

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Caracterização da "canjica" - polímero coletado em usinas de açúcar e álcool - e estudo de fatores relacionados à sua formação a partir de gomas produzidas por *Lactobacillus* isolados de caldo de cana-de-açúcar.

Maria Raquel de Godoy Oriani Costa Negro

Orientador: Prof. Dr. Fumio Yokoya

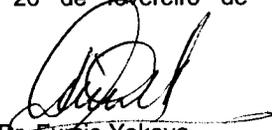
Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos para
obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

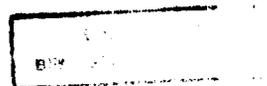
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Maria Raquel de Godoy Oriani Costa Negro aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de fevereiro de 1999.

1999

Campinas, 26 de fevereiro de
1999


Prof. Dr. Fumio Yokoya
Presidente da Banca



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
Ex.	37388
	229,99
	0 <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/04/99
N.º CPD	

CM-00122656-6

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

N312c

Negro, Maria Raquel de Godoy Oriani Costa
Caracterização da “canjica” – polímero coletado em
usinas de açúcar e álcool – e estudo de fatores
relacionados à sua formação a partir de gomas
produzidas por *Lactobacillus* isolados de caldo de cana-
de-açúcar. / Maria Raquel de Godoy Oriani Costa
Negro. -- Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Fumio Yokoya.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cana-de-Açúcar. 2. Dextrano. 3. Fermentação. 4.
Lactobacilo. 5. Polissacarídeos. I. Yokoya, Fumio. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



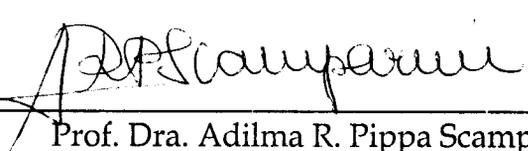
Prof. Dr. Fumio Yokoya
orientador



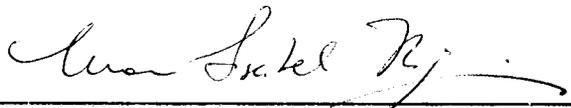
Prof. Dr. Marcos N. Eberlin
membro



Profa. Dra. Tânia A Anazawa
membro



Prof. Dra. Adilma R. Pippa Scamparini
membro



Prof. Dra. Maria Isabel Rodriguez
membro

Prof. Dra. Lúcia R. Durrant
membro

Prof. Dr. José Luiz Pereira
membro

Campinas, de de 1999.

Aos meus pais
por tudo.

Ao Alex
pelo incentivo e
compreensão.

Dedico

Aos meus irmãos
L. A, Paulo e Cia
pelo companheirismo.

Ofereço

AGRADECEÇO:

À Deus, pelo dom da vida e por me guiar em todas as decisões.

Ao prof. Dr. Fumio Yokoya, por todo o conhecimento transmitido durante esses anos de convivência.

Ao prof. Dr. Marcos Eberlin, pelas valiosas discussões e toda colaboração que permitiu a análise química da "canjica".

Aos técnicos Maria Zelinda Martins Beck e Aparecido J. de Almeida, do Instituto de Química, pelo carinho e disposição que me receberam durante as análises de CG-MS.

À prof. Dra. Adilma Scamparine pela colaboração permitindo a utilização do liofilizador e viscosímetro bem como o pessoal do Laboratório de Química Geral do Departamento de Ciências de Alimentos. Agradeço especialmente a Cidinha (pela liofilização), Karla (pelas análises de viscosidade) e Daniela Mariuzzo (pelas valiosas discussões).

À prof. Dra. Deborah Queiroz Tavares e a técnica Iara F. Honório, do Laboratório de Microestrutura de Alimentos, pela colaboração no preparo do material e obtenção das micrografias.

Às técnicas Daniela Franco de Carvalho e Rosa Tosello pelo apoio técnico e paciência durante todo esse tempo de convivência e a Taninha pelas valiosas sugestões.

Ao Homero Ferracine Gumerato pelo auxílio na utilização do microscópio confocal.

Ao Sr. Guerino Oriani pela revisão do texto.

À Renata Bromberg e Ana Lourdes Gândara pelas sugestões na elaboração desse trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da FEA, bem como aos funcionários da secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos por todos os favores prestados.

À todos, os antigos e os atuais companheiros, do laboratório de Microbiologia de Alimentos que tantas vezes adiaram suas atividades em prol do meu trabalho.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Índice	i
Índice de Tabelas.....	v
Índice de Figuras.....	vi
Resumo.....	ix
Summary.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Polissacarídeos na cana-de-açúcar.....	4
2.1.2. Dextrana.....	8
2.2. Microrganismos associados a cana-de-açúcar.....	10
2.3. Microrganismos associados a produção de polissacarídeos na cana-de-açúcar.....	14
2.4. Síntese de dextrana.....	18
2.5. Tipos de dextrana.....	23
2.6. Viscosidade.....	25
2.7. “Canjica”	27
2.8. Controle de exopolissacarídeos no processo de fermentação alcoólica.....	30
2.9. Análise estrutural de polissacarídeos através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS).....	32
2.10. Floculação de leveduras e presença de polímeros.....	34
2.11. Influência de íons sobre características físicas de gomas.....	36

3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. Amostras de “canjica”	38
3.2. Análise das “canjicas”	38
3.2.1. Cinzas e umidade.....	38
3.2.2. Análise elementar.....	39
3.2.3. Análise de íons metálicos.....	39
3.2.4. Identificação dos monômeros por cromatografia descendente em papel	39
3.2.4.1. Hidrólise do polissacarídeo.....	40
3.2.4.2. Identificação dos produtos da hidrólise total	40
3.2.5. Análise por cromatografia à gas acoplada a espectrometria de massas.....	41
3.2.5.1. Produção do íon dimensil de sódio a partir de hidreto de sódio.....	42
3.2.5.2. Reação de metilação.....	43
3.2.5.3. Reação de hidrólise.....	43
3.2.5.4. Redução dos açúcares parcialmente metilados.....	44
3.2.5.5. Reação de acetilação.....	44
3.2.5.6. Condições de análise em CG-MS.....	45
3.2.6. Análise por espectroscopia no infravermelho.....	45
3.2.7. Análise por difração de raios X.....	46
3.2.8. Análise microscópica das “canjicas”	46
3.3. Meios de cultura.....	46
3.3.1. Meio cana 11	47
3.3.2. Meio base sacarose.....	47
3.3.3. Meio base glicose.....	47
3.3.4. Meio Man Rogosa & Sharpe (MRS)	47

3.4. Isolamento de microrganismos produtores de gomas a partir de caldo de cana-de-açúcar.....	48
3.5. Seleção da temperatura de incubação para máxima produção de gomas e viscosidade aparente.....	49
3.6. Seleção das culturas quanto a produção de gomas a partir da sacarose.	49
3.7. Preparo das gomas de origem bacteriana.....	49
3.8. Detecção de culturas produtoras de gomas que precipitam em diferentes concentrações de álcool.....	50
3.9. Análise de massa molecular das gomas produzidas pelas bactérias isoladas	
3.10. Identificação das culturas isoladas	51
3.11. Influência das condições climáticas sobre a formação da “canjica”	52
3.12. Teste de influência de íons metálicos sobre a viscosidade aparente das gomas	52
3.13. Teste de influência de íons metálicos e temperatura sobre a viscosidade aparente das gomas	53
3.14. Teste de influência do pH e temperatura sobre a viscosidade aparente das gomas.....	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
4.1. Aspectos gerais da “canjica”	55
4.2. Análise química e microscópica da “canjica”	56
4.2.1. Cinzas, umidade, análise elementar e identificação de monômeros.....	56
4.2.2. Análise de íons metálicos.....	58
4.2.3. Espectroscopia no infravermelho.....	60
4.2.4. Cromatografia à gas acoplada a espectrometria de massas.....	62
4.2.5. Difração de raios X.....	66
4.2.6. Considerações a respeito da análise química da “canjica”	68
4.2.7. Aspectos microscópicos da “canjica”	70

4.3. Gomas produzidas por microrganismos isolados da cana-de-açúcar.....	72
4.3.1. Isolamento de microrganismos produtores de gomas.....	72
4.3.2. Identificação de microrganismos produtores de gomas.....	73
4.3.3. Seleção de microrganismos produtores de gomas.....	78
4.3.4. Detecção de culturas produtoras de gomas que precipitam em diferentes concentrações de álcool.....	80
4.4. Fatores envolvidos na formação da “canjica”	83
4.4.1. Influência das condições climáticas.....	83
4.4.2. Influência de íons metálicos e tratamento térmico.....	86
4.4.3. Influência do pH alcalino e tratamento térmico	92
5. CONCLUSÕES.....	96
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

ÍNDICE DE TABELAS

1. Composição química das “canjicas” coletadas em diferentes usinas de açúcar e álcool.....58
2. Conteúdo de íons metálicos (%) na “canjica” obtidos por fluorescência de raio X.....59
3. Dados de CG-MS para os alditóis acetato derivados da “canjica” e dos padrões de ligação 1,4 e 1,6.....66
4. Características diferenciais das bactérias isoladas a partir do caldo de cana recém colhido e analisadas segundo AXELSSON (1993).....76
5. Influência das temperaturas de incubação sobre a viscosidade aparente dos meios inoculados com diferentes culturas.79
6. Produtividade de goma (mg/10 mL) de diferentes culturas em meio base sacarose e 23°C.....80
7. Médias e desvios padrão de parâmetros climáticos observados na região de Piracicaba/SP durante os anos de 1992 a 1997.....85

ÍNDICE DE FIGURAS

1. (a) Esquema de estrutura de dextrana típica, mostrando cadeia principal de glicose unida por ligações 1,6, com ligações 1,4 e 1,3 nos pontos de ramificação e (b) monômero de glicose (KITCHEN, 1988).....1
2. Grãos de “canjica” recém coletadas em processos de fermentação alcoólica (a) e (b) grãos isolados e (c) grãos aglomerados.....56
3. Espectros de infravermelho da “canjica” (a) e de um padrão de dextrana (b).....61
4. Cromatogramas dos alditóis acetatos parcialmente metilados derivados do padrão 1,4 (a), padrão 1,6 (b) e “canjica” (c). Condições de operação: gás de arraste :hélio; volume de injeção: 1 μ L; coluna: ultra 2 HP; temperatura da coluna: 130°C/5min até 300°C com aumento de 7°C/minuto; temperatura do injetor e detector: 250°C e 280°C, respectivamente.....65
5. Espectros de massa obtidos a partir do (a) padrão de ligação 1,4; (b) padrão de ligação 1,6 e (c) “canjica”64
6. Cromatogramas dos alditóis acetatos parcialmente metilados derivados da (a) “canjica”, (b) do padrão 1,6 e (c) os dois (“canjica” e padrão 1,6) injetados juntamente. Condições cromatográficas: gás de arraste: hélio;; coluna: Ultra 2 HP; temperatura da coluna: 130°C/5minutos até 300°C com aumento de 7°C/minuto;

