatic acids from benz[α]anthracene. **Applied and Environmental Microbiology**, 54(10):2415 - 2423, 1988.
- MALAVOLTA, E. - Necessidade de alimentos e política de fertilizantes. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 16: 1-26, 1981.
- MALIK, K. A. - Microbial removal of organic sulphur from crude oil and the environment: some new perspectives. **Process Biochemistry**, September, 10-12, 1978.
- MILLER, G. L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3):426 - 428, 1959.
- MOLINA, O.; FITZSIMONS, R; PEROTTI, N. - Effect of corn steep liquor on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology letters**, 15(5):495 - 498, 1993.
- MORAINÉ, R. A.; ROGOVIN, P. - Kinetics of the xanthan fermentation. **Biotechnology and Bioengineering** 15:225-237, 1973.
- MURAL, F.; FUKUDA, M.; YANO, K. - Indigenous Plasmids of *Beijerinckia* Strains. **Agricultural Biology Chemistry**, 54(2):545 - 546, 1990.
- MURTY, M.G. - Stimulation of nitrogenase activity in *Beijerinckia* by a fungal polysaccharide. **Microbios**, 42(171):235-242, 1985.

- MURTY, M.G. - Immobilization of *Beijerinckia*; a N-fixing bacterium on silica gel. **Curr. Science**, **52(21)**:1031-1033, 1983.
- NAUMOV, G.N.; MULTYKH, I.G. - Optimal nitrogen and phosphorus concentrations in the growth medium for exopolysaccharide biosynthesis by *Beijerinckia indica*. **Mikrobiologiya**, **54(5)**:856-857, 1985.
- NEWTON, J. D.; SAID, A. - Molybdenum deficiency in latosols of Java. **Nature**, **180**:1485 - 1486, 1957.
- OLBRICH, H. - Melazas IN : HONIG, P. ed. **Princípios de tecnologia azucarera**. Capítulo 11, p. 425 - 475, 1974.
- PACE, G. W. - Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, **15**:41 - 70, 1980.
- PAGE, W. J.; CORNISH, A. - Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplifies extraction of poly- β -hydroxybutyrate. **Applied and Environmental Microbiology**, **59(12)**:4236 - 4244, 1993.
- PARIKH, V. M.; JONES, J. K. N. - The structure of extracellular polysaccharide of *Azotobacter indicum*. **Canadian Journal of Chemistry**, **41**:2826 - 2835, 1963.
- PAINTER, T. J. - Review paper carbohydrate polymers in desert reclamation: the potential of microalgal biofertilizers. **Carbohydrate Polymers** **20**:77-86, 1993.
- QUEIRÓZ, J. H.; MAUGERI FILHO, F. - Otimização da produção de dextran-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* a partir de melação como fonte de carbono. **Revista microbiológica**, **20(2)**:150-156, 1989.

- RESNICK, S. M.; TOROK, D.; GIBSON, D.T. - Oxidation of carbazole to 3-hydroxycarbazole by naphthalene 1,2-dioxygenase and biphenyl 2,3-dioxygenase. **FEMS Microbiology Letters**, **113(3):297-302**, 1993.
- 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 p. 510, 1993.
- ROSEIRO, J. C.; ESGALHADO, M. E.; COLLAÇO, M. T. A. EMERY, A. N. - Medium development for xanthan production. **Process Biochemistry**, **27:167 - 175**, 1992.
- SANDFORD, P. A. - Exocellular microbial polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemical and Biochemical**, **36:292 - 296**, 1979.
- SARIG, S.; STEINBERGER, Y. - Immediate effect of wetting event on microbial biomass and carbohydrate production-mediated aggregation in desert soil. **Geoderma**, **56:599-607**, 1993.
- SOUW, P.; DEMIAN, A. L. - Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Applied and Environmental Microbiology**, **37:1186-1192**, 1979.
- SPIFF, E. D.; ODU, C. T. I. - Acetylene reduction by *Beijerinckia* under various partial pressures of oxygen and acetylene. **Journal of General Microbiology**, **78:207-209**, 1973.
- STARKEY, R. L.; DE, P. K. - A new species of *Azotobacter*. **Soil Science**, **47:329 - 343**, 1939.

- STUCKI, G.; ALEXANDER, M. - Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, **53(2):292-297**, 1987.
- SUTHERLAND, I. W. - Microbial exopolysaccharides - their role in microbial adhesion in aqueous systems. **Critical Reviews in Microbiology**, **10(2):173 - 201**, 19
- SUTHERLAND, I. W. - Microbial Exopolysaccharides - Potencial. **Process Biochemistry**, novembro:27 -30, 1972.
- TCHAN, Y. T. - Presence of *Beijerinckia* in northern Australia and geographic distribution. **Proc. Linn. Soc. N. S. Wales** **78:171 - 178**, 1956.
- TORRES, L. G.; BRITO, E.; GALINDO, E.; CHOPLIN, L. - Viscous behaviour of xanthan aqueous solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, **75(1):58 - 64**, 1993.
- TSUCHIYA, H. M.; KOEPESELL, H.J.; CORMAN, J.; BRYANT, G.; BOGARD, M.O.; FEGER, V.H.; JACKSON, R. W. - The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal bacteriology**, **64:521 - 527**, 1952.
- URQUIAGA, S; BOTTEON, P. T. L.; LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. - Fixação biológica de nitrogênio: uma importante fonte de nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar. **Anais do 4º Congresso Nacional da STAB - VII Convenção da actalac**, novembro - Olinda-PE, Brasil, 1987.
- VASCONCELOS, J. N. - Estudo sobre a composição química de melações do Estado de Alagoas. **Anais do 2º Congresso Nacional da STAB** maio/junho, p.45 -51, 1985.

- VENDRUSCOLO, C. T. - Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil. Campinas. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, 1995.
- 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 p.91-95, 1993.
- WHITFIELD, C. - Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal microbiology**, 34:415 - 420, 1988.
- WINOGRADSKY, S. - Étude sur la microbiologie du sol. **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 48, 1932.

ANEXO
(TABELAS E FIGURAS)

TABELA 01: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de K_2HPO_4 por *Beijerinckia* 7070, em meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.

Parâmetros de Fermentação	Concentração de K_2HPO_4 %(p/v)				
	0,05	0,1	0,5	1,0	1,5
$Y_{X/S}$	0,213	0,212	0,245	0,284	0,292
$Y_{B/S}$	0,069	0,066	0,074	0,108	0,148

$Y_{X/S}$ = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

$Y_{B/S}$ = Coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

TABELA 02: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ por *Beijerinckia* 7070, em meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.

Parâmetros de Fermentação	Concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ %(p/v)				
	0,05	0,1	0,5	1,0	1,5
$Y_{X/S}$	0,233	0,235	0,227	0,225	0,223
$Y_{B/S}$	0,094	0,117	0,187	0,240	0,367

$Y_{X/S}$ = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

$Y_{B/S}$ = Coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

TABELA 03: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de NH_4Cl por *Beijerinckia* 7070, em meio padrão a 25°C , pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.

Parâmetros de Fermentação	Concentração de NH_4Cl %(p/v)					
	0,01	0,05	0,01	0,5	1,0	2,0
Y_{XS}	0,242	0,247	0,239	0,237	0,243	0,250
Y_{BS}	0,040	0,058	0,080	0,050	0,024	0,012

Y_{XS} = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

Y_{BS} = Coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

TABELA 04: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de NH_4NO_3 por *Beijerinckia* 7070, em meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.

Parâmetros de Fermentação	Concentração de NH_4NO_3 %(p/v)				
	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0
$Y_{X/S}$	0,253	0,231	0,194	0,204	0,202
$Y_{B/S}$	0,032	0,026	0,020	0,018	0,015

$Y_{X/S}$ = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

$Y_{B/S}$ = Coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

TABELA 05: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por *Beijerinckia* 7070, em meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.

Parâmetros de Fermentação	Concentração de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ %(p/v)				
	0,05	0,10	0,5	1,0	1,5
$Y_{X/S}$	0,247	0,251	0,251	0,253	0,256
$Y_{B/S}$	0,012	0,013	0,014	0,013	0,015

$Y_{X/S}$ = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

$Y_{B/S}$ = Coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

TABELA 06: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de pasta de levedura por *Beijerinckia* 7070, em meio padrão a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.

Parâmetros de Fermentação	Concentração de Pasta de Levedura %(p/v)				
	0,3	0,6	1,0	1,5	2,0
$Y_{X/S}$	0,121	0,143	0,164	0,186	0,208
$Y_{B/S}$	0,026	0,043	0,060	0,057	0,055

$Y_{X/S}$ = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

$Y_{B/S}$ = Coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

TABELA 07: Parâmetros cinéticos obtidos da variação de melão por *Beijerinckia* 7070, em meio padrão sem sacarose a 25°C, pH inicial 6,7, 450 rpm por 20 horas.

Parâmetros de Fermentação	Concentração de Melão %(p/v)				
	1,0	1,5	3,0	4,0	5,0
$Y_{X/S}$	0,175	0,228	0,296	0,450	0,766
$Y_{B/S}$	0,049	0,228	0,419	0,638	1,102

$Y_{X/S}$ = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

$Y_{B/S}$ = Coeficiente de rendimento de biopolímero em relação ao açúcar consumido

TABELA 08: Comparação entre os parâmetros cinéticos das fermentações padrão com e sem controle de pH e com meio alternativo, incubados a 25°C, 400 rpm por 24 horas.

Parâmetros	Fermentação com meio padrão sem controle de pH	Fermentação padrão com pH controlado em 6,5	Fermentação com meio alternativo e pH controlado em 6,5
μ_{\max}	0,390	0,410	0,370
$Y_{X/S}$	0,290	0,294	0,48

μ_{\max} = Taxa específico de crescimento

$Y_{X/S}$ = Coeficiente de rendimento celular em relação ao açúcar consumido

TABELA 09: Parâmetros das fermentações em processo de batelada com adição exponencial, com meio padrão a 25°C, pH 6,5, 400 rpm por 20 horas.

Parâmetros de Fermentação	Concentração inicial de sacarose (% p/v)				
	10	30	45	60	75
μ_{\max}	0,428	0,413	0,413	0,408	0,405
$Y_{x/s}$	0,300	0,270	0,280	0,240	0,180
R (%)	11,20	28,00	36,00	60,00	36,00

μ_{\max} = Taxa específico de crescimento (1/h)

$Y_{x/s}$ = Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao açúcar consumido

R = Rendimento em relação a massa celular obtida na fermentação padrão (%)

TABELA 10: Valores dos parâmetros cinéticos determinados à partir das fermentações em fermentador SF 116, através de processo de batelada com adição linear de sacarose, contendo meio padrão a 25°C, pH 6,5, 400 rpm por 20 horas.

Parâmetros de fermentação	Fermentação com adição linear de sacarose
μ_{\max}	0,47
$Y_{x/s}$	0,074
R (%)	68

μ_{\max} = Taxa específico de crescimento (1/h)

$Y_{x/s}$ = Coeficiente de rendimento de massa celular em relação ao açúcar consumido

R = Rendimento em relação a massa celular obtida na fermentação padrão (%)

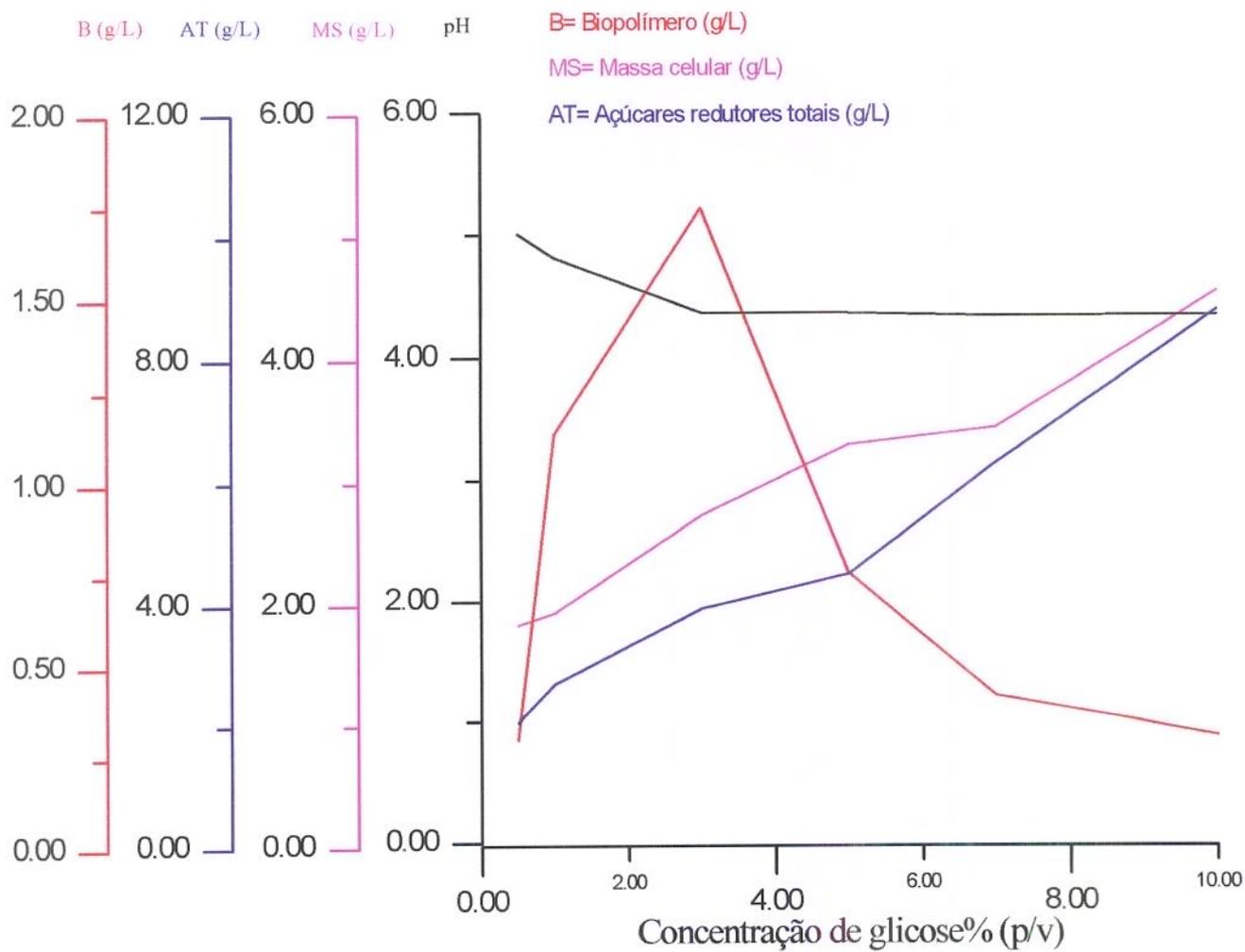


FIGURA 01: Estudo do efeito da concentração de glicose em meio padrão na produção de massa celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero. Condições de fermentação: 30°C, 200 rpm por 20 horas.

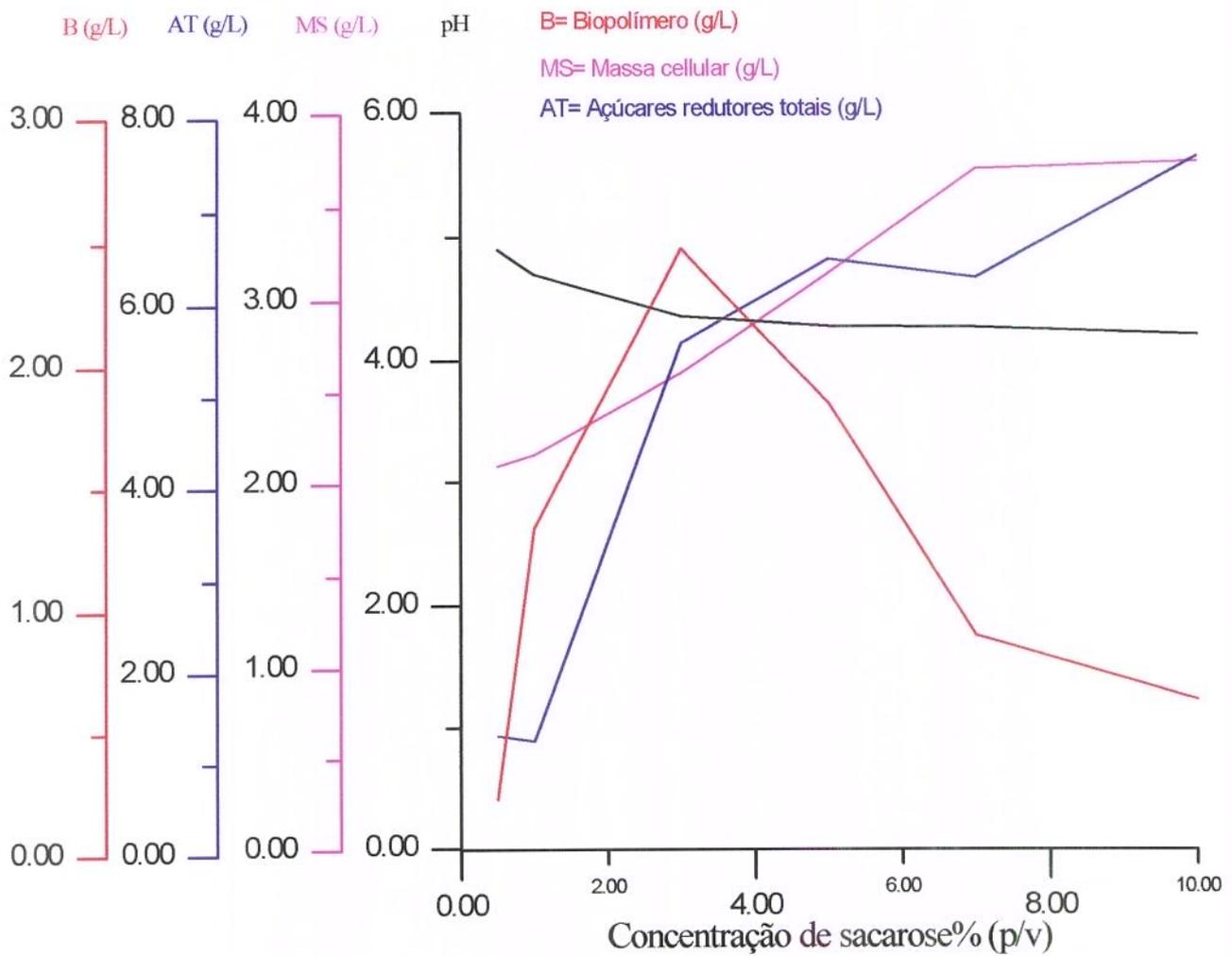


FIGURA 02: Estudo do efeito da concentração de sacarose em meio padrão na produção de massa celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero. Condições de fermentação: 30°C, 200 rpm por 20 horas.

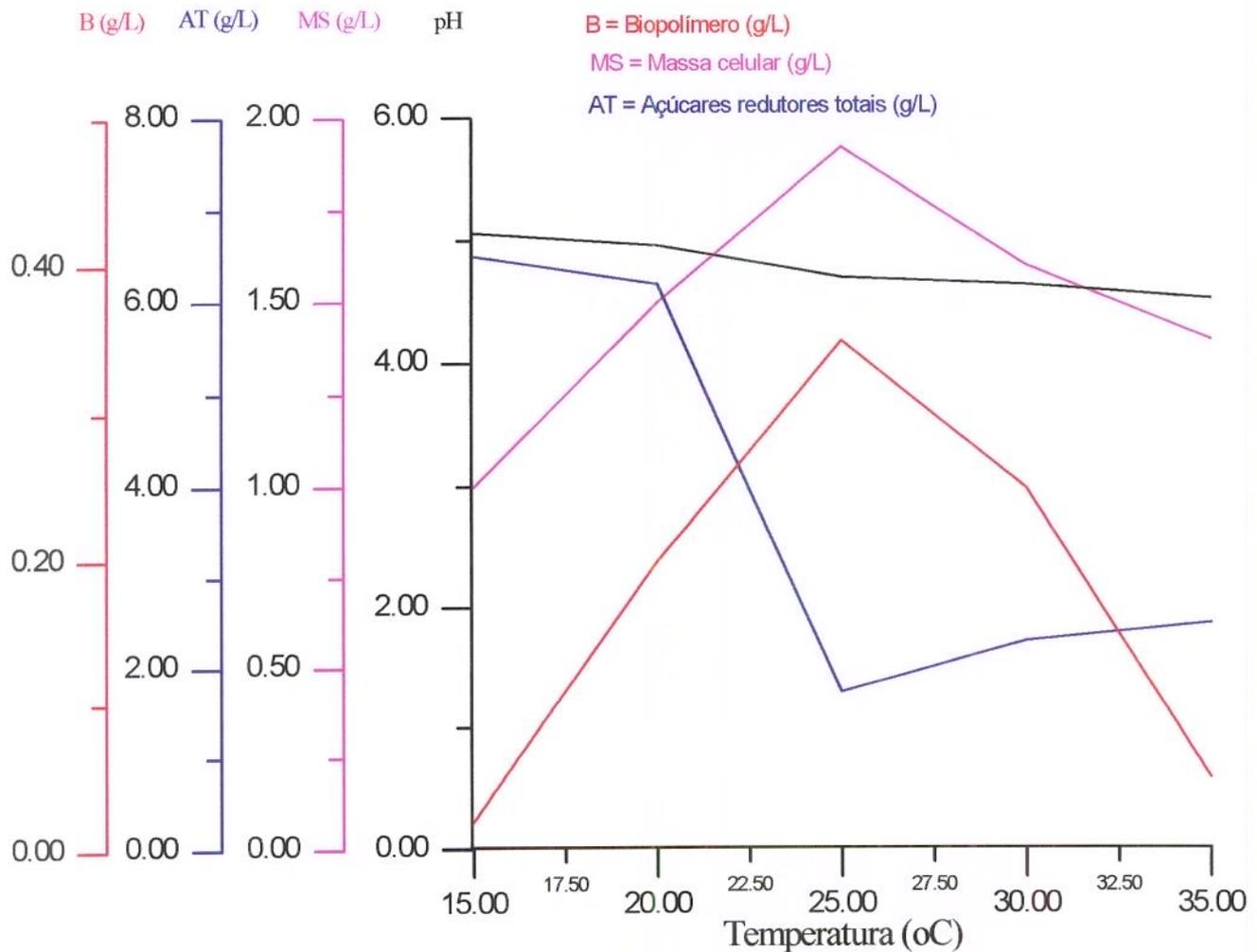


FIGURA 03: Estudo do efeito da temperatura no crescimento celular de *Beijerinckia* 7070, no pH, no consumo de açúcares e na produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: pH inicial 6,7 a 450 rpm.

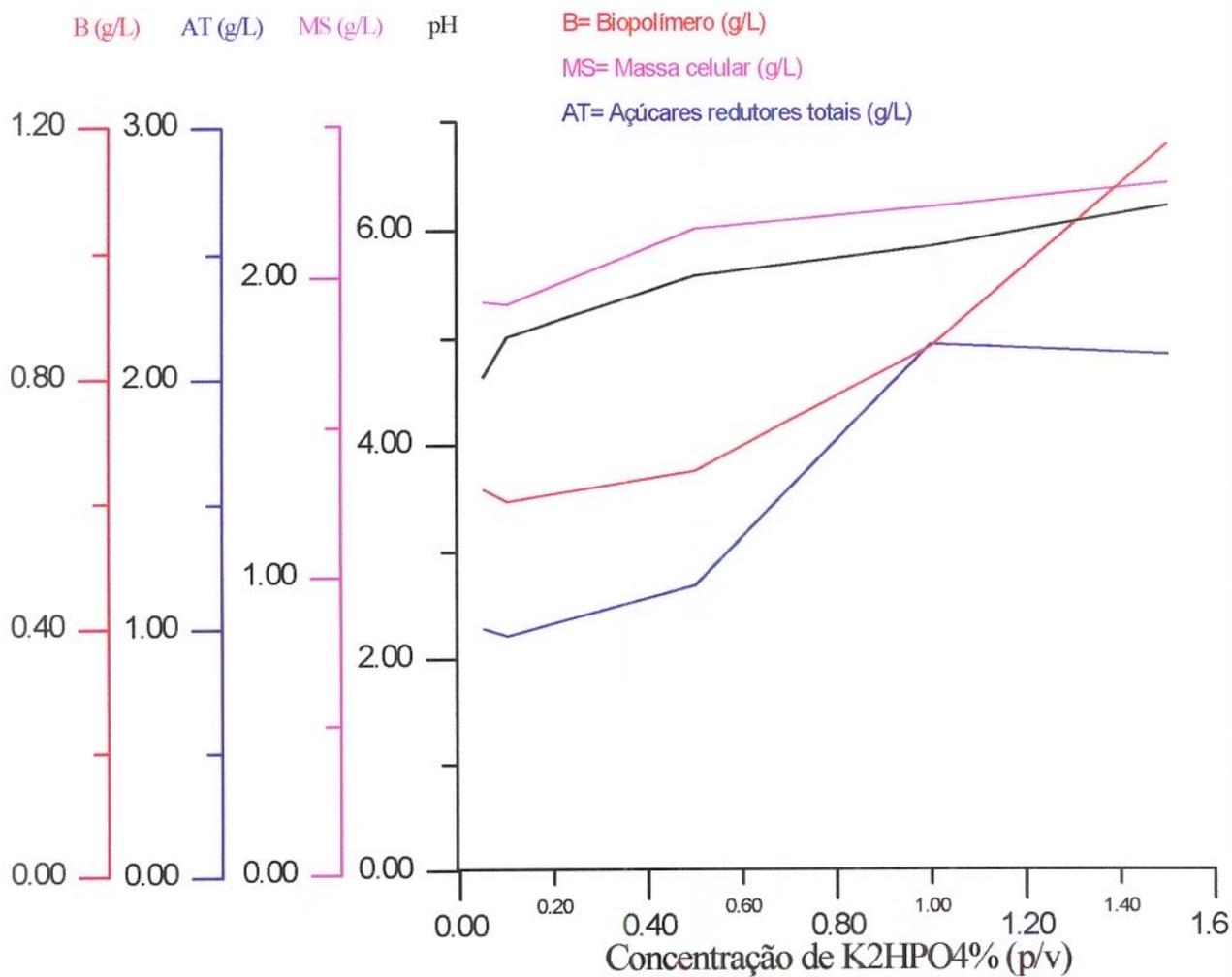


FIGURA 04: Influência da concentração de K_2HPO_4 na massa celular, consumo de açúcares, variação de pH e produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.