- temperatura do injetor e detector: 250°C e 280°C, respectivamente.....65
7. Padrão de difração de raios X da (a) dextrana e da “canjica” e (b) da “canjica”, utilizando goniômetro horizontal e feixe de 30Kv e 20mA com colimador K_{α} Cu e filtro K_{β}67
8. Aspectos microscópicos da “canjica” e microrganismos associados (1.250x): (a) aspecto geral com bacilos e leveduras e (b) detalhe das leveduras.....71
9. Cromatograma (Intensidade x tempo) obtido por GPC (cromatografia de permeação em gel) de: padrão dextrana de MM 2.000.000 Da (P) e gomas produzidas pelas culturas de *Lactobacillus* selecionadas. Condições cromatográficas: fase móvel: água, vazão: 0,8 mL min⁻¹, temperatura do detector e das colunas: 40°C e volume da amostra injetada: 100μL.....82
10. Gráfico (viscosidade x rotação) após a adição de 5 mmol L⁻¹ de diferentes cátions sobre a viscosidade aparente (cP) da amostra de goma. Viscosímetro Brookfield modelo DV-III. Condições de análise: haste nº 18, 240-250 rpm, intervalo de 1 minuto, rotação variando de 1 em 1; temperatura de leitura 23°C.....87
11. Gráfico (viscosidade x rotação) após a adição de 5 mmol L⁻¹ de diferentes cátions e tratamento térmico brando (72°C/5 minutos) sobre a viscosidade aparente (cP) da amostra. Viscosímetro Brookfield modelo DV-III. Condições de análise: haste nº 18, 240-250 rpm, intervalo de 1 minuto, rotação variando de 1 em 1; temperatura de leitura 23°C.....88

12. Gráfico (viscosidade x rotação) após a mistura dos cátions cálcio e alumínio em diferentes concentrações sobre a viscosidade aparente da solução com goma. Condições de análise: Viscosímetro Brookfield DV-III, haste nº 18, 240-250 rpm, intervalo de 1 minuto, rotação variando de 1 em 1; temperatura de leitura 23°C). O índice (*) significa presença de tratamento térmico (72°C/5 minutos).....89

13. Gráfico (viscosidade x rotação) após a adição de óxido de cálcio e tratamento térmico sobre a viscosidade aparente da amostra. Viscosímetro Brookfield modelo DV-III. Condições de análise: haste nº18, 240-250 rpm, intervalo de 1 minuto, rotação variando de 1 em 1; temperatura de leitura 23°C).....91

RESUMO

Um material polimérico insolúvel em água, conhecido no meio industrial como “canjica”, foi coletado em nove usinas de açúcar e álcool durante as safras de 1993 e 1994. Análises químicas mostraram que o material era similar em termos de umidade, com variação no conteúdo de cinzas. Análise elementar determinou tratar-se predominantemente de carboidratos. Traços de nitrogênio e enxofre presentes foram atribuídos a presença de material protéico provenientes dos organismos contaminantes. Cromatografia descendente em papel e cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas mostraram que o polímero era formado por unidades repetidas de glicose unidas predominantemente por ligações do tipo 1,6. Análise dos material por espectrofotometria de infravermelho evidenciou tratar-se de dextrana, enquanto análises por fluorescência de raios X determinaram a presença de íons metálicos associados ao polímero (Ca, Al, Fe, K, Cl, Mn, e traços de Si e Ti) que variaram entre as amostras. Difração de raios X mostrou bandas na “canjica” que não estão presentes em dextrana pura. Em microscopia óptica foi evidenciada a presença de bacilos e leveduras associados ao polímero. A partir de caldo de cana-de-açúcar recém colhida e moída foram isoladas linhagens de bactérias, classificadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e que produziam gomas a partir de sacarose. Foram selecionadas linhagens que produziam alta quantidade de gomas e produziam aumento de viscosidade aparente na solução. As gomas apresentavam predominância de massa molecular maior que 2.000.000 Da, precipitavam somente em concentrações alcoólicas maiores que 20% e eram formadas por monômeros de glicose. Dentre os fatores possivelmente relacionados a formação de “canjica” a partir de dextrana, estudou-se a influência de fatores climáticos, mostrando que houve diferença entre temperatura média máxima entre os anos de estudo. A presença de cátions isolados ou misturados, nas soluções gomosas, em conjunto com choque térmico não foram suficientes para promover a formação da “canjica”. A modificação do pH da solução com adição de óxido de cálcio até 12,0 e com ácido fosfórico até 4,0, juntamente com tratamento térmico brando e extremo também não foram suficientes para modificação visual das gomas.

SUMMARY

A polymeric material insoluble in water, so called "canjica" because of its physical characteristics are similar to those of a typical food made from corn, was collected in nine Brazilian sugar and alcohol plants. It was found that all the samples were very similar to each other regarding to moisture and variable in ash content. It was determined by CHNS analysis that they were carbohydrates. There were also traces of nitrogen and sulphur compounds which were attributed to proteinaceous material from sugar cane juice contaminants. Paper chromatography and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyses showed that the polymers were formed by repeated glucose moiety bound by 1,6 linkages. Sample analyses by infrared spectroscopy showed to be dextran, while X-ray fluorescence determined that there were metallic ions (Ca, Al, Fe, K, Cl, Mn, P and traces of Si and Ti) associated to the polymer. Their contents varied from sample to sample. X-ray diffraction analysis identified another kind of material incorporated to "canjica". Optical microscopy experimentation showed that bacilli and yeast were associated with the polymeric material. From fresh sugar cane syrup, strains of bacteria were isolated and classified as belonging to the gen. *Lactobacillus*, and they were able to produce gum from sucrose. Strains were selected according to the amount of gum produced and its viscosity in solution. All of the gums showed molecular mass higher than 2,000,000 Da, precipitated with alcohol concentrations higher than 20% and composed solely by glucose moieties. Among possible factors related to "canjica" production from dextran, the weather conditions were investigated and a difference was shown between maximal mean temperatures from 1992 to 1997. The cation added (alone or in combined form) to gum solution plus thermal shock were not enough to cause "canjica" formation. The pH changes with calcium oxide to 12.0 or with phosphoric acid to 4.0, plus mild and severe thermal treatments also were also unable to cause a detectable modification of the gum.

1. INTRODUÇÃO

O processo de fermentação na usina de açúcar e álcool, apresenta duas etapas básicas, que se resumem na conservação de leveduras com uma atividade fermentativa elevada e na manutenção da concentração de contaminantes, em níveis em que sua influência seja desprezível. A seletividade do meio e das condições de fermentação, normalmente, impedem que a grande maioria dos contaminantes naturais da usina, encontrada na cana, no caldo de cana e nos equipamentos, encontre condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

Dentre os microrganismos, que se destacam como contaminantes do caldo de cana, estão as bactérias lácticas com predominância do gênero *Lactobacillus* (SILVA & CANHOS, 1990). Os lactobacilos são os principais responsáveis pelo mecanismo de acidificação e de floculação, e participam também, na produção de gomas. A floculação da levedura produtora de álcool, devido à presença de bactérias contaminantes, é um dos problemas mais sérios na fermentação industrial, especialmente devido à redução da produtividade e ao aumento da dificuldade na separação da levedura pela centrifugação (YOKOYA, 1989; YOKOYA & OLIVANETO, 1991).

As bactérias do gênero *Leuconostoc*, há tempos são conhecidas como produtoras de gomas ou substâncias gomosas, em caldo de cana, beterraba e outros fluidos que contêm sacarose (EVANS & HIBBERT, 1946). Segundo De VOS (1996), vários polissacarídeos são produzidos, extracelularmente, a partir da sacarose, entre eles a dextrana. Esta é um polissacarídeo produzido por bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*,

Leuconostoc e *Streptococcus* (SIDEBOTHAM, 1974) e que crescem quase, exclusivamente, em meio contendo sacarose.

Embora associada à cana-de-açúcar, a dextrana não está presente em cana saudável, sendo produzida em cana deteriorada ou durante a manufatura do açúcar, em condições não apropriadas do ponto de vista higiênico. A dextrana é um polissacarídeo formado por glicose, no qual a cadeia principal é unida por ligação 1,6, contendo ligações 1,4 e 1,3 nos pontos de ramificação da cadeia principal (MURPHY & WHISTLER, 1973) (FIGURA 1).

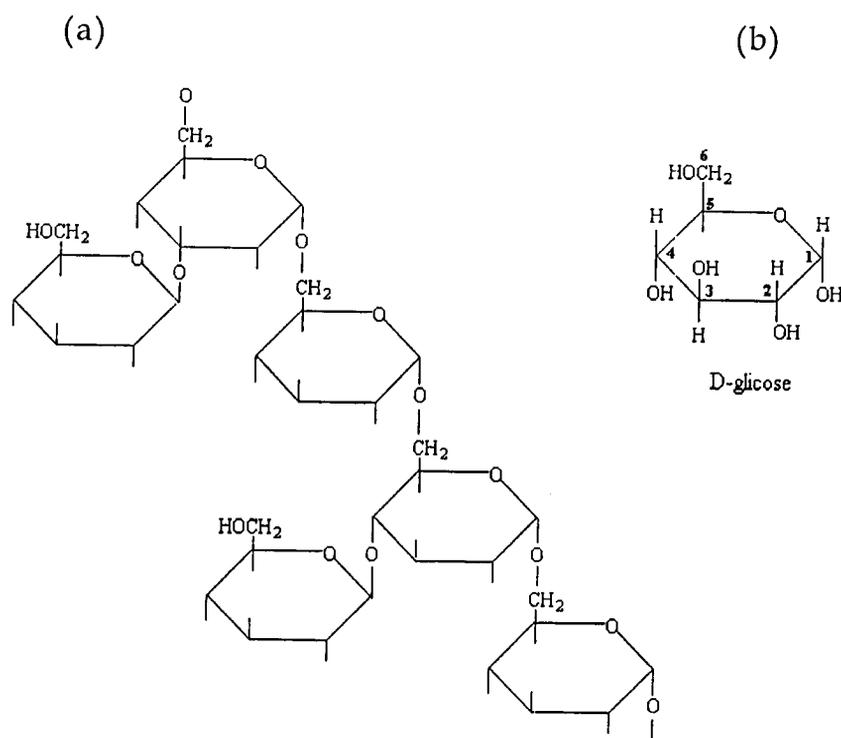


FIGURA 1. (a) Esquema de estrutura de dextrana típica, mostrando cadeia principal de glicoses unidas por ligações 1,6, com ligações 1,4 e 1,3 nos pontos de ramificação e (b) monômero de glicose (KITCHEN, 1988).