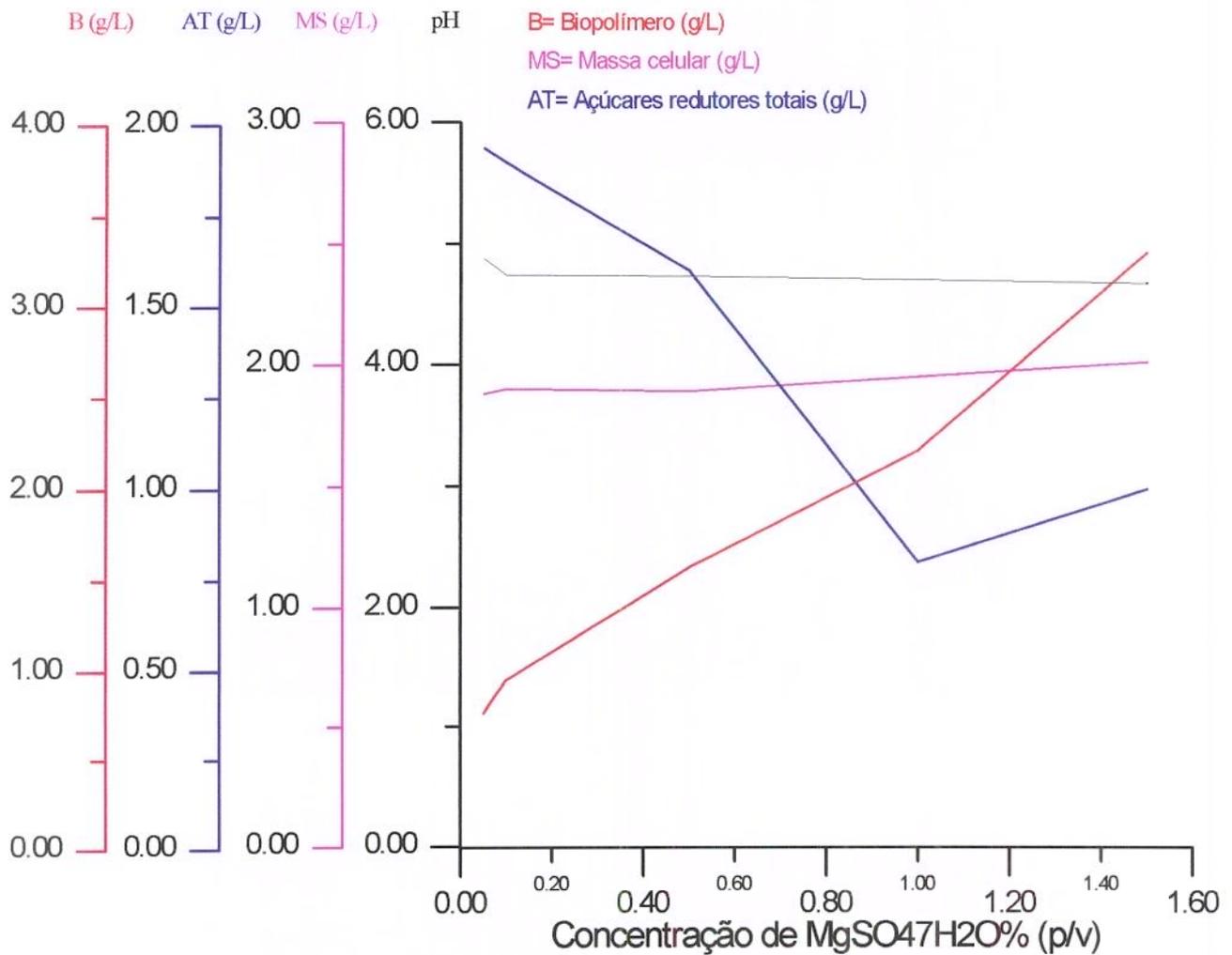


FIGURA 05: Influência da concentração de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ na massa celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.

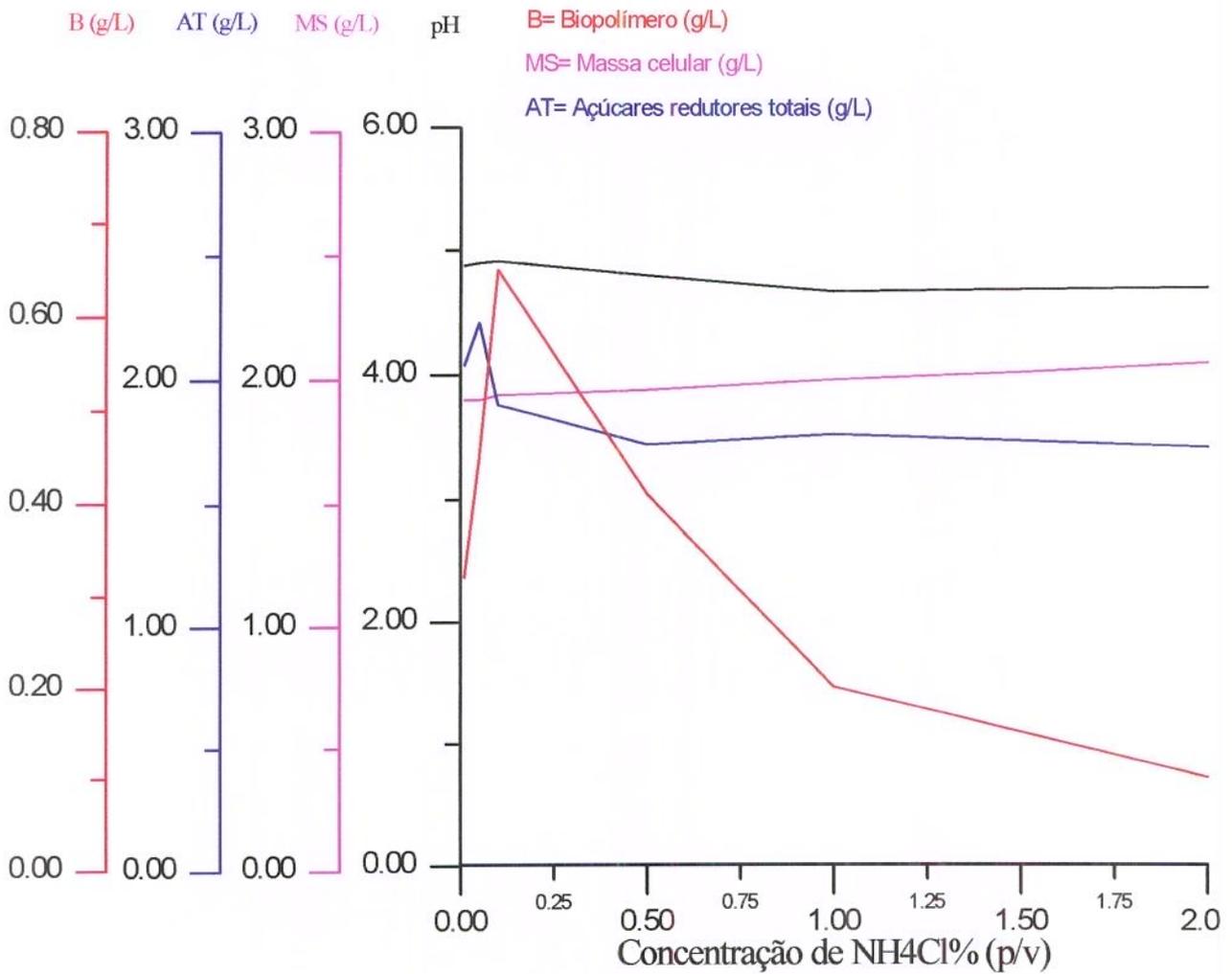


FIGURA 06: Influência da concentração de NH₄Cl na massa celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão.

Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.

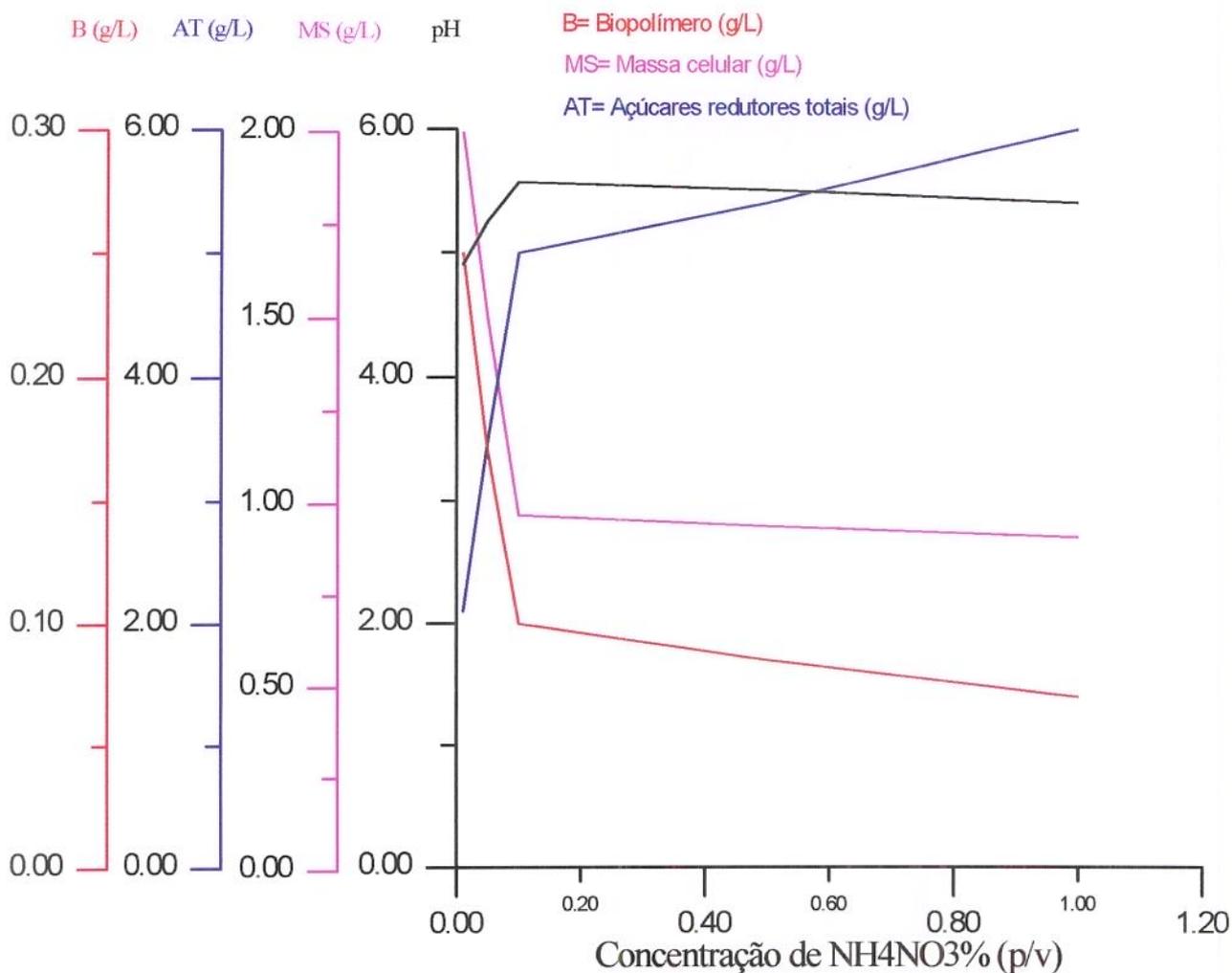


FIGURA 07: Influência da concentração de NH₄NO₃ na massa celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão.

Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.

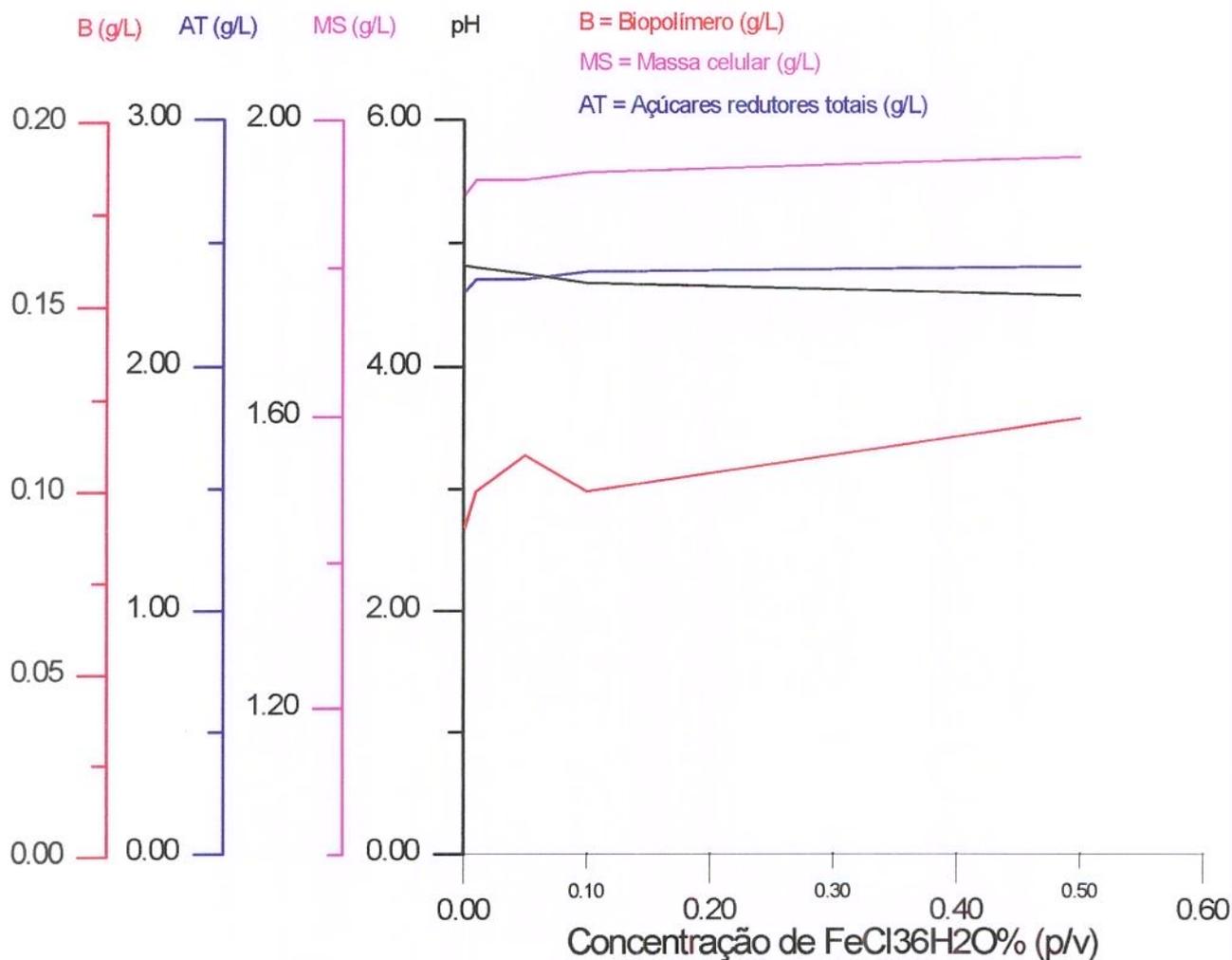


FIGURA 08: Influência da concentração de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ no crescimento celular, no consumo de açúcares, no pH e na produção de biopolímero, em meio padrão.

Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 20 horas.

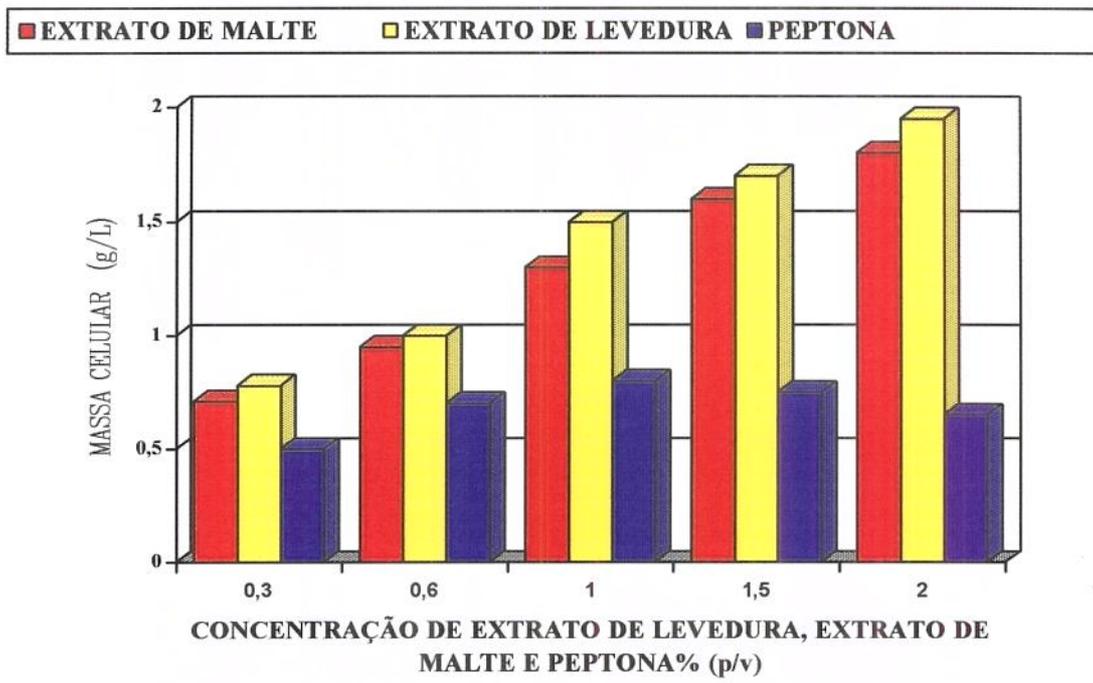


FIGURA 09: Comparação da concentração entre extrato de levedura, extrato de malte e peptona na produção celular, em fermentador de bancada, a 25°C, 450 rpm por 20 horas.

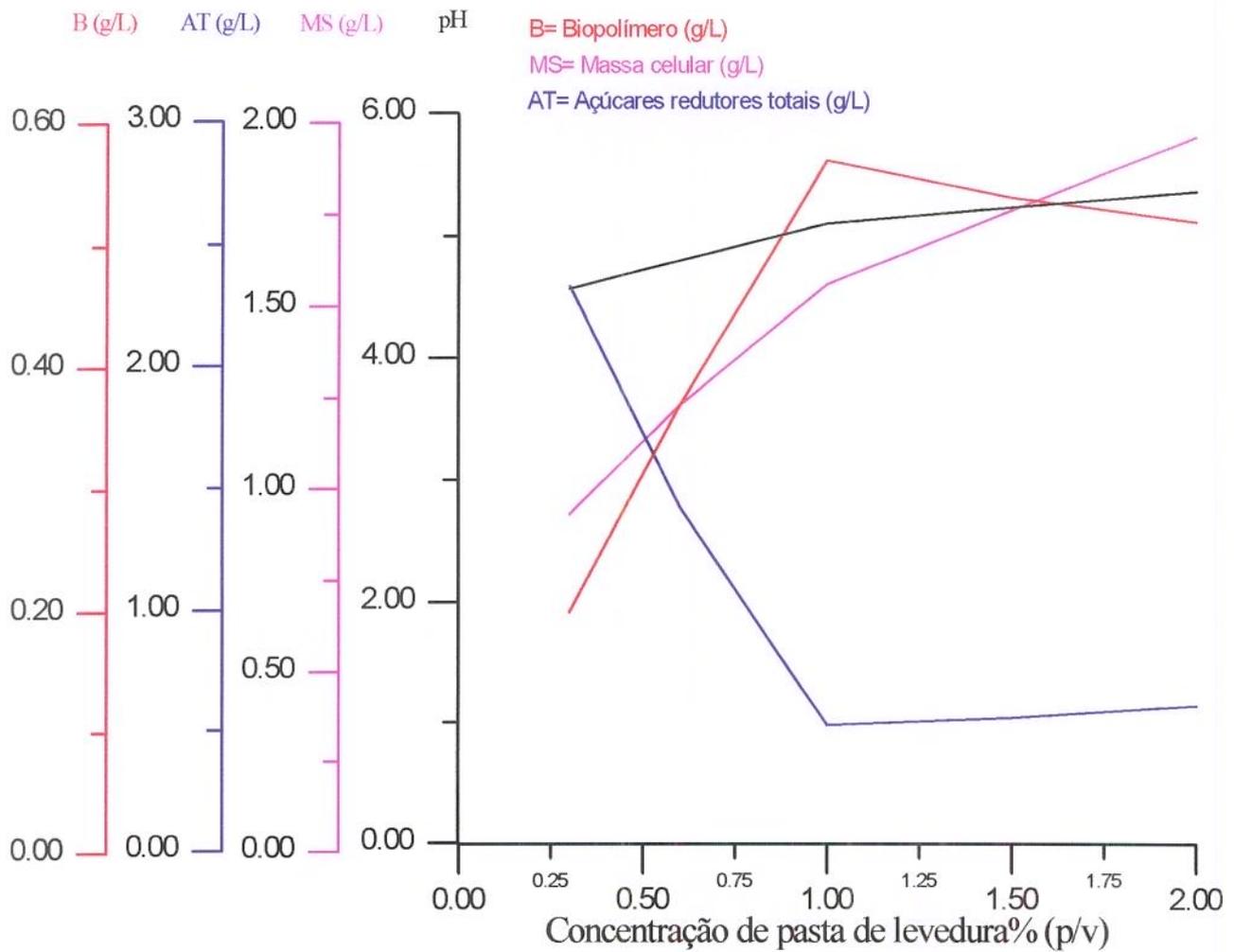


FIGURA 10: Influência da concentração de pasta de levedura com sacarose a 1%(p/v) na massa celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.

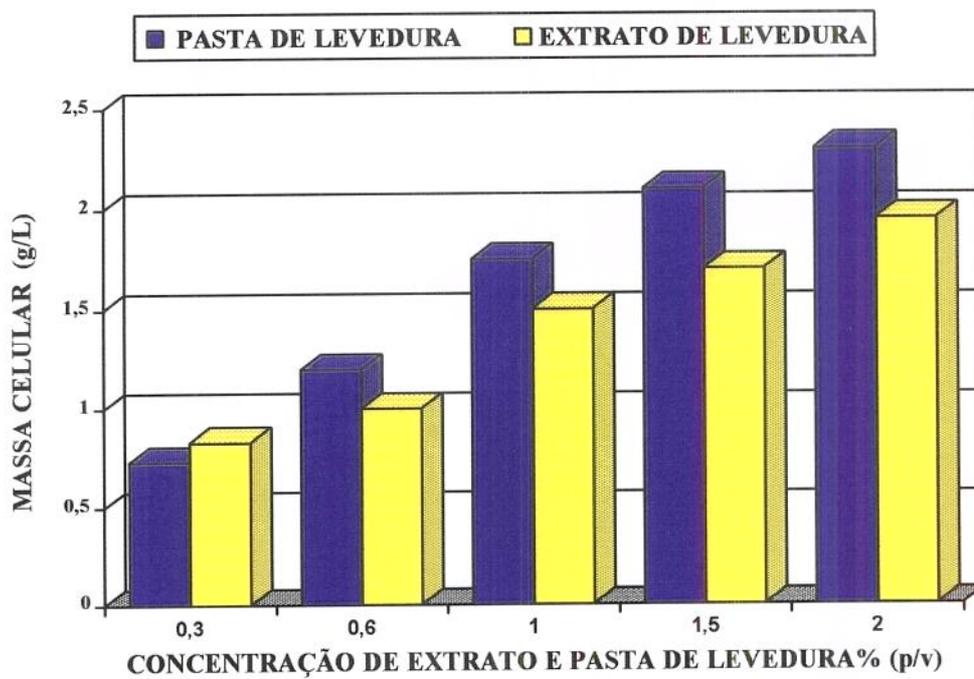


FIGURA 11: Comparação entre pasta e extrato de levedura no crescimento de *Beijerinckia 7070*, incubados a 25°C, 450 rpm por 20 horas.

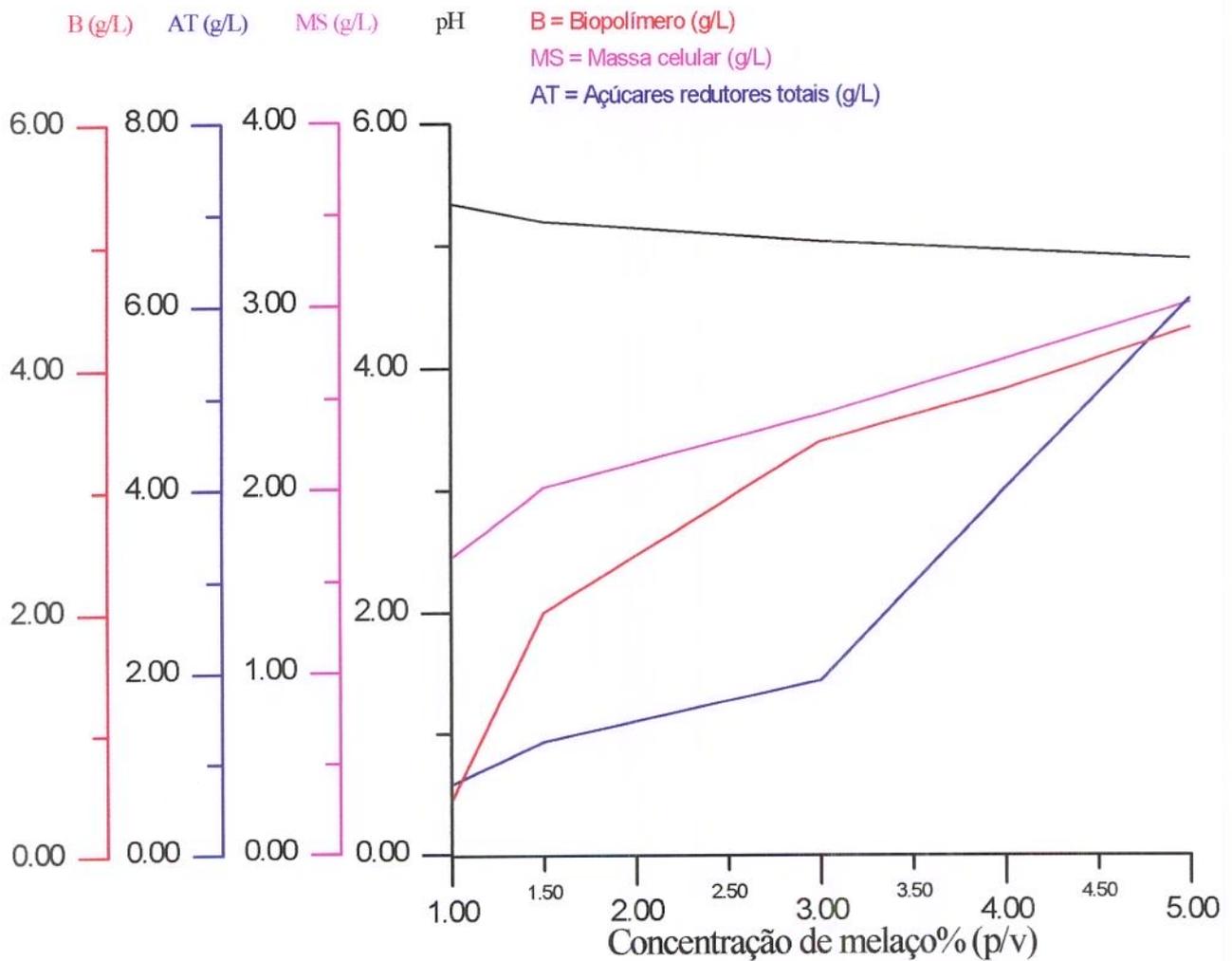


FIGURA 12: Estudo do efeito da concentração de melaço na massa celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero, em meio padrão sem sacarose. Condições de fermentação: 25°C, 450 rpm por 20 horas.