A presença de polissacarídeos na cana-de-açúcar, e, conseqüentemente, no caldo de cana, aumenta a viscosidade do caldo, dificultando os processos industriais de clarificação, evaporação, cozimento e cristalização, além de causar entupimento nas tubulações, nas centrífugas, nas peneiras e nos trocadores de calor (EGAN, 1966; TILBURY, 1975). O teor de oligossacarídeos e polissacarídeos, no caldo, é utilizado como um indicador do grau de deterioração da cana-de-açúcar (RAVELO et al., 1991c).

Um problema que tem ocorrido, esporadicamente, nas usinas de açúcar e álcool, é a formação de um material polimérico que se acumula nos trocadores de calor da linha de processo. O material é corriqueiramente denominado de "canjica", devido à similaridade em formato, tamanho e consistência com a canjica, um produto alimentício derivado do milho.

O objetivo deste trabalho foi o de caracterizar quimicamente as "canjicas" coletadas em diferentes usinas da região de Piracicaba/SP, durante as safras de 1993 e 1994, anos em que a formação delas foi mais frequente. A partir de bactérias produtoras de gomas isoladas da cana-de-açúcar, estudaram-se os fatores que poderiam influenciar a precipitação dessas gomas, na forma de "canjica", e tentou-se relacionar as gomas produzidas com o mecanismo da floculação de leveduras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No Brasil, quatro milhões de hectares são cultivados com cana-de-açúcar, sendo que aproximadamente 70% da cana produzida é utilizada para a produção de álcool (OLIVEIRA et al., 1995).

A cana-de-açúcar que não é processada imediatamente após a colheita, sofre degradação por diversos mecanismos e é classificada como cana deteriorada. Os compostos detectados, em cana deteriorada e em cana fresca, foram comparados a fim de monitorar as condições de colheita da cana (BRUIJIN, 1966). Foi constatado que a presença de ácidos voláteis, álcool, ácidos orgânicos não voláteis, aminoácidos e o teor de polissacarídeos são indicadores de deterioração. Foi notado ainda, que durante o processo de deterioração, a quantidade de amido decresce enquanto que a de outros polissacarídeos aumenta. O teor de polissacarídeos solúveis foi considerado como o melhor indicador de deterioração da cana.

2.1. POLISSACARÍDEOS NA CANA-DE-AÇÚCAR

Diversos tipos de polissacarídeos são encontrados na cana-de-açúcar. Os polissacarídeos são todos de cadeia longa, formados por unidades de carboidratos, sendo que as ligações entre as unidades, podem variar de lineares a ramificadas.

A presença de polissacarídeos, também denominados gomas, causa problemas nas operações da indústria da cana-de-açúcar, por aumentar a viscosidade do caldo e poder causar entupimentos nas tubulações, nas centrífugas, nas peneiras e nos trocadores de calor (EGAN, 1966; TILBURY, 1975). O alto teor de oligossacarídeos e polissacarídeos no caldo consiste é forte indicação da deterioração da cana-de-açúcar (RAVELO et al., 1991c).

Quando se discute a respeito de polissacarídeos na indústria de cana-de-açúcar, deve-se levar em consideração a existência de polissacarídeos endógenos, ou seja, aqueles que estão presentes no próprio vegetal, como por exemplo, o amido e a celulose, ambos insolúveis em água (KITCHEN, 1988). Durante a moagem da cana, os grânulos de amido são, normalmente, separados do tecido da planta e carregados junto com o caldo. No caso da produção de açúcar, o efeito do calor e da calagem gelatiniza o grânulo, e o amido solubilizado passa para o caldo clarificado. Como consequência, o amido e outros polissacarídeos de alta massa molecular tendem a ser incorporados aos cristais de açúcar cru, que são posteriormente transferidos para a refinaria (ALEXANDER & MATIC, 1974).

Outros polissacarídeos podem ser considerados como exógenos, e assume-se, que são produzidos por bactérias sob as mais variadas condições de crescimento (SUTHERLAND, 1985; GANCEL & NOVEL, 1994).

Em 1964, ROBERTS et al. isolaram um polissacarídeo do caldo de cana fresco, em condições que preveniam a inclusão de amido ou formação de dextrana. Este polissacarídeo era

constituído de arabinose, galactose, glicose, manose, xilose e pequena quantidade de ramnose, sendo este heteropolissacarídeo denominado polissacarídeo nativo da cana-de-açúcar. Sua presença mostrou ser dependente da idade e da variedade da cana.

A partir de melaço de cana com alta viscosidade, também foi possível isolar um polissacarídeo contendo os monômeros: glicose, galactose e arabinose na proporção de 3:1:1, com traços de manose e xilose (CREMATA & OROZCO, 1980). A cadeia principal era constituída por unidades de glicose, unidas por ligações 1,3, com a presença de cadeias de galactose em pontos de ramificação, unidas por ligações 1,6 à cadeia principal. A arabinose terminal era unida à galactose por ligação 1,6.

Outro polissacarídeo, isolado a partir de caldo de cana fresco, foi denominado como glicana de Robert (Robert's glucan), e era constituído por 98% de glicose e traços de arabinose, galactose e manose. Esse polímero apresenta estrutura altamente ramificada, similar à da amilopectina e do glicogênio, mas com massa molecular inferior (ROBERTS et al., 1985).

BRUIJIN (1970) isolou a partir da cana-de-açúcar, um polissacarídeo que apresentou similaridades estruturais com a pululana, uma glicana produzida pelo fungo *Aureobasidium pulullans*. As amostras, deste polissacarídeo e da pululana, foram hidrolisadas pela ação da pululanase e de enzimas específicas para ligações 1,6. Da hidrólise da pululana, resultou somente a maltotriose, enquanto que do polissacarídeo da cana produziu-se 49% de maltotriose, 38% de maltotetose e 13% de outros polímeros de glicose unidos por ligações 1,4. Foi demonstrado que a pululana se diferenciava daquele polissacarídeo da cana, e

tratava-se de uma nova glicana que foi denominada sarcarana. A sarcarana foi posteriormente estudada para a caracterização estrutural do polissacarídeo isolado, tanto de cana colhida e armazenada quanto de melão, demonstrando ser uma glicana com 25% de ligações 1,6 e 75% de ligações 1,4 (BLAKE & LITTLEMORE, 1984a; BLAKE & LITTLEMORE, 1984b; BLAKE & CLARKE, 1984a; BLAKE & CLARKE, 1984b). Outros autores também encontraram, em cana deteriorada, um polissacarídeo com considerável proporção de ligações 1,4 e 1,3 (HIDE et al., 1976).

O levano, outro polissacarídeo isolado de cana, melão e sacarose, é produzido pelo *Paenibacillus polymyxa* através da conversão de 46% da frutose presente em polissacarídeo (HAN & WATSON, 1992). Foi demonstrado também, que o *Bacillus circulans* produz levano através da ação da enzima levansacarase, em condições de pH entre 5,0 e 7,0, e a 40°C. Em presença de sacarose, a enzima é extracelular e indutiva (PEREZ-OSGUERA et al., 1996).

COVACEVICH & RICHARDS (1977) isolaram polissacarídeos de cana-de-açúcar não processada, e mostraram que a maioria do material era constituído por dextrana, e por uma pequena quantidade de um outro polissacarídeo, possivelmente, hemicelulose.

2.1.2. DEXTRANA

A denominação dextrana foi primeiramente utilizada, em 1874 por SCHEIBLER (citado por ALSOP, 1983), o qual determinou que um misterioso espessamento em caldos de cana e de beterraba era causado por um carboidrato de fórmula empírica ($C_6H_{10}O_5$), com rotação óptica positiva. Pasteur, em 1861, já havia mostrado que o aumento da viscosidade desses caldos, era causado por ação microbiana; em 1878, Van Tieghen atribuiu tal ação à bactéria *Leuconostoc mesenteroides* (citado por ALSOP, 1983).

O termo dextrana é utilizado para designar uma grande classe de polissacarídeos bacterianos extracelulares, composto quase exclusivamente por unidades monoméricas de α -D-glicopirranose, unidas principalmente por ligações 1,6 (ALSOP, 1983). Tais estruturas variam em relação à quantidade de ramificação e têm sido obtidas, através de um número elevado de microrganismos. É comum referir-se à dextrana, quando não existe uma definição clara da origem bacteriana ou quando as propriedades químicas do polissacarídeo, não são conhecidas.

A dextrana é um polissacarídeo que, embora associada com a cana-de-açúcar, não está presente em cana saudável. É produzida na cana deteriorada ou em condições higiênicas não apropriadas. Estruturalmente, é um polissacarídeo formado por glicose, no qual a cadeia principal é unida por ligações 1,6, contendo ligações 1,4 e 1,3 nos pontos de ramificação da cadeia (MURPHY & WHISTLER, 1973). A dextrana é definida como uma glicana que tem pelo menos 50-60% de ligações do tipo 1,6 (CLARKE et al., 1980). Em geral, é solúvel em água, insolúvel em

álcool, altamente dextrorrotatória, com rotação específica de +200° e apresenta alta massa molecular, variando de 100.000 a 10.000.000 Daltons (Da) (IMRIE & TILBURY, 1972).

A presença de dextrana, durante o processamento de açúcar, aumenta a viscosidade do caldo, decresce a taxa de cristalização da sacarose, torna o processo de clarificação deficiente e provoca a perda de sacarose no melaço final, além de outras consequências (KENERY et al., 1967; LEONARD & RICHARDS, 1969).

As principais bactérias produtoras de dextrana pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (HEHRE, 1956; SIMON & MEUNIER, 1970; SIDEBOTHAM, 1974). Dentro do gênero *Leuconostoc*, as principais espécies são a *L. mesenteroides* e *L. dextransum* (EVANS & HIBBERT, 1946). Todas as espécies, entretanto, possuem a característica comum de apresentar a sacarose como único carboidrato adequado para produção do polissacarídeo, embora a dextrana já tenha sido sintetizada, a partir de outros carboidratos, por outros microrganismos (BARKER et al., 1958). YAMAMOTO et al. (1993) caracterizaram um polissacarídeo produzido por *Acetobacter capsulatus*, a partir de amido solúvel, e o identificaram como uma glicana, com estrutura similar à dextrana produzida por *L. mesenteroides*.

A capacidade das bactérias do ácido láctico de produzir polissacarídeos tem sido demonstrada (CERNING, 1990). Segundo De VOS (1996), vários polissacarídeos, entre eles a dextrana ou glicana, são produzidos extracelularmente, a partir da sacarose, através da secreção da enzima dextransacarase.

Trabalhos com dextrana tem sido feitos especialmente com linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*, e em particular com a linhagem B512F, a qual produz dextrana com 95% de ligações 1,6 e 5% de ligações 1,3. Comumente, tal linhagem é utilizada para a produção comercial de dextrana nos Estados Unidos e na Europa (JEANES, 1977).