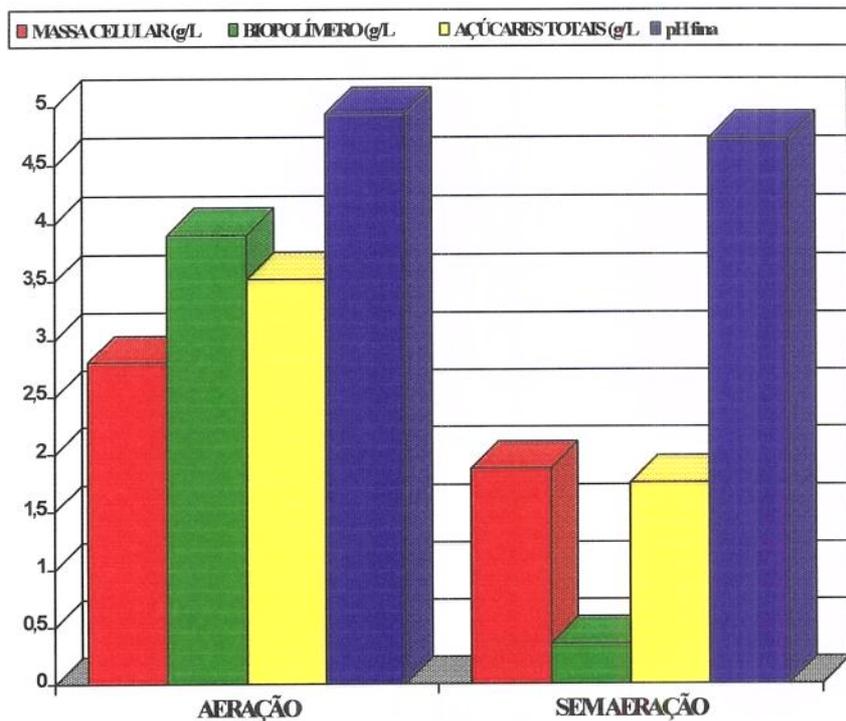


FIGURA 13: Efeito da aeração no crescimento celular, no consumo de açúcares, na variação de pH e na produção de biopolímero em meio padrão. Condições de fermentação 25°C, 450 rpm por 20 horas.

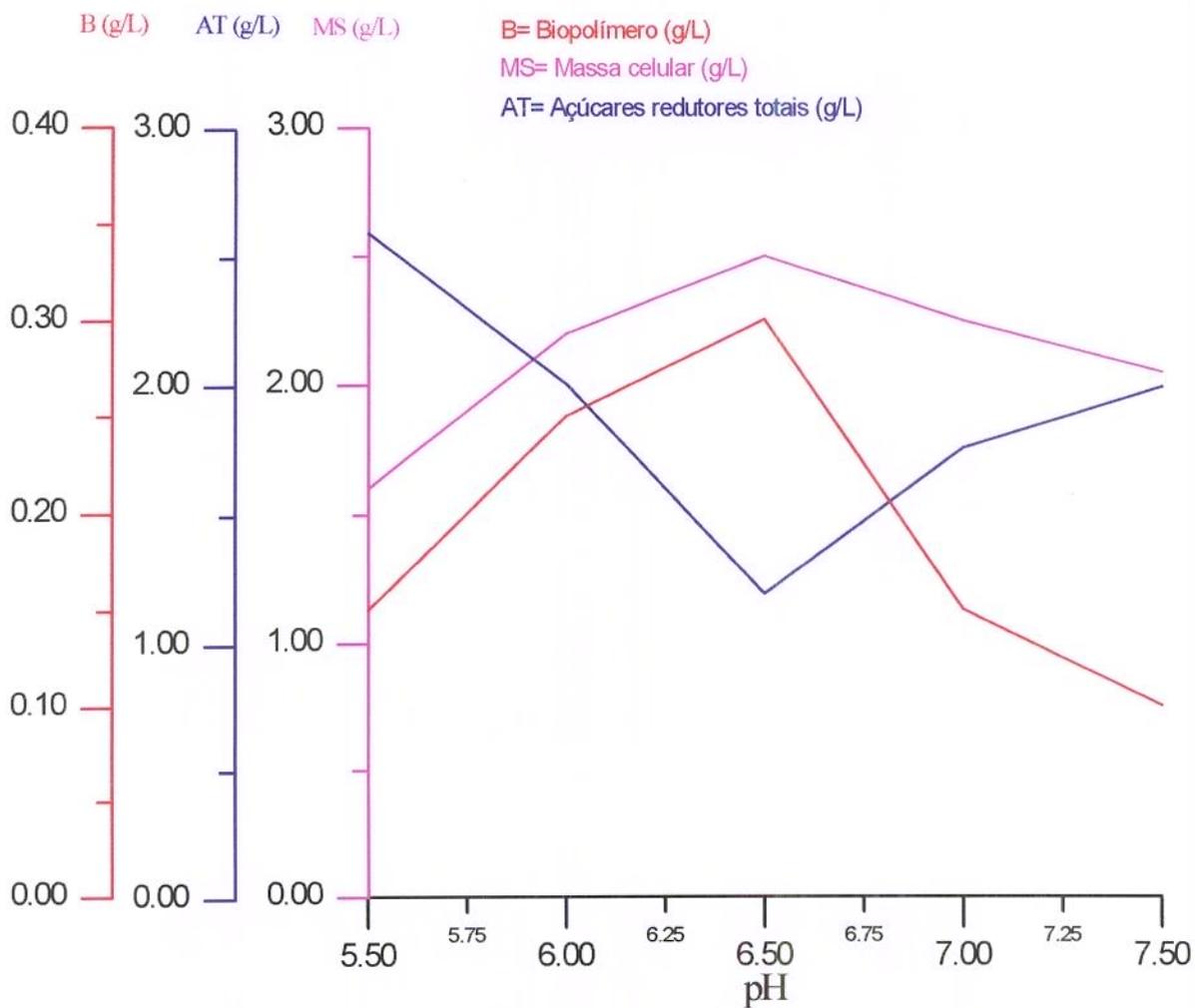


FIGURA 14: Efeito da variação do pH no crescimento celular, no consumo de açúcares e na produção de biopolímero, em meio padrão, a 25°C, 400 rpm, em fermentador SF 116, através da adição de NH₄OH 2N.

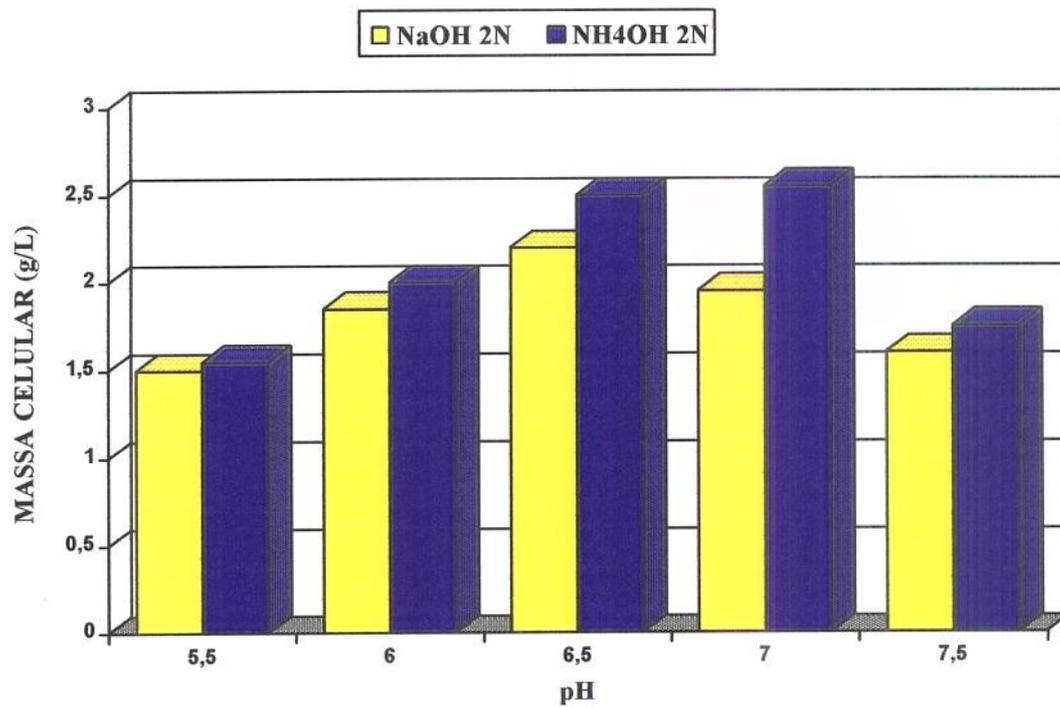


FIGURA 15: Comparação entre as bases de NaOH 2N e NH₄OH 2N no crescimento de *Beijerinckia 7070*, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 20 horas.

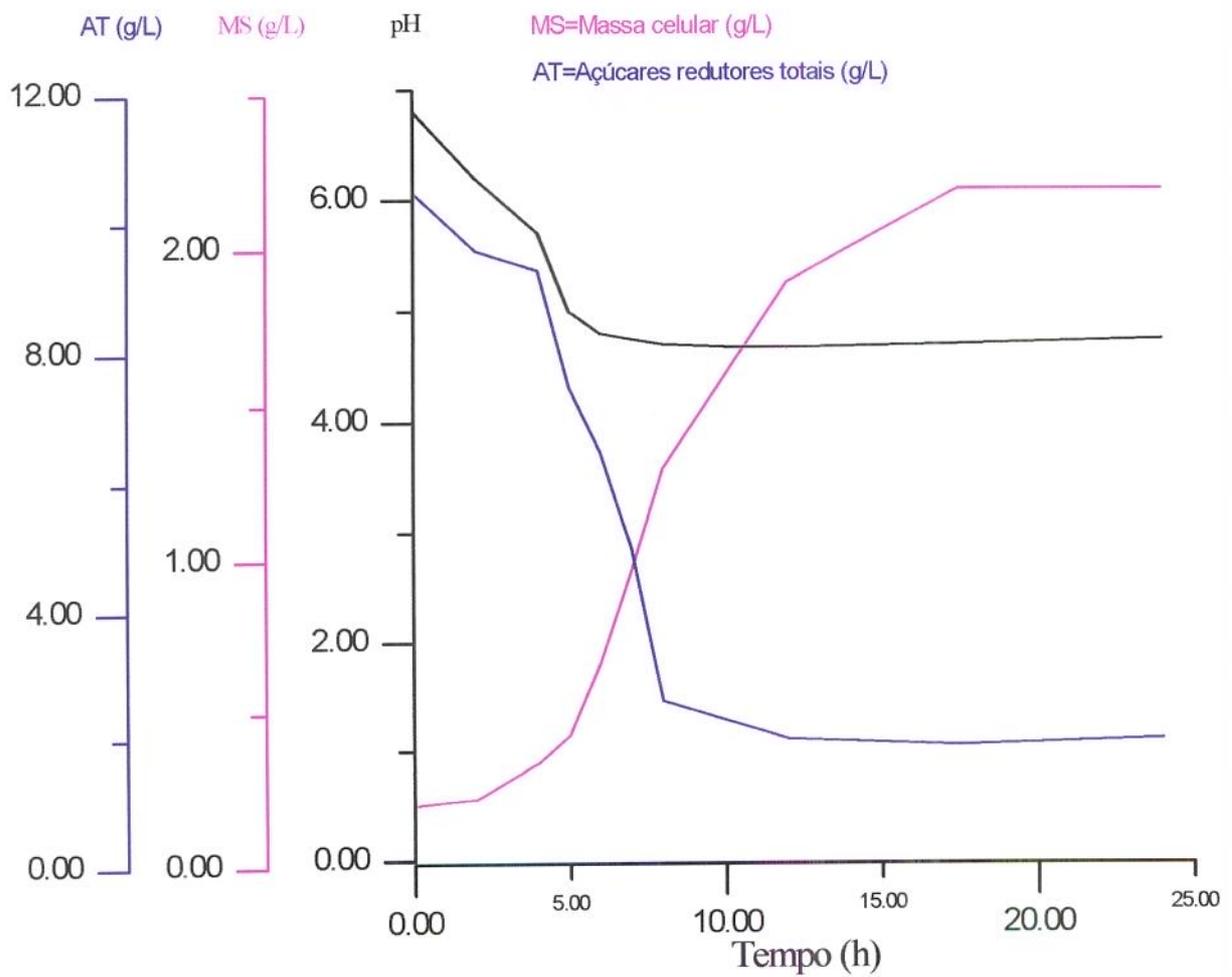


FIGURA 16: Cinética de crescimento celular em fermentador SF 116, contendo 4 litros de meio padrão, pH inicial de 6,7, a 25°C, 400 rpm por 24 horas.

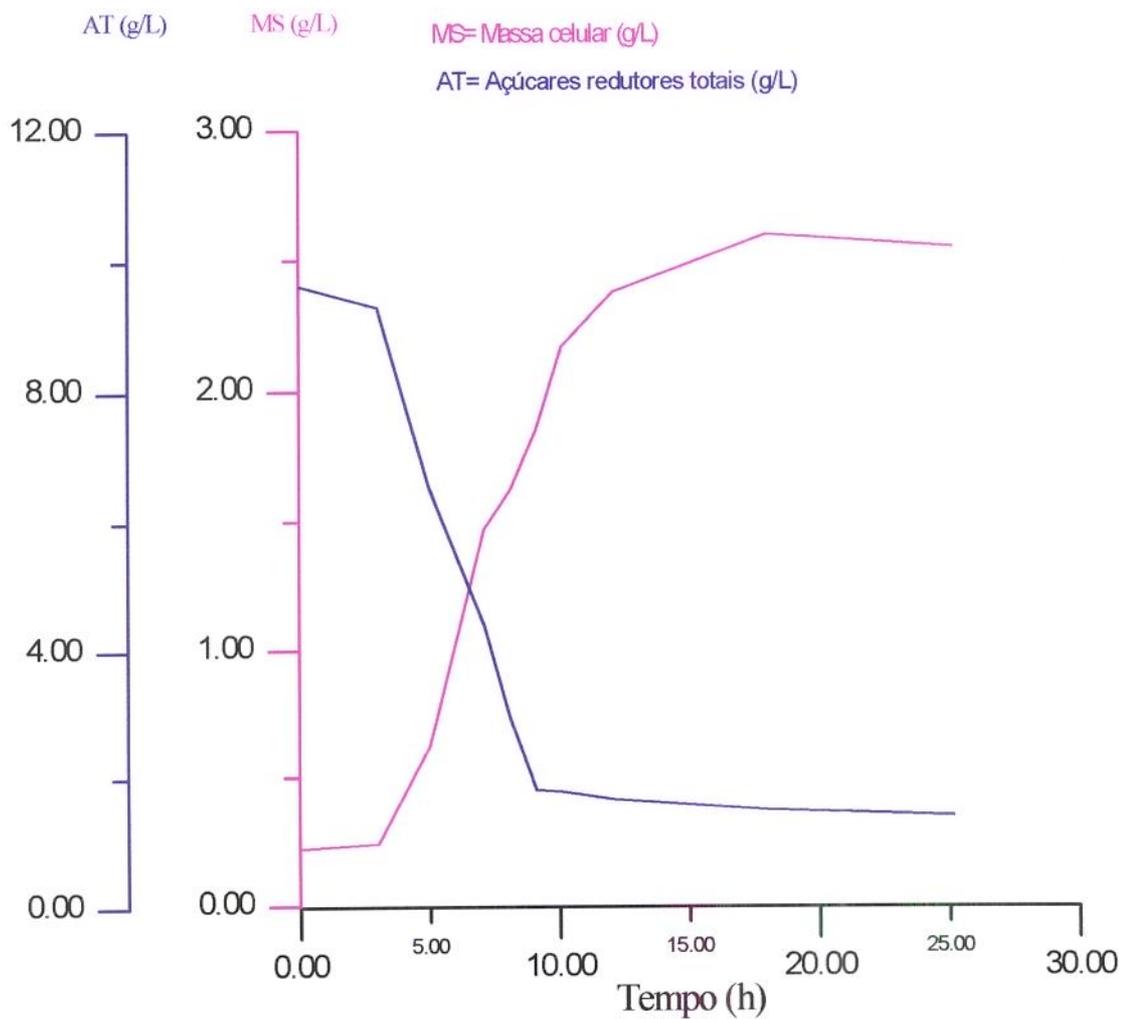


FIGURA 17: Cinética da fermentação padrão, em fermentador SF 116, contendo meio padrão, pH 6,5, 400 rpm a 25°C.

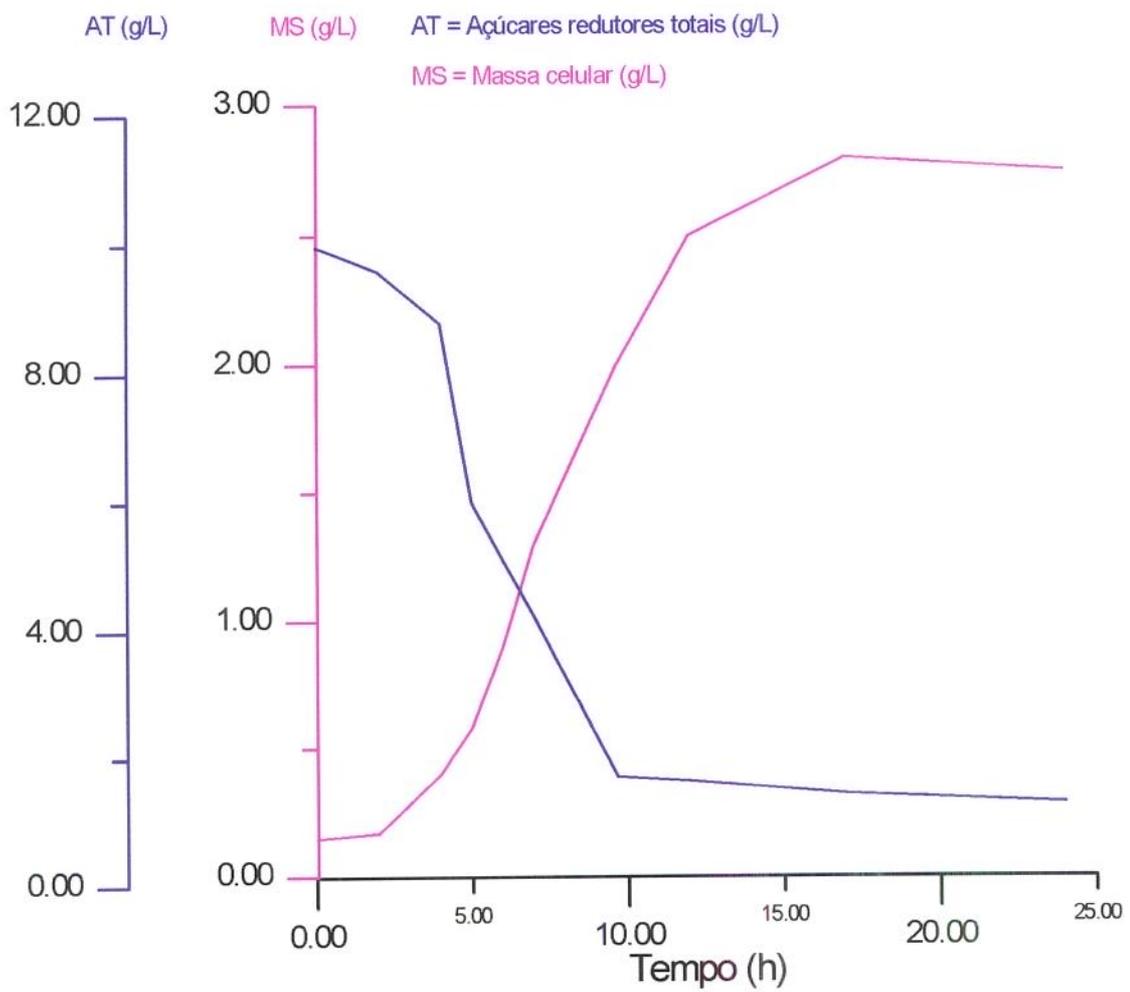


FIGURA 18: Fermentação com meio alternativo (pasta de levedura e melaço) com pH a 6,5, incubados a 25°C, 400 rpm por 24 horas.

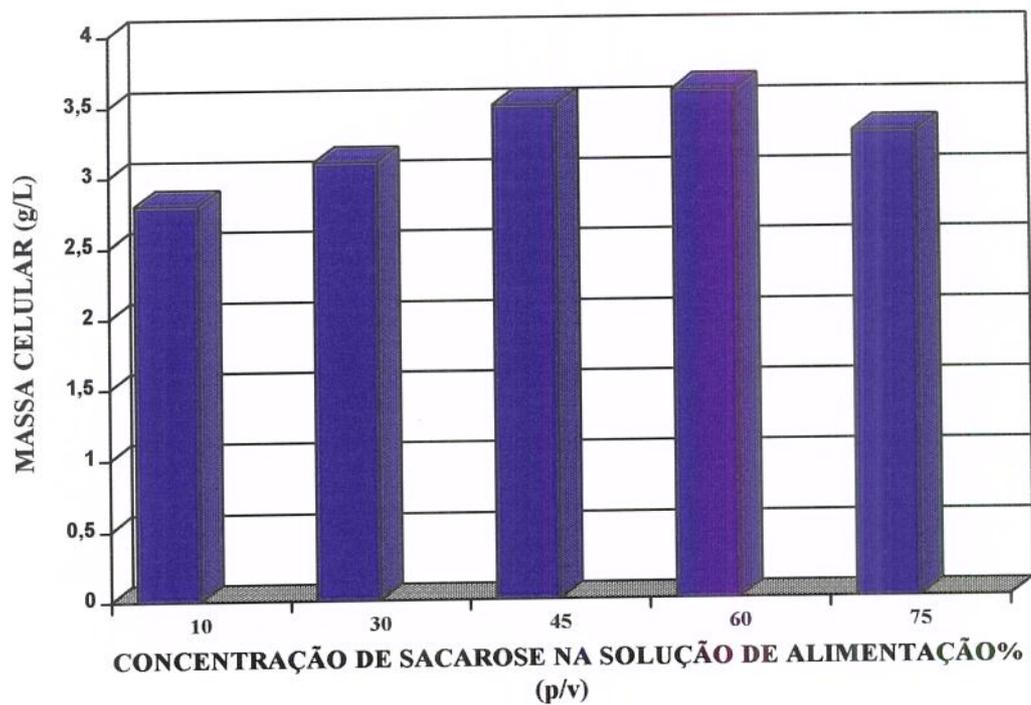


FIGURA 19: Cinética do crescimento celular em função da concentração de sacarose na solução de alimentação, com vazão exponencial, em meio padrão.

Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 20 horas.

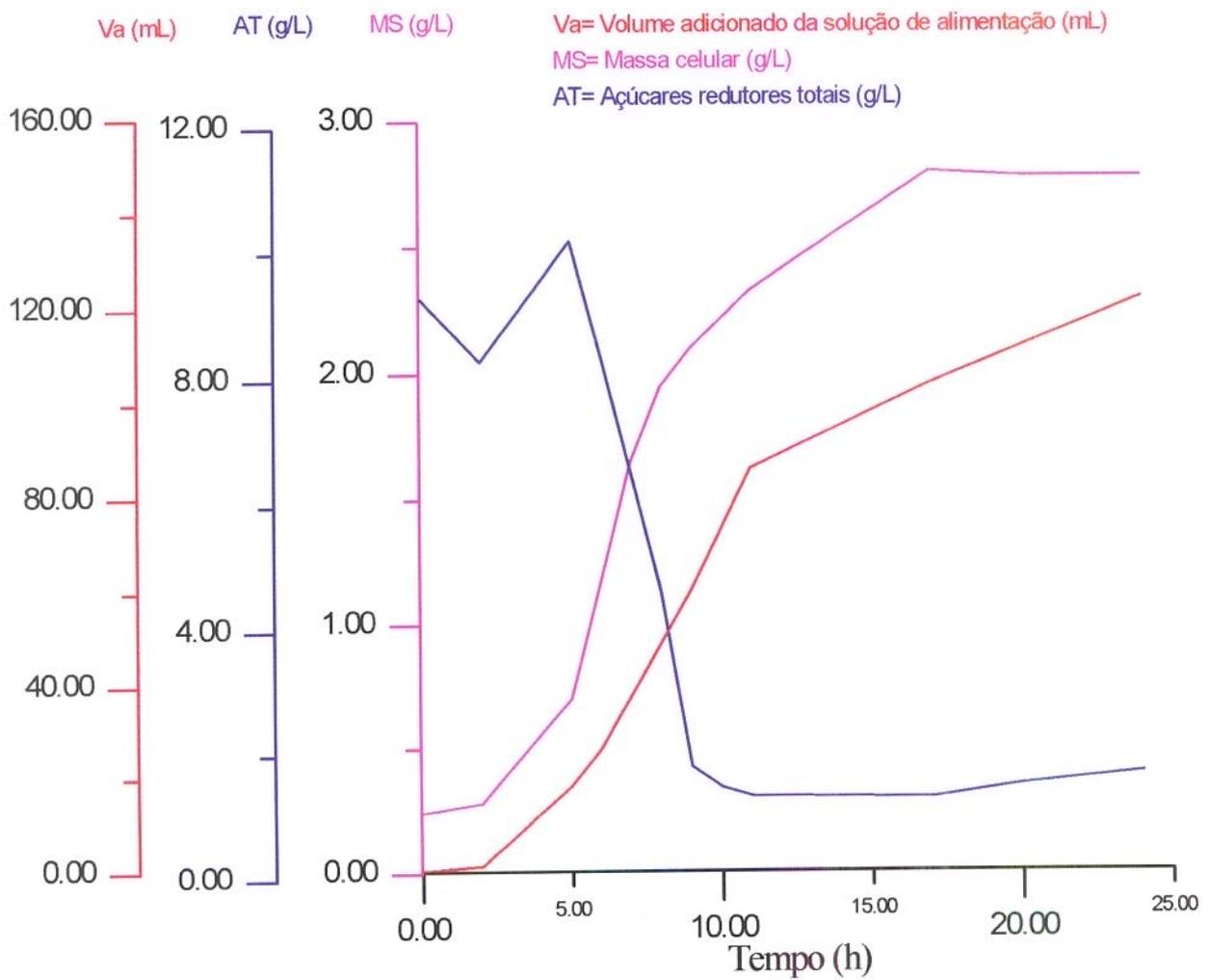


FIGURA 20: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 10% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.