SAPPORO-BREWERIES (1991) desenvolveu um método para a produção de dextrana, através de cultivo de uma linhagem de *Lactobacillus confusus*. A dextrana produzida era solúvel em água, insolúvel em álcool e composta por unidades de glicose, unidas por ligações do tipo 1,6. O polímero também era obtido através do contato da sacarose com a enzima produzida pela mesma linhagem.

A aplicação da dextrana tem sido observada em diferentes situações: estabilização de agregados de solo (NOVAK et al., 1955) e desfloculantes em produtos de papel e em alimentos (MORRIS, 1992; ROLLER & DEA, 1992; STEPHEN, 1995).

2.2. MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A CANA-DE-AÇÚCAR

Embora tecidos vivos de plantas não sejam considerados uma reserva natural de lactobacilos, grande variedade deles estão frequentemente presentes nesse material. Entre eles, pode-se citar *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. bavaricus*, *L. curvatus*, *L. hilgardii*, *L. casei* subsp. *ramnosus*, *L. viridescens* e *L. fermentum* (BOTAZZI, 1988). Segundo VISSER et al. (1986), esses lactobacilos exercem ação antagônica em relação a microrganismos fitopatogênicos, em

particular *Xanthomonas campestris*, *Erwinia carotovora* e *Pseudomonas syringae*, agindo como um controlador biológico

Uma vez extraído do seu meio natural, que é o caule, o caldo torna-se vulnerável ao ataque de bactérias e leveduras, constituindo um meio favorável para o desenvolvimento de microrganismos, devido à presença de nutrientes orgânicos e inorgânicos; além de pH, temperatura e atividade de água favoráveis.

Segundo o BOLETIM TÉCNICO DA COPERSUCAR (1983), os equipamentos de extração do caldo de cana são fontes constantes de contaminação microbiana, particularmente por bactérias do ácido láctico. Recomendou-se que a água de lavagem da cana deva ser mantida alcalina, para evitar o aumento significativo da população microbiana.

Muitos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar, quais os microrganismos envolvidos na contaminação do caldo e de linhas de processo. São de PASTEUR, em 1873 (citado por SERRA et al., 1976), os primeiros relatos sobre microrganismos contaminantes na fermentação alcoólica. BEVAN & BOND (1971) isolaram, a partir da cana-de-açúcar, 300 diferentes espécies de bactérias, predominando *Leuconostoc*, leveduras termofílicas e *Bacillus megaterium*. HAN & WATSON (1971), isolaram esporos bacterianos a partir de bagaço, enquanto GANOU et al. (1987) isolaram *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* e *B. sphaericus* em cana-de-açúcar.

Segundo SAINZ et al. (1984), 59% dos microrganismos, isolados e identificados em uma refinaria cubana, foram

constituídos por bactérias. Na Tailândia, a análise de caldo de cana mostrou predominância de *Streptococcus* spp., *Lactobacillus fermentum*, *L. cellobiosus* e *Leuconostoc mesenteroides*, sendo que essas bactérias levaram a uma queda de 0,2 a 0,6% no conteúdo de sacarose, além de produzirem dextrana (SAENG-ON & DAENGSUBHA, 1984). AMORIM & OLIVEIRA (1982) descreveram, como principais contaminantes da fermentação alcoólica, os gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter* (*Aerobacter*), *Streptococcus*, e *Leuconostoc*.

LOPEZ et al. (1988), estudando a população microbiana, em caldo de cana-de-açúcar deteriorada por geadas, encontraram uma variedade de aeróbios e anaeróbios, mesófilos, fungos, leveduras, enterobactérias e bactérias do ácido láctico. Constataram ainda, que a geada acentua o número de microrganismos presentes, com a conseqüente queda na qualidade do caldo para fermentação.

Os danos causados pela baixa temperatura, na colheita, são dependentes da severidade e da duração de exposição ao frio, sendo fortemente influenciados por outras condições como umidade, temperatura obtida depois da geada e pela infecção da cana por bactérias (MORO du BOIL, 1997). A qualidade da cana e a extensão de um processo deteriorativo são avaliados pela acidez do caldo e pela presença de gomas e de álcool. Segundo o autor, uma exposição de meia hora a -4°C causa danos severos à cana, sendo que o nível e extensão da deterioração, dependem muito das condições pós-frio. Em temperaturas entre 10°C e 13°C , é observada a formação de gomas; e entre 21°C e 24°C , a formação de álcool.

Os microrganismos produtores de gomas são, geralmente, encontrados na maioria dos solos, no ar e também na cana-de-açúcar (COOL et al., 1978). Segundo YATES (1996), o índice pluviométrico também afeta a qualidade da cana, principalmente, por alterar a umidade do solo. A contaminação da cana-de-açúcar é possível, desde que haja um dano físico no colmo ocasionado por temporal, por queimada (FOSTER et al., 1980; IRVINE, 1981), por insetos e geadas (SINGH & SINGH, 1975; LEGENDRE et al., 1984). Atrasos entre o período da queimada e da colheita, ou entre a colheita e o processamento, podem criar condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos (KENERY et al., 1967). Um estudo sobre a população microbiana, em caldo de cana danificada por geada, mostrou um aumento marcante no número de microrganismos, e conseqüentemente, na qualidade do caldo utilizado, posteriormente, para a fermentação alcoólica. Verificou-se também, um aumento significativo na proporção de dextrana e de levana presentes, sendo a sacarose utilizada como substrato específico para o crescimento microbiano (LOPEZ et al., 1988).

BEVAN and BOND (1971) analisaram cana verde, cana queimada, cana cortada e preparada, moinho, caldo misto e caldo clarificado. Em todos os materiais foram encontrados *Leuconostoc*, dentre outros microrganismos. Notou-se também, a presença de ácidos orgânicos e polímeros, como a dextrana.

Em 1990, SILVA & CANHOS avaliaram a microbiota bacteriana contaminante do caldo de cana durante o resfriamento em torre. Esses autores verificaram a presença de microbiota predominante, composta por bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (30%), seguindo o gênero *Staphylococcus* (28%), *Leuconostoc* (18%), *Bacillus* (4%) e as Gram-negativas (1%). Dentre

os lactobacilos, as espécies mais encontradas foram *L. fermentum* (33%), *L. confusus* (18%) e *L. viridescens* (11%). Também GALLO (1990), determinando a microbiota bacteriana de mosto e de dornas da fermentação alcoólica, encontrou uma predominância de bactérias Gram-positivas (98,52%). O gênero *Lactobacillus* também foi o mais frequente (59,75%), seguido de *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* e uma minoria pertencente aos grupos das *Enterobacteriaceae* e dos *Pediococcus* e *Streptococcus*.

2.3. MICRORGANISMOS ASSOCIADOS A PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NA CANA-DE-AÇÚCAR

A contaminação da cana-de-açúcar ou do seu caldo, por bactérias dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* produtores de polissacarídeos, representa um decréscimo na recuperação de sacarose, levando assim a perdas econômicas (CLARKE et al., 1980; EGAN, 1983).

Bactérias do gênero *Leuconostoc* são conhecidas, há tempos, como produtoras de gomas ou de substâncias gomosas em caldo de cana, beterraba e outros fluidos que contenham sacarose (EVANS & HIBBERT, 1946). McCLESKEY et al. (1947) mostraram que a espécie mais comumente encontrada nesses substratos foi *L. mesenteroides*, a qual pode ser classificada em quatro tipos, de acordo com características de colônia. Em 1956, JEANES et al. relacionaram o tipo de colônia da bactéria com as propriedades físico-químicas da dextrana.

TILBURY (1971), estudando a linha de processo de açúcar na Jamaica, observou a presença de *Leuconostoc mesenteroides* como organismo deteriorador predominante, tanto em cana cortada manualmente, como em cana queimada ou em colmos inteiros da planta. O crescimento desse microrganismo resultou no aumento do conteúdo de dextrana e de viscosidade do caldo. O autor também demonstrou que o tratamento de caldo misto com dextranase diminui significativamente o conteúdo de dextrana.

Segundo ZEDAN et al. (1983), a contaminação, por bactérias produtoras de dextrana, pode interferir intensamente no processo industrial de produção de açúcar, resultando em grandes perdas econômicas. Os autores isolaram na linha de processo, 54 linhagens produtoras de dextrana.

LUCCA et al. (1992) verificaram que uma ampla variedade de bactérias mesófilas e termófilas obrigatórias, podem colonizar e desenvolver-se em processos de refino de açúcar, causando perdas no produto final. *Leuconostoc* isolado dessa área produziu aproximadamente, 0,1% de ácido láctico e 5,8% de dextrana.

A dextrana é produzida por bactérias, as quais crescem, quase exclusivamente, em meio contendo sacarose. Estas bactérias pertencem aos gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (HEHRE, 1956; SIMON & MEUNIER, 1970; SIDEBOTHAM, 1974). Dentre elas, as bactérias mais comuns envolvidas na formação de dextrana são: *Leuconostoc dextranicum* e *Leuconostoc mesenteroides*. Ambos os microrganismos têm sido identificados em caldos deteriorados e em produtos de refinaria de cana contaminados.

Devido à interferência da dextrana nos processos de manufatura de cana-de-açúcar, alguns métodos têm sido desenvolvidos para a determinação de sua concentração. RIFFER (1983) desenvolveu um método potenciométrico por atividade enzimática de quantificação de dextrana na solução de açúcar. Esse método requer uma pré-separação do amido do caldo, o que limita sua utilidade. LOPEZ et al. (1980) desenvolveram um método para determinação de dextrana em caldo de cana-de-açúcar, pela precipitação do polissacarídeo com etanol a 50%. RAVELO et al. (1991a) utilizaram parâmetros como níveis de polissacarídeos e álcool presentes no caldo, para a determinação do nível de deterioração da cana-de-açúcar. Esses autores mostraram, que a formação desses compostos, são menores em cana verde que em cana cortada ou queimada.

Alguns autores mostraram a produção de outros exopolissacarídeos, além da dextrana, por bactérias lácticas, entre eles os gêneros *Lactobacillus* (GROBBEN et al., 1995) e *Pediococcus* (MANCA DE NADRA & STRASSER-DE SAAD, 1995), ambos sem a necessidade de ter a sacarose como fonte de carbono. DYKES et al. (1995), estudando polissacarídeos produzidos por *Lactobacillus*, concluíram que exopolissacarídeos acrescentam uma série de vantagens para as linhagens que os produzem, dentre elas, a aderência do microrganismo em superfícies. A unidade repetida do exopolissacarídeo, produzido pelo *Streptococcus thermophilus*, é um tetrassacarídeo constituído por galactose e glicose (DOCO et al., 1990), enquanto o exopolissacarídeo produzido pelo *Lactococcus lactis* contém glicose, ramnose e galactose (NAKAJIMA et al., 1992). GIRAFFA (1994) discutiu a aplicação de polissacarídeos, produzidos por bactérias do ácido láctico na indústria do leite, aproveitando-os no processamento de produtos

lácteos. Esses microrganismos também têm sido identificados em caldos deteriorados e em produtos de destilaria contaminados.