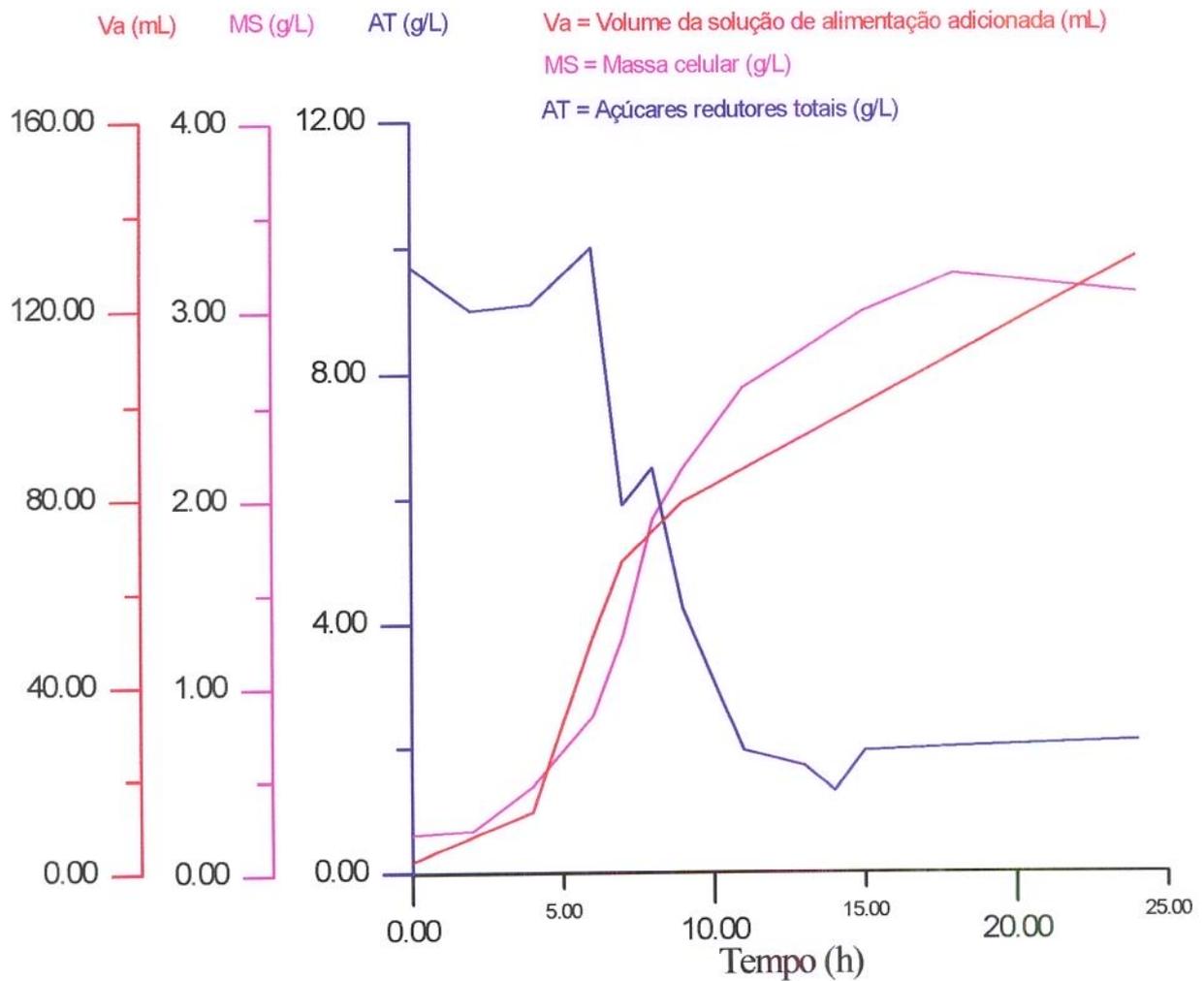


FIGURA 21: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 30% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.

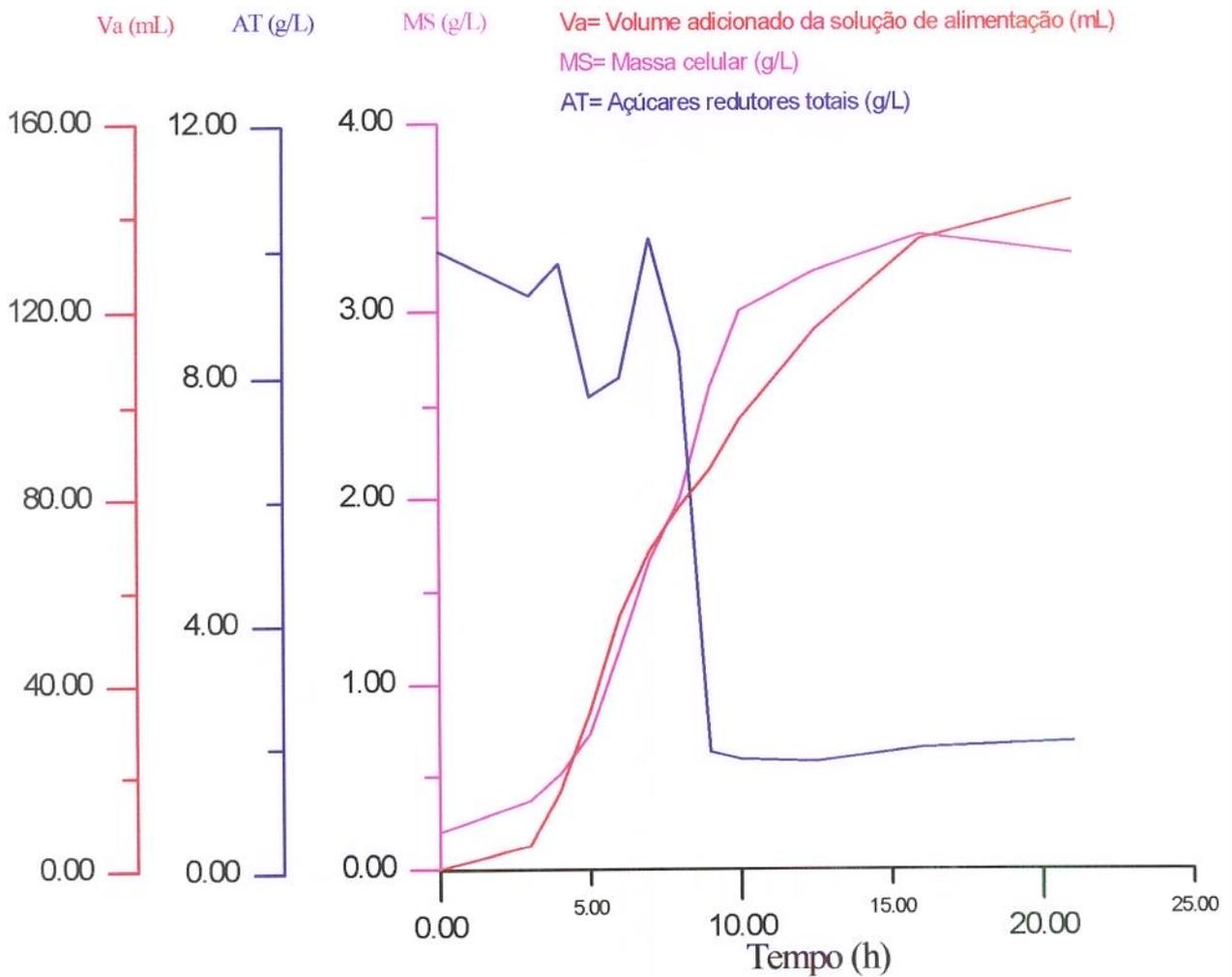


FIGURA 22: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 45% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.

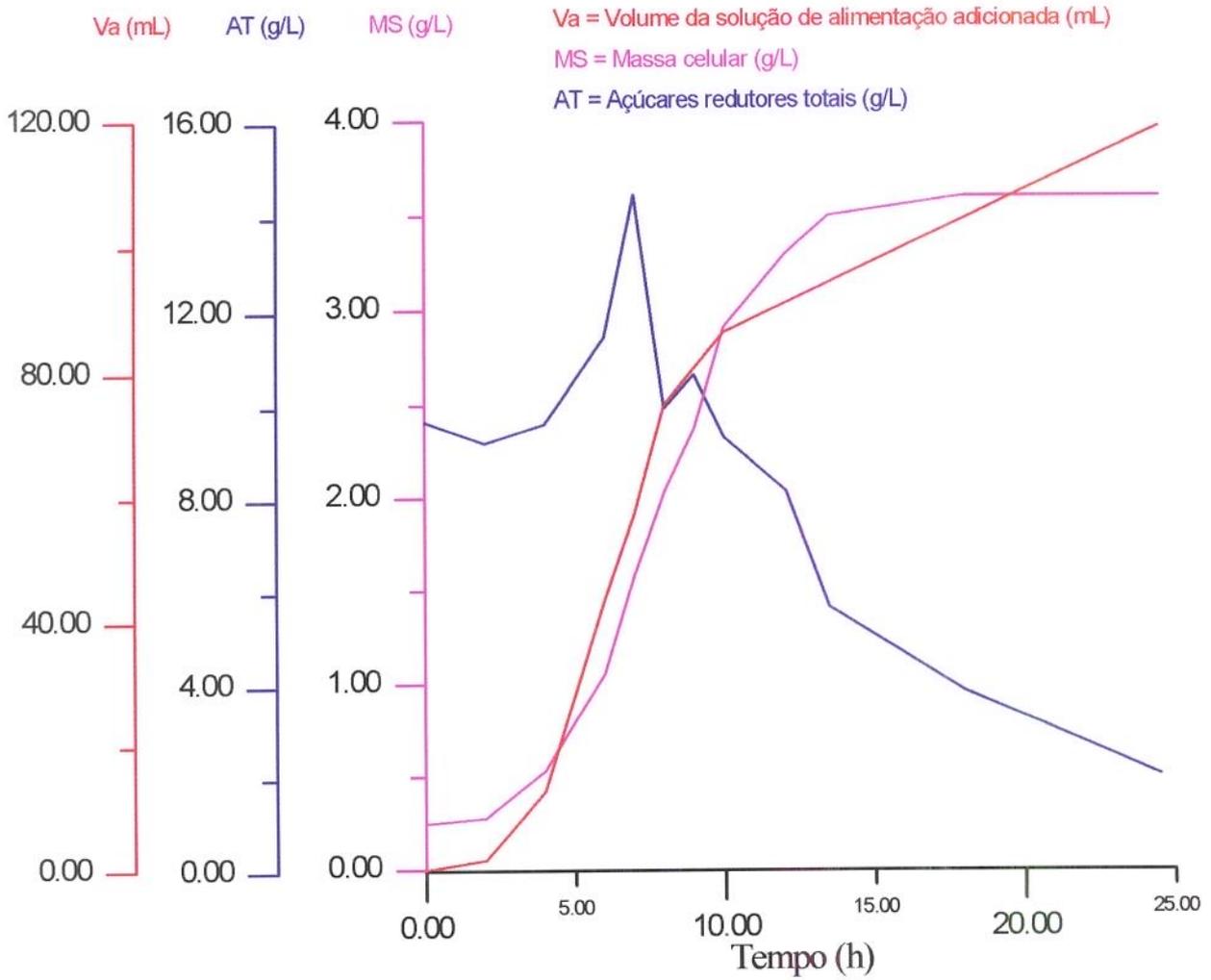


FIGURA 23: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 60% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.

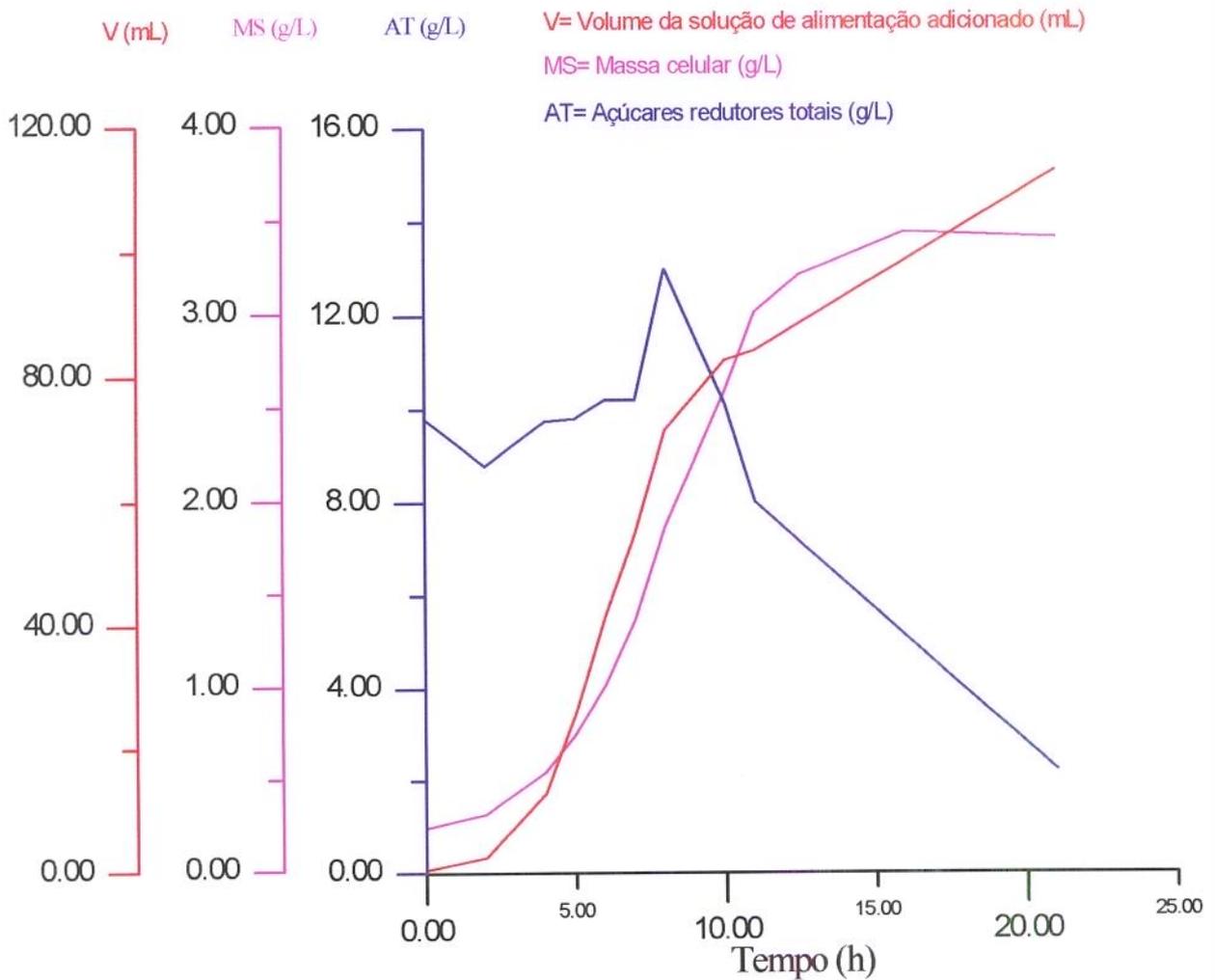


FIGURA 24: Comportamento da cultura com adição exponencial de solução de sacarose a 75% (p/v) em meio padrão incubado a 25°C, 400 rpm por 20 horas.