O *Leuconostoc mesenteroides* é a bactéria que contém muitas linhagens diferentes envolvidas na produção de exopolissacarídeos. JEANES et al. (1954) caracterizaram e classificaram dextrana produzida por 96 linhagens. Como resultado, verificaram que dextrana com diferentes propriedades foi produzida por 80 diferentes linhagens dessa bactéria. Encontraram ainda que diferentes linhagens bacterianas produzem dextransas distintas, com variável quantidade de ligações do tipo 1,6, o tipo e a porcentagem de ligação nos pontos de ramificação, a massa molecular e os valores de rotação específica. Os autores também verificaram a produção de duas glicanas produzidas a partir da sacarose, as quais puderam ser separadas em duas frações: uma que precipitava a uma concentração de 37 a 38% de etanol e outra que precipitava entre 39 a 40% de etanol.

A solubilidade da dextrana pode variar também com o tipo de linhagem que a produziu, sendo que grande número de ligações 1,6 aumenta a solubilidade do polímero em água, enquanto que grande número de ligações 1,3, diminui a solubilidade desses compostos em meio aquoso (JEANES et al., 1954; SIDEBOTHAM, 1974). Segundo BOURNE et al. (1972), dextrana insolúvel em água atua como precursores de dextrana solúvel, sendo que a dextrana insolúvel representa um complexo entre a dextransacarase e a dextrana solúvel, que após a síntese, é liberada no líquido sobrenadante.

A dextrana é produzida pela ação da enzima microbiana dextransacarase [EC 2.4.1.5, α -(1 \rightarrow 6)-d-glucan:D-frutose 2-glucosyltransferase] pela conversão da sacarose em frutose e dextrana (JEANES, 1977; GREENFIELD & GERONIMOS, 1978). Tal reação é essencialmente irreversível, tendo a frutose como subproduto da síntese da dextrana. JEANES (1966) mostrou que a reação segue um mecanismo de inserção, com a unidade de glicosil da sacarose formando um intermediário covalente com a dextransacarase. Esta unidade é inserida entre a enzima e o final redutor da cadeia de dextrana crescente. Segundo o autor, a dextrana do *L. mesenteroides* é, geralmente, produzida através de fermentação em batelada, sendo que parte do substrato sacarose é utilizado para o crescimento bacteriano e parte convertido em dextrana pela enzima secretada.

Segundo KABOLI & REILLY (1980), a dextransacarase catalisa a produção de dextrana (ou glicana) unida, preferencialmente, por ligações 1,6. Esta catálise ocorre pela transferência de resíduos de glicosil para a cadeia crescente de polímero. Os autores encontraram que o pH ótimo para a atividade enzimática, foi de 5,2 a uma temperatura de 30°C, sendo o cálcio, essencial para a estabilidade da enzima.

A atividade da dextransacarase pode ser medida através da quantidade de frutose liberada. Uma unidade de dextransacarase é definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 mg de sacarose em dextrana, com subsequente liberação de 0,52 mg de frutose (TSUCHIYA et al., 1952). Segundo os autores, trabalhos anteriores mostraram que outros açúcares, como a glicose, frutose e isomaltose, são incapazes de induzir a formação

da enzima adaptativa dextransacarase. Verificaram ainda, que os íons amônio exercem um efeito negativo sobre o microrganismo, e que altas temperaturas acentuam o efeito deletério do pH sobre a enzima, a qual é rapidamente inativada a pH 6,7 mesmo a 25°C.

Dextransacarase de *Leuconostoc mesenteroides* é indutível (KOBAYASHI & MATSUDA, 1974), enquanto que a enzima correspondente de *Streptococcus sanguis* e *S. mutans* é constitutiva, e produzida, portanto, em ausência de sacarose. Foi mostrado, que nas espécies em que a produção da enzima é constitutiva, sua formação estava associada com a fase de crescimento exponencial do microrganismo (ROBYT, 1995). KIM & ROBYT (1996) obtiveram mutantes constitutivos de *L. mesenteroides* através de tratamentos com agentes químicos como etilmetano sulfonato.

LAPPAN & FOGLER (1994) desenvolveram um modelo cinético para *L. mesenteroides* baseado em dados do crescimento em batelada. Desse modo, determinaram que *L. mesenteroides* requer um meio de cultura complexo, que pode ser enriquecido pela adição de extrato de levedura. Segundo os autores, variando a proporção de extrato de levedura e sacarose, pode-se controlar a quantidade de polímero produzido pela célula.

SHEIKH & HORSAIN (1975) estudando a produção de dextrana para fins hospitalares, mostraram como ideal um meio contendo 10% de sacarose comercial e 0,5% de KH_2PO_4 , em pH variando entre 5,5 e 5,8. Neste caso, a fermentação foi completada em 24 horas a 30°C, em condições estacionárias.

Acompanhando a produção de dextrana por *L. mesenteroides*, LANDON et al. (1993) notaram, que após 18 horas de cultivo,

ocorreu um marcante declínio na taxa de crescimento celular e na produção de dextrana e de frutose no meio, o que coincidiu com a quase exaustão da sacarose no meio de cultura.

Segundo PRAT et al. (1987), a frutose liberada para formação de dextrana, durante a reação enzimática, pode ser complexada com íons borato. Tal reação evita o efeito desse acceptor no complexo enzima glicosil, que resulta na síntese de leucrose e isomaltulose como subproduto, aumentando significativamente a produção da dextrana.

ITAYA & YAMAMOTO (1975) purificaram a enzima produzida por *L. mesenteroides* em cultura. Esta purificação se deu, por precipitação com sulfato de amônio sólido em presença de albumina branca de ovo, seguindo-se sucessivos tratamentos com colunas de DEAE-celulose e bio-gel P-150. Foi também demonstrado, que a enzima perde a atividade quando dialisada contra etilenodiaminotetraacetato (EDTA), e que esta é reativada após a adição de íons metálicos, especialmente íons cálcio. A enzima inativada pelo EDTA é instável, sendo facilmente desnaturada de modo irreversível.

WHITESIDE-CARLSON & ROSANO (1951) estudaram o efeito da omissão de vitaminas simples, na produção de ácidos em meios com glicose, frutose e sacarose, e a produção de dextrana a partir da sacarose. Com todos os três carboidratos, o ácido nicotínico, tiamina e ácido pantotênico mostraram-se altamente essenciais para o crescimento, o qual foi medido através da produção de ácidos. Foi mostrada também a importância do ácido nicotínico, ácido pantotênico, valina, treonina, triptofano e histidina para uma produção de teores elevados de dextrana. Os

autores concluíram que não existe correlação entre crescimento, medido através da produção de ácido, e a produção de dextrana. A omissão de cisteína teve pequena influência no crescimento em meio com sacarose, mas foi inibitório em meio contendo os monossacarídeos constituintes. Entre os elementos minerais testados, um requerimento definitivo foi mostrado somente para íons manganês e fosfato.

Evidências mostram que o nitrogênio, na forma de íons amônio, exerce um efeito adverso na produção da enzima dextransacarase (TSUCHUYA et al., 1952). No entanto, altos níveis de nitrogênio e níveis de fosfato entre 0,1 a 2% levam a uma alta produção da enzima. Segundo os autores, o gênero *Leuconostoc*, considerado microaerófilo, mostrou uma maior produção de gomas em culturas sob agitação, que em culturas estacionárias. LANDON & WEBB (1990) produziram dextrana em ambiente livre de células. Uma quantidade suficiente de dextransacarase foi produzida em estágios preliminares, sob condições anaeróbicas, em batelada.

A ação da dextransacarase pode ser medida de duas maneiras: pela quantidade de dextrana sintetizada e pela quantidade de frutose formada (TANRISEVEN & ROBYT, 1993). Os autores não determinaram se a produção da enzima é proporcional à concentração de sacarose. ROBYT & WALSETH (1979) verificaram que a produção de dextransacarase de *Leuconostoc* é estimulada em duas vezes pela adição de 0,005% de cloreto de cálcio.

KOEPSEL & TSUCHIYA (1952) estabeleceram uma faixa ótima de pH para produção de enzima: entre 6,7 e 7,0. Já para a

atividade da enzima, a melhor faixa ficou entre 5,0 e 5,2, valores esses em que a enzima é mais estável. O trabalho demonstrou que pouca dextrana é produzida na fermentação conduzida acima de pH 6,4, uma vez que a enzima é instável em pH 6,7. Em 1981, SAMANIEGO & GONZALES-GAPUD, estudando a produção de dextrana em meio à base de melaço de cana, concluíram que enquanto a produção do polissacarídeo diminuía com o aumento de açúcares redutores no meio, sua produção aumentava com a elevação do teor de sacarose. A máxima produção foi obtida em meio contendo 20% de sacarose em pH 6,0, seguida de incubação por 48 horas a 30°C.

Segundo LAZIC et al. (1993), o máximo de dextrana produzida por *L. mesenteroides* é obtida como resultado de uma alta produção, estabilidade e atividade da dextransacarase, que é conseguida em condições de aerobiose e pH da cultura em 5,5.

Três fatores podem influenciar a produção e atividade da dextransacarase de *Leuconostoc mesenteroides*: a) a fermentação em batelada alimentada, levemente agitada e não aerada, b) o tipo de extrato de levedura presente e c) a presença de CO₂ no meio. A presença de antiespumante à base de silicone afeta a produção da enzima, mas não interfere no crescimento celular (AJONGWEN & BARKER, 1993).

2.5. TIPOS DE DEXTRANA

Segundo ALSOP (1983), dependendo da concentração de etanol necessário para precipitá-las, a dextrana pode ser dividida

em dextrana de alta e de baixa massa molecular (MM). O autor divide as dextranas que precipitam até 48%, como dextrana de alta massa molecular, e as que precipitam em concentrações acima de 48%, como de baixa massa molecular. A ótima concentração de sacarose, para a máxima produção de dextrana de alta massa molecular, foi de 17,9%. Acima desse valor, a adição de açúcar foi acompanhada por uma baixa porcentagem de dextrana produzida. Segundo ROBYT & WALSETH (1979), em concentrações de 2% de sacarose, a conversão se resume quase que completamente a dextrana de alta massa molecular. Os autores, sugeriram então, que em altas concentrações de sacarose e frutose, deve-se verificar a produção de dextrana com massa molecular variável.

Pelo menos dois tipos de dextrana, produzida a partir da sacarose através da enzima dextransacarase, são descritas na literatura: uma mais solúvel em água, chamada de alternana ou fração de dextrana "S", contendo ligações 1,6 e 1,3 de modo alternado (MISAKI et al., 1980); e outro menos solúvel em água, denominada de fração de dextrana "L", com predominância de ligações 1,6 (SEYMOUR et al., 1979). A linhagem *L. mesenteroides* B-742 produziu dois tipos de dextransacarase, formando uma dextrana ramificada com ligação 1,4 e outra com alto grau de resíduos, unidos em ligação 1,3 (DOMAN & ROBYT, 1995). CASTILLO et al. (1993) isolaram três linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* que produzem dextrana altamente insolúvel, com considerável quantidade de ramificações.

SMITH (1970) observou, que a própria parede celular de *L. mesenteroides* B129, possuía a enzima dextransacarase nela incorporada, e que, em presença de sacarose, sintetiza ambos os tipos de dextrana: solúvel e insolúvel. Segundo o autor, uma vez

que a síntese da cadeia do polímero tinha sido completada, a molécula era liberada da parede celular para a solução.

2.6. VISCOSIDADE

Segundo TECANTE et al. (1986), uma solução com dextrana apresenta um comportamento pseudoplástico, especialmente em condições de alta concentração desse polímero. Segundo os autores, o comportamento reológico de uma solução depende da presença de aceptores e também da temperatura em que esta ocorrendo a reação da formação de polímeros. As moléculas aceptoras maltose, frutose e mesmo a dextrana, reduzem a propagação de cadeias curtas, por permitirem que o crescimento da cadeia seja separada do sítio de atividade da enzima e transportada para o acceptor (ROBYT & WALSETH, 1978). Baixas temperaturas, durante a síntese de polímeros, produzem soluções menos viscosas e mais newtonianas, devido à redução de massa molecular de dextrana produzida (TECANTE et al., 1986). CHOPLIN & SABATIE (1986) verificaram, que dextrana produzida em baixas temperaturas, são menos ramificadas e, portanto, mais viscosas.

Tem sido proposto que moléculas individuais de dextrana formam associações estáveis umas com as outras. Segundo SABATIE et al. (1986), esta aglomeração ocorre, inicialmente, através do alinhamento das cadeias de dextrana, seguida de ligações de hidrogênio entre as moléculas, levando a um aumento da viscosidade e comportamento pseudoplástico. Segundo os autores, dextrana produzida a 5°C é mais linear, sugerindo que

existe uma relação, entre as condições de síntese (temperatura) e a estrutura molecular.

A presença de dextrana, no caldo de cana, aumenta a viscosidade, afetando muitos processos de manufatura (MAUCH & FARHOUDI, 1980). O aumento da viscosidade será maior, quanto maior for a massa molecular da dextrana presente, pois a viscosidade é afetada pela estrutura da dextrana. Quanto maior o grau de ramificação, menor será a relação entre massa molecular e viscosidade (GREENFIELD & GERONIMOS, 1978). Em uma solução contendo 65% de sacarose a uma temperatura de 80°C, a presença de 1% dextrana aumentou a viscosidade entre 100 e 130%, enquanto a presença de 3% de dextrana elevou de 250 a 350% (ELGAL, 1982). Segundo McCURDY et al. (1994), a dextrana que mostrou alta solubilidade e um comportamento newtoniano, pode ser observada em soluções contendo concentrações de dextrana menores que 30%.

LANDON et al. (1993), a partir de vários estudos sobre reologia dos meios de fermentação, concluíram que o comportamento reológico, depende muito do tipo de microrganismo cultivado e do tipo de produto excretado pela célula na solução.

Estudos conduzidos por VELJKOVIC et al. (1988) com *L. mesenteroides*, mostraram que o comportamento do meio se altera drasticamente com o passar do tempo, sendo que a solução se torna mais viscosa e não-newtoniana, durante a fase de crescimento celular e síntese de dextrana, mas passa a menos viscosa e mais newtoniana, quando a síntese da dextrana é completada.

2.7. "CANJICA"

A ocorrência da formação da "canjica", durante etapas do processo de industrialização do caldo de cana, não tem sido estudada com a devida atenção nos países que se destacam na produção mundial de açúcar e de álcool. No Brasil, relatos sem grande importância são registrados e relacionam a ocorrência do fenômeno com a presença de *Leuconostoc* (LIMA et. al., 1982). A falta de informações mais precisas pode ser atribuída à ocorrência esporádica do fenômeno, como também pela falta de literatura de referência para o problema.

A literatura mundial cita algumas situações, envolvendo produção de gomas, ocorridas durante o processamento da cana-de-açúcar e que podem estar relacionados com o fenômeno da formação da "canjica" no Brasil. BEVAN & BOND (1971) verificaram a produção de um polímero, denominado como goma "tapyoca-like", e atribuíram tal formação como resultado da associação de linhagens de *Leuconostoc*, de leveduras (*Picchia* ssp ou *Hansenula* ssp.) e pequenos bastonetes não identificados. FARHATULLAH (1982) cita que em uma usina paquistanesa, uma substância gomosa que acreditaram ser dextrana, foi observada em tanques com caldo misto e também em peneiras e calhas. O tratamento do caldo com formalina e hipoclorito de sódio teve um efeito benéfico. ZAHNLEY & SMITH (1995) aventaram a possibilidade de uma glicosiltransferase ser responsável pela produção de uma dextrana insolúvel em meio aquoso, que poderia ser comparada ao fenômeno da ocorrência da "canjica", embora eles não tenham citado nada referente ao Brasil.

Considerando o aspecto característico da “canjica” formada nas usinas de açúcar e álcool, pode-se fazer uma relação com grãos de “kefir”, uma vez que as bactérias lácticas, especialmente os *Lactobacillus*, estão envolvidos nos dois processos. O “kefir” açucarado, uma bebida caseira tradicional na Europa, é preparada através da fermentação de uma solução açucarada, por uma associação de bactérias lácticas e leveduras incrustadas em grãos. Esses grãos podem ser utilizados numerosas vezes, através da troca da solução fermentada por uma solução açucarada fresca (VAYSSIER, 1978). Em 1969, HORISBERGER (citado por PIDOUX et al., 1988) identificou o polímero presente no grão como uma dextrana, que é excretada por associação simbiótica entre *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Análises químicas e estruturais de grãos de “kefir”, caracterizaram-no como possuindo formato irregular, diâmetro variando de poucos milímetros a um centímetro, de coloração esbranquiçada e translúcida. A matriz do grão era formada por dextrana, e os autores sugeriram como responsáveis pela produção do polissacarídeo, o *Lactobacillus casei* subsp. *casei* e o *L. pseudoplantarum* (GALLI et. al., 1995). Além dos lactobacilos, foi encontrado *Leuconostoc* e *Pediococcus* associadas aos grãos. Resultados semelhantes foram obtidos, por ZACCONI et al. (1995), ao estudarem associações de microrganismos utilizados para a produção do mesmo tipo de bebida e cultivados em presença de sacarose. Foi notada a presença de uma microbiota predominante composta de leveduras e de *Lactobacillus hilgardii* e de *L. casei*. Um tratamento do polímero encontrado no grão com dextranase, demonstrou que a dextrana é o principal componente da matriz de polissacarídeo.

MOINAS et al. (1980) analisando a dextrana presente em grão conhecido como "tibi", também utilizado em preparo de bebida alcoólica ácida, a partir de uma solução de sacarose, encontraram a mesma associação simbiótica presente no "kefir", composta por leveduras, *Lactobacillus hilgardii* e *L. casei*. Os grãos apresentavam formato irregular com diâmetro variando de 8 a 10 mm. As amostras estudadas, foram cultivadas por mais de dez anos demonstrando estabilidade na associação microbiana.

Em 1988, PIDOUX et al. conduziram estudos utilizando *Lactobacillus brevis* isolados dos polissacarídeos de grãos de "kefir". O microrganismo foi cultivado em solução contendo sacarose a 6%, durante 48 horas, a 30°C. O polímero produzido mostrou tratar-se de dextrana unida, predominantemente, por ligação do tipo 1,3. O polímero encontrado no grão, contudo, é rico em ligações 1,6. Os autores concluíram que tal diferença se deve as várias linhagens de *Lactobacillus* e leveduras presentes originalmente nos grãos, e que, os diferentes metabólitos liberados no meio de cultura, poderiam influenciar a ação da dextransacarase.

PIDOUX et al. (1990) utilizaram linhagens de *Lactobacillus*, isolados de grãos de "kefir", tanto do tipo homofermentativo como heterofermentativo, e evidenciaram a capacidade de produção de dextrana por esses microrganismos a partir de sacarose, utilizando pH 4,8 e temperatura de 30°C. A formação do polissacarídeo cessou em temperaturas maiores que 40°C.

2.8. CONTROLE DE EXOPOLISSACARÍDEOS NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A grande maioria dos trabalhos sobre o controle de polissacarídeos, durante os processos industriais, enfoca principalmente o controle de dextrana.

Diversos métodos para detecção de dextrana, em caldo de cana, têm sido empregados, dentre eles: (a) a separação dos colóides por precipitação com álcool, (b) por hidrólise fracionada ácida, ou (c) através da detecção de glicose e frutose (SCHNEIDER et al., 1971). Em caldo de cana normal, esses mesmos autores sugeriram valores na faixa de 3 a 46mg/kg de dextrana como referência. GREENFIELD & GERONIMOS (1978) desenvolveram um método, no qual, após a adição da enzima dextranase ao caldo, verifica-se a presença de dextrana através da mudança na viscosidade da amostra. Segundo KEMP (1983), a determinação da presença de dextrana facilitaria decisões sobre quando adicionar dextranase durante o processamento da cana-de-açúcar.

Foi demonstrado, que tanto a carbonatação quanto a fosfatação (com ou sem surfactantes catiônicos), são ineficientes para a remoção de dextrana de um caldo (CHOU & WNUKOWSKI, 1980).

Medidas de controle da produção de dextrana incluem diminuição do espaço de tempo entre a colheita e a moagem da cana, e um efetivo emprego de biocidas no moinho, além de limitar o desenvolvimento microbiano, pela constante limpeza e desinfecção dos equipamentos de processo (DAY, 1984).

GUILART et al. (1988) isolaram linhagens de *Penicillium*, que produzem grande quantidade de dextranase, em condições de pH e temperatura adequada, para a remoção de dextrana na indústria de açúcar. GALVEZ et al. (1991), analisando caldo de cana contaminada com dextrana, isolaram microrganismos capazes de crescer em dextrana e produzir dextranase extracelular. 23 linhagens de fungos produtores da enzima foram isolados, sendo que os melhores produtores foram *Penicillium purpurogenum* e *Pailomyces lilacinus*. Foi determinado também, que a dextrana é o melhor indutor para a produção de dextranase. A atividade dessa enzima mostrou-se ótima em pH 5,6, quando aproximadamente 90% da dextrana, foi convertida em isomaltose após 4 horas de reação (MADHU & PRABHU, 1983). A temperatura ideal para ação da dextranase é variável, e a melhor termoestabilidade, foi encontrada por aquela produzidas por bactérias anaeróbicas, isoladas da indústria de açúcar, cultivadas entre 65 a 70°C (WYNTER et al., 1995).