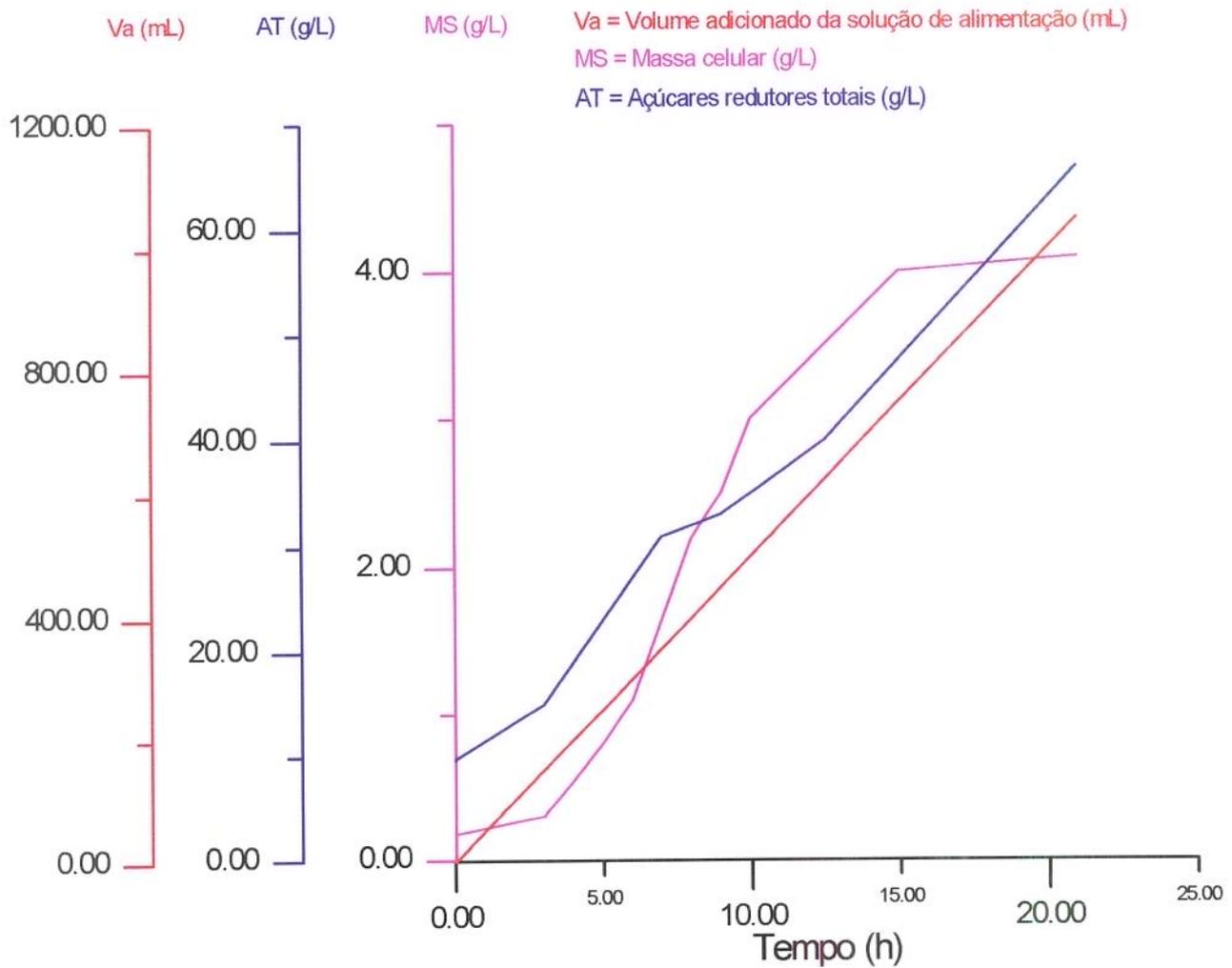


FIGURA 25: Comportamento da cultura com adição linear de solução de sacarose a 45% (p/v) em meio padrão, pH a 6,5, 400 rpm por 20 horas.

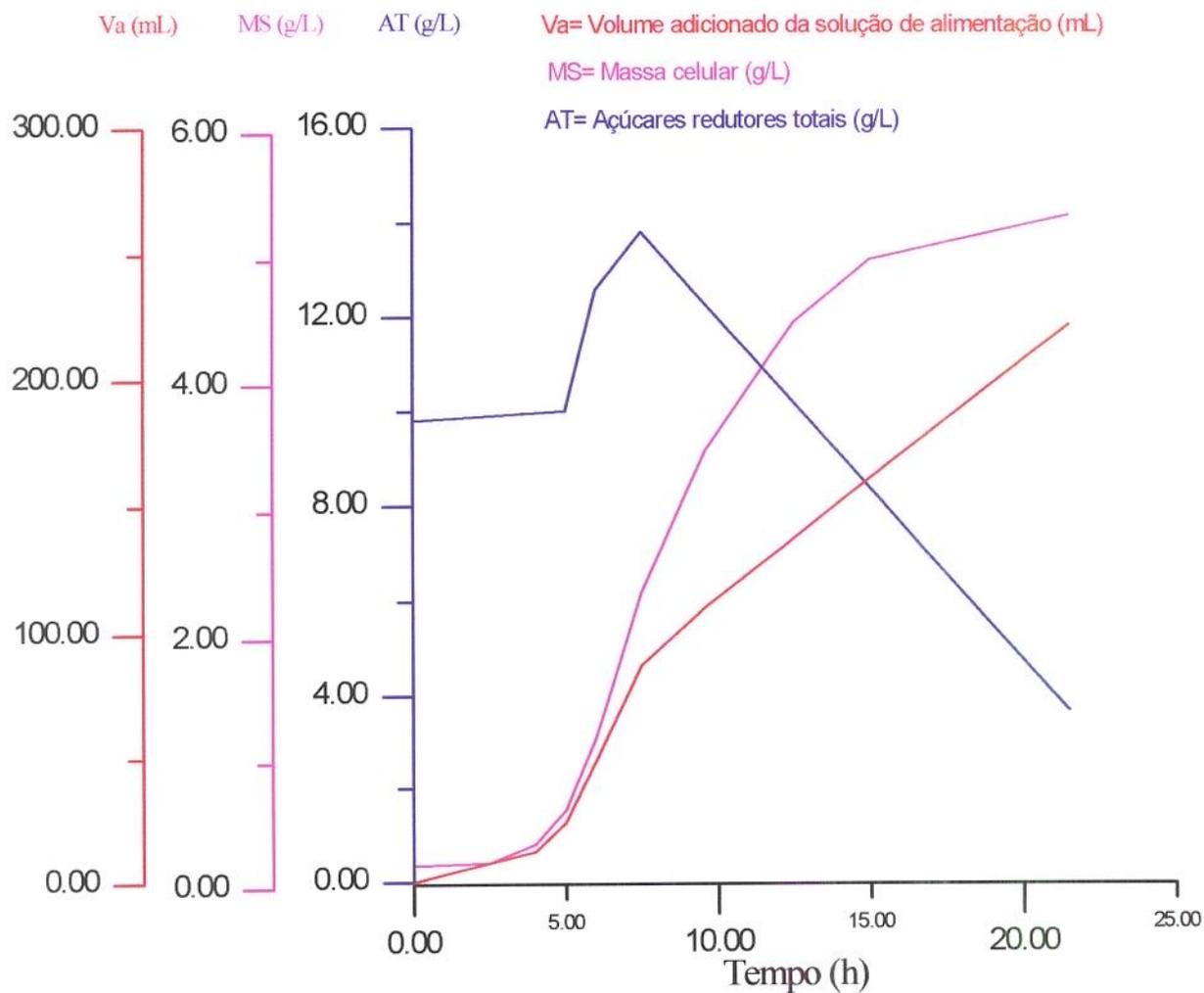


FIGURA 26: Comportamento da cultura com adição exponencial de melação a 45% (p/v) de açúcares totais, em meio padrão. Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 24 horas.

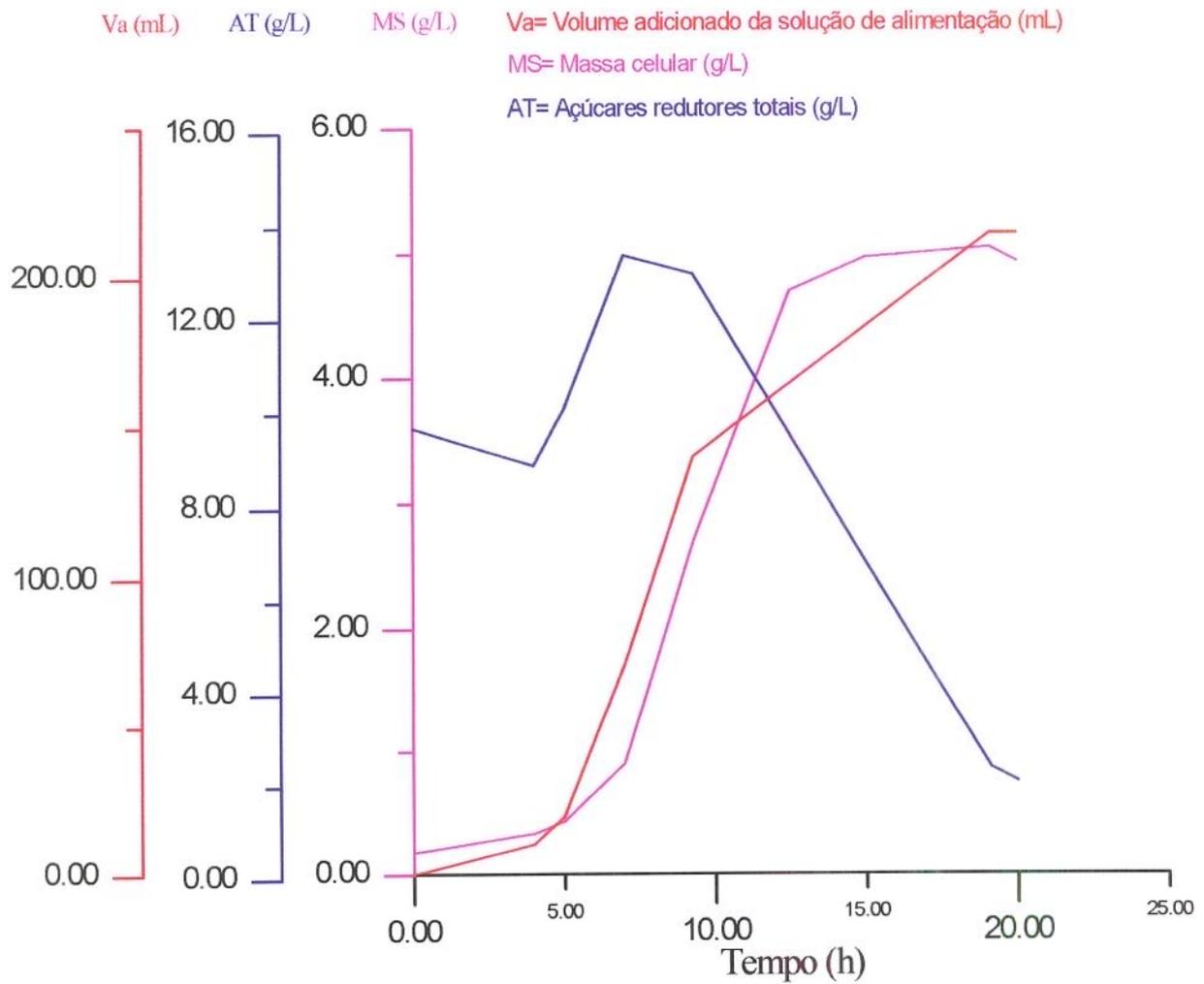


FIGURA 27: Comportamento da cultura com adição de exponencial de melaço 45% (p/v) em meio alternativo. Condições de fermentação: 25°C, 400 rpm por 24 horas.