Em 1978, BHATNAGAR & PRABHU estudaram a ação de diversos desinfetantes sobre o desenvolvimento microbiano, e sua aplicação como mecanismo de controle da deterioração do caldo de cana-de-açúcar pela formação de substâncias gomosas. Foi determinado que cloreto de mercúrio, sulfato de cobre, formaldeído, metabissulfito de sódio, dentre outros, a uma concentração de 100 ppm, inibem em 100%, tanto o crescimento de microrganismos como a síntese de dextrana. Já a penicilina mostrou uma maior inibição (60-80%) sobre o crescimento microbiano, mas menor inibição sobre a síntese de dextrana (30-50%). Por outro lado, estudos enzimáticos sobre a dextranase revelaram que a penicilina, a tetraciclina e o cloranfenicol, em

concentrações variando entre 50 e 100 ppm, não exercem efeito sobre a enzima.

GUPTA & PRABHU (1993) estudaram o efeito de agentes químicos em caldo de cana-de-açúcar, sobre o controle da contaminação por linhagens de *Leuconostoc* spp, produtoras de levana e dextrana. Bons resultados foram obtidos, tanto sobre a síntese de dextrana quanto sobre a atividade enzimática celular.

A aplicação como "spray", de um composto constituído por uma mistura de amins sobre a cana-de-açúcar após a colheita, e sua ação inibidora na formação microbiana de oligossacarídeos e polissacarídeos, foi estudada por RAVELO et al. (1991b). Concluiu-se que o produto é eficiente e age por 3 dias, mesmo em concentrações baixas como 10-100 ppm. Uma combinação, de formalina e compostos de sais de amônio quaternário, foi utilizada para controlar microrganismos em usinas de açúcar e conseqüentemente o acúmulo de dextrana no processamento (KEPEC, 1996).

2.9. ANÁLISE ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-MS).

Reação de metilação consiste em uma importante ferramenta para análise estrutural de polissacarídeos. Esse tipo de procedimento vem sendo bastante explorado, com a introdução de microtécnicas para metilação e a subsequente análise por

cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (PAZUR, 1986).

O uso de açúcares metilados para análise de estrutura de ligação tem sido usado há tempos. Durante anos, usou-se extensivamente o método desenvolvido em 1915, por HAWORTH (citado por CARPITA & SHEA, 1990), que utiliza óxido de prata e uma mistura de metilsulfato e hidróxido de sódio.

Uma das primeiras modificações de reconhecida importância ao método de Haworth, foi desenvolvida por KUHN et al. (1955), que utilizaram Ag_2O e CH_3I juntamente com N,N-dimetilformamida. Tal método mostrou superioridade em relação àquele desenvolvido por Haworth. A modificação mais significativa foi introduzida por COREY and CHAYKOVSKY (1962), que utilizaram o metilsulfinilcarbanion, o íon "dimensil", como reagente metilante. ANDERSON and CREE (1966) demonstraram a eficácia desse íon para a obtenção de uma completa metilação.

Atualmente, as análises são feitas através de metilações, mas até o advento de cromatografia gás-líquido, as reações requeriam grandes quantidades de amostra, além de que metilações incompletas eram frequentes, mesmo após contínuas remetilações, muitas vezes, quatro ou cinco vezes (CARPITA & SHEA, 1990).

Segundo HARRIS et al. (1984), vários fatores podem influenciar a recuperação de alditóis acetatos de açúcares metilados. Estes fatores incluem: a submetilação, a hidrólise incompleta, a degradação e a desmetilação durante a hidrólise, a redução e a acetilação incompletas. Além disso, perdas de

componentes voláteis podem ocorrer durante a evaporação dos solventes e também por transferência. Outro problema existente é relacionado à presença de contaminantes nas vidrarias. Esses compostos podem interferir, com os alditóis acetato e alditóis permetilados, levando a erros analíticos (HENRY et al., 1985).

BLAKENEY et al. (1983) desenvolveram um método bastante adequado, de metilação para monossacarídeos, no qual, todas as etapas do processo eram feitas no mesmo tubo, sem transferências e sem etapas de evaporação, minimizando as perdas.

Exopolissacarídeos produzidos por diferentes lactobacilos têm sido analisados estruturalmente através de técnicas de metilação: *Lactobacillus acidophilus* (ROBIJN et al., 1996a), *Lactobacillus paracasei* 34-1 (ROBIJN et al., 1996b), *Lactobacillus sake* (ROBIJN et al., 1995), *L casei* (MOZZI et al., 1996) e *Lactobacillus helveticus* (ROBIJN et al., 1995; STINGELE et al., 1997). Todas essas espécies mostraram produzir heteropolissacarídeos. Análise estrutural de polissacarídeos produzidos por *Leuconostoc*, também foram realizadas com sucesso, utilizando a mesma técnica (LINDBERG & SVENSSON, 1968; MISAKI et al., 1980).

2.10. FLOCULAÇÃO DE LEVEDURAS E PRESENÇA DE POLÍMEROS

Agentes floclulantes têm sido usados em processamentos industriais para remover resíduos indesejáveis ao processo industrial. Os floclulantes são geralmente divididos em três categorias: (a) inorgânicos, como o sulfato de alumínio; (b) os

orgânicos, como ácidos poliacrílicos e polietileno, e (c) os de ocorrência natural, como microrganismos e alginato de sódio (TOEDA & KURANE, 1991). O polissacarídeo ácido AI-201, composto por glicose, galactose, ácido glucurônico e ácido acético, possui propriedades floculantes.

Dentre os problemas com contaminantes, a floculação da levedura é um dos mais sérios na fermentação industrial de álcool, especialmente devido à redução na produtividade e maior dificuldade de separação da levedura por centrifugação (YOKOYA, 1989; YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991). Estudos em usinas de álcool, tem mostrado que a causa principal da floculação é de origem bacteriana, provocando a separação das leveduras antes do término da fermentação alcoólica, prejudicando assim, a eficácia do processo (SERRA et al., 1976). Já na indústria cervejeira, a floculação de leveduras no final do processo fermentativo, é importante e desejável, pois, possibilita a separação da levedura da cerveja recém-elaborada (PALMIERE et al., 1996; STRATFORD, 1996).

NAKAMURA et al. (1976) isolaram 214 linhagens de microrganismos, entre eles, fungos, bactérias, actinomicetos e leveduras, dos quais 19 produziam substâncias que causavam a floculação de *Saccharomyces cerevisiae*. Tais agentes floculantes precipitavam no meio de cultura, em presença de acetona.

Em 1985, TAKAGI & KADOWAKI encontraram que *Paecilomyces* sp I-1 produzia um agente floculante, ou seja, um polímero composto quase exclusivamente por galactosamina. KURANE et al. (1986) mostraram que *Rhodococcus erythropolis* produziam um tipo de floculante microbiano que floculava, com

eficiência, partículas sólidas em suspensão, dentre elas *Escherichia coli* e leveduras alcoólicas. O floculante mostrou uma ampla atividade, tanto em materiais orgânicos como inorgânicos. Foi observado também que íons catiônicos, como o Ca^{++} , aumentavam significativamente a atividade floculante.

STRAVER et al. (1994), estudando moléculas envolvidas no processo de floculação de *Saccharomyces cerevisiae*, verificaram que um polipeptídeo de 10-kDa poderia representar uma forma de aglutinina. HERRERA & AXCELL (1991) observaram na presença de um heteropolissacarídeo composto por arabinose, galactose, glicose, manose, xilose, ramnose e um açúcar ácido, a indução prematura de floculação de leveduras. FERENCI & LEE (1991), estudando *Escherichia coli*, conseguiram a formação de flocos da bactéria com adição de amido ao meio, quando em condições ótimas de densidade celular, concentração do amido, tempo e pH.

2.11. INFLUÊNCIA DE ÍONS SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE GOMAS

Alguns trabalhos têm sido realizados para verificar a influência de íons sobre gomas, especialmente a gelana. A gelificação de soluções aquosas dessa goma é promovida pela presença de cátions, especialmente os divalentes (KAWAHARA et al., 1996).

Estudos, sobre a estrutura em rede da gelana, e a influência de cátions (em especial o potássio e o cálcio), verificaram trocas completas na estrutura devido a zonas de junção, formadas

durante o processo de gelificação, tanto em presença de cátions monovalentes como divalentes (OHTSUKA & WATANABE, 1996). Por outro lado, MIYOSHI et al. (1996) determinaram, que o comportamento viscoelástico da solução da goma gelana é mais influenciado pelos cátions divalentes do que os monovalentes.

JUMING et al. (1996) verificaram que géis de gelana formados em presença de cátions monovalentes, são mais fracos que os formados na presença de divalentes. Determinaram também a existência de uma concentração ótima, acima da qual, a força do gel diminui. Os mesmos autores, em 1995, haviam determinado que a presença de número de cátions insuficientes leva à formação de gel fraco e estendível, e que tais diferenças entre força de géis podem ser atribuídas a zonas de junção do polímero em relação ao tamanho do cátion. WATASE & NISHINARI (1993) observaram que os íons potássio tornam as gelanas termorresistentes.

Estudos, sobre ação de cátions divalentes sobre as propriedades reológicas de uma solução de alginato, mostraram que a adição de cálcio, em diferentes concentrações, produz uma transição do tipo sol-gel (ZHENG et al., 1994). ZHANG et al. (1994) mostraram que a especificidade do cátion exerce grande influência sobre carragenas sulfatadas e as não sulfatadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAS DE “CANJICA”

As amostras de “canjica” foram coletadas nos trocadores de calor das plantas de processamento em usinas de açúcar e álcool da região de Piracicaba, SP, durante a safra de 1994. As amostras de “canjica” foram lavadas com água corrente para a retirada de resíduos provenientes das usinas, e mantidas em geladeira (4°C) até a chegada em laboratório, quando então foram secas a 45°C e guardadas em dessecador até o momento das análises.

3.2. ANÁLISE DA “CANJICA”

A caracterização química da “canjica” envolveu análise de cinzas e umidade, análise elementar (carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre), monômeros, ligação química entre os monômeros, análise qualitativa e quantitativa dos íons metálicos agregados ao polímero através de fluorescência de raios X, espectroscopia no infravermelho e difração de raios X.

3.2.1. Cinzas e umidade

As “canjicas” foram analisadas quanto ao teor de cinzas e umidade segundo metodologia descrita pela AOAC (1995) Para verificação de umidade, as “canjicas” obtidas no item 3.1 foram

trituras e colocadas em estufa a vácuo, a 80°C, até que se obtivesse massa constante da amostra. Para análise de cinzas as amostras foram queimadas em mufla à 550°C.

3.2.2. Análise elementar

As “canjicas” secas (105°C até massa constante) foram analisadas quanto à composição elementar em um analisador elementar Perkin Elmer, modelo PE-2400.

3.2.3. Análise de íons metálicos

As amostras de “canjica” secas (105°C) foram analisadas qualitativa e quantitativamente quanto ao conteúdo de metais, através da técnica de fluorescência de raios X. O equipamento utilizado foi o Fluorescência de Raios-X modelo Spectrace 5000.

3.2.4. Identificação dos monômeros por cromatografia descendente em papel

Para a identificação dos monômeros, foi seguida a metodologia descrita por CHAPLIN & KENNEDY (1986) envolvendo as etapas de hidrólise ácida do polissacarídeo e a identificação preliminar dos produtos da hidrólise, através de cromatografia descendente em papel.

3.2.4.1. Hidrólise do polissacarídeo

5 mg do polissacarídeo foram dissolvidos em 0,25 mL de HCl 2 mol L⁻¹, aquecido em tubos selados a 100°C por 5 horas. As amostras hidrolisadas foram centrifugadas a 8.500 g durante 10 minutos e então aplicadas no papel juntamente com os padrões de pentoses (ribose, arabinose e xilose) e hexoses (glicose, manose, galactose e frutose).

3.2.4.2. Identificação dos produtos da hidrólise total

As amostras preparadas no ítem 3.2.4.1 foram aplicadas em papel mantendo um espaço de 2 cm entre cada aplicação. O sistema de solventes empregado foi piridina:butanol:água (4:6:3, v/v). Foi utilizado papel Whatman nº1 (18 cm de largura x 35 cm de comprimento) e cuba de vidro (20 cm de diâmetro e 35 cm de altura). A cromatografia descendente foi desenvolvida em aproximadamente 18 horas e o papel foi seco e revelado com as seguintes soluções (ASPINALL & JIANG, 1974):

- a) Solução de nitrato de prata em acetona: diluir 1 mL de solução aquosa de nitrato de prata saturada em 250 mL de acetona. Adicionar 5 mL de água até que o nitrato de prata precipitado seja dissolvido completamente.
- b) Solução 0,5 mol L⁻¹ NaOH alcóolico: dissolver 2 g de NaOH em 2 mL de água. Levar a 100 mL com etanol.
- c) Solução de tiosulfato de sódio 10% em água destilada.

Para a revelação do cromatograma, o papel seco foi submergido nessas três soluções previamente preparadas seguindo a ordem apresentada. Após o último reagente, o papel foi seco na capela e as amostras analisadas comparativamente com os padrões, baseados nos valores de fatores de retenção (R_f) determinados pela expressão:

$$R_f = \frac{\text{distância (cm, mm) percorrida pela substância}}{\text{distância (cm, mm) percorrida pela frente da fase móvel}}$$

3.2.5. Análise por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

Antes de ser injetada no CG-MS para análise, a amostra foi submetida a um processo de derivação, que consiste nas seguintes etapas: metilação, hidrólise, redução e acetilação. Os padrões de ligação, amilose e dextrana, também foram submetidas ao mesmo processo de derivação.

Uma das etapas mais importantes da técnica de CG-MS é a produção do íon dimensil de sódio, pois este íon é uma base extremamente forte e eficiente para deslocar os hidrogênios presentes nas moléculas de açúcar. Essa reação vai permitir a formação de polialcóxidos, que então serão metilados ou acetilados, dependendo da posição da ligação glicosídica.

A metilação é um dos mais importantes procedimentos para a análise estrutural de polissacarídeos. Envolve as etapas de

permetilação de todos os grupos hidroxilas livres dos monômeros, seguida da liberação dos monossacarídeos metilados através de hidrólise, após o que, efetua-se as análises qualitativa e quantitativa dos derivados metilados.

A presença das hidroxilas livres dos monossacarídeos parcialmente metilados fornece a posição na qual o resíduo do açúcar foi glicosado. Quando a metilação é completa, o polissacarídeo derivado é hidrolisado em unidades monoméricas que estão metiladas em posições específicas. Tais derivados são reduzidos e acetilados como alditol acetato metilado antes da análise em cromatógrafo a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). A posição da ligação glicosídica corresponde a posição do grupo hidroxila livre no monossacarídeo metilado.

3.2.5.1. Produção do íon dimensil de sódio a partir de hidreto de sódio

A produção desse reagente seguiu procedimento descrito por YAMAMOTO et al. (1993). Em um Erlenmeyer de 100 mL foram colocados 30 mL de dimetil sulfóxido (DMSO)

[previamente seco com 4 a 5 pastilhas de KOH por um período mínimo de 16 horas], em temperatura ambiente, sobre 1,5 g da suspensão de hidreto de sódio em óleo mineral, misturada com 10 mL de éter de petróleo. A reação foi mantida por 2 a 3 horas sob atmosfera de nitrogênio em banho de 50°C. Após o término da reação, pequenas quantidades da solução (4 mL) foram



transferidas para tubos de vidro, seladas sob atmosfera de N₂, e mantidas em freezer até o momento da utilização.

3.2.5.2. Reação de metilação

5 mg do polissacarídeo seco (105°C/24 horas) foram colocados em tubo Corex e adicionados 3 mL de DMSO (preparado conforme item 3.2.5.1). O material foi deixado sob agitação por 20 minutos, em atmosfera constante de N₂, em temperatura ambiente. A seguir, com auxílio de uma seringa de vidro, foram adicionados 3 mL do íon dimensil de sódio previamente preparado de acordo com o item 3.2.5.1. A mistura permaneceu sob agitação e fluxo de N₂ por 6 horas, quando foi adicionado 1 mL de iodeto de metila sob banho de gelo, e deixado em agitação por 16 horas, à temperatura ambiente e em atmosfera normal. Depois foi realizada a extração, adicionando-se 1 mL de água deionizada e 4 mL de clorofórmio. A camada de clorofórmio foi lavada 5 vezes com 3 mL de água deionizada e em seguida completamente seca com fluxo de N₂.

3.2.5.3. Reação de hidrólise

O polissacarídeo metilado no item 3.2.5.2, foi dissolvido em 2 mL de solução de ácido fórmico 90% e aquecido a 100°C, durante 4 horas. Em seguida, efetuou-se a evaporação do solvente

com N₂. O resíduo foi tratado com ácido trifluoracético 2 mol L⁻¹ por 6 horas a 100°C, e novamente evaporado com N₂.

3.2.5.4. Redução dos açúcares parcialmente metilados

1,5 mL de solução composta de 10 mg de boroidreto de sódio, dissolvidos em 10 mL de NH₄OH 0,5 mol L⁻¹, foi adicionado ao resíduo produzido no item 3.2.5.3, o qual permaneceu a 40°C por 1 hora. Em seguida, foi gotejado ácido acético glacial até que cessasse a efervescência. O solvente foi evaporado sob fluxo de N₂. O resíduo foi lavado 5 vezes com 2 mL de metanol e evaporado com N₂.

3.2.5.5. Reação de acetilação

Ao resíduo produzido no item 3.2.5.4, adicionou-se 1 mL de solução composta por anidrido acético e piridina (1:1, v/v), e a solução permaneceu em temperatura ambiente por 18 horas.

A seguir, foi adicionado 2 mL de tolueno e evaporado sob fluxo de nitrogênio. Ao resíduo, foi acrescentado 5 mL de diclorometano e a solução lavada 3 vezes com 1 mL de água. O solvente foi totalmente evaporado com nitrogênio e a amostra mantida em freezer, até o momento da análise.

3.2.5.6. Condições de análise em CG-MS

A amostra seca foi dissolvida em diclorometano e analisada em um equipamento CG-MS HP, modelo 5988 A, nas seguintes condições: energia dos elétrons de 70eV, temperatura da coluna a 130°C, por 5 minutos até 300°C, com aumento de 7°C por minuto, temperatura do injetor e detector de 250°C e 280°C respectivamente, gás de arraste: hélio, e volume de injeção de 1 μ L.

3.2.6. Análise por espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho foi utilizada a fim de verificar a presença de determinados grupos funcionais presentes na amostra de "canjica" e compará-lo com o padrão dextrana.

Para a obtenção dos espectros de infravermelho das amostras foram preparadas pastilhas de KBr da seguinte maneira: 100 mg de KBr seco foram adicionados a 2-3 mg da amostra, trituras em almofariz, homogeneizadas e prensadas.

As pastilhas foram imediatamente analisadas em um espectrofotômetro de infra-vermelho Perkin Elmer, modelo FT-IR 1605. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4.000 a 500 cm^{-1}

3.2.7. Difração de raios X

A técnica de difração de Raio X permite a identificação de materiais presentes na amostra quanto às suas características cristalinas.

Amostras de “canjica” secas (105°C até peso constante) e de padrão de dextrana foram analisadas diretamente em Difratorômetro de Raio X Rigaku com goniômetro horizontal, feixe de 30Kv e 20mA, colimador de $K_{\alpha}Cu$ e filtro K_{β} .

3.2.8. Análise microscópica das “canjica”

As “canjicas” recém coletadas nas usinas foram montadas à fresco em lâminas e coradas com corante azul de toluidina. Para as análises utilizou-se o microscópio óptico JENAVAL ZEISS e filme de 100 ASA. O objetivo dessa técnica foi verificar a existência de microrganismos associados à “canjica”.

3.3. MEIOS DE CULTURA

A composição dos meios de cultura utilizados para o crescimento e teste com microrganismos foram:

3.3.1. Meio Cana 11 (UENO, 1992)

rapadura	10 g/L
triptona	5 g/L
peptona	5 g/L
fosfato ácido de potássio.....	1 g/L
sulfato de amônio.....	1 g/L
citrato de amônio	2 g/L

3.3.2. Meio base sacarose (JEANES et al., 1955).

triptona.....	2,5 g/L
fosfato ácido de potássio.....	5,0 g/L
sacarose	70,0 g/L
extrato de levedura.....	5,0 g/L

3.3.3. Meio base glicose - modificado do meio base sacarose (descrito em 3.3.2) (JEANES et al., 1955), substituindo a sacarose por glicose na mesma concentração.

3.3.4. Man Rogosa & Sharpe (MRS)

peptona	10,0 g/L
Lab-Lemco Powder	8,0 g/L
extrato de levedura.....	4,0 g/L
glicose	20,0 g/L
fosfato de potássio	2,0 g/L

acetato dissódico.....	5,0 g/L
tri-amônio citrato	2,0 g/L
sulfato de magnésio.7 H ₂ O	0,2 g/L
sulfato de manganês.4 H ₂ O.....	0,05 g/L
tween 80	1,0 mL
pH 6,2 ± 0,2	

3.4. Isolamento de microrganismos produtores de gomas a partir de caldo de cana-de-açúcar

O meio utilizado para o isolamento de microrganismos produtores de gomas foi o próprio caldo de cana moído e enriquecido com nutrientes do meio cana 11 (com exceção do açúcar) e adicionado de 0,01% de actidiona. Em 50 mL de caldo de cana estéril e enriquecido foram inoculados 0,5 mL de caldo de cana fresco, isto é, colhido e moído no mesmo dia. Foram feitas diluições seriadas em mais dois Erlenmeyers contendo 50 mL do mesmo meio. Os frascos foram incubados durante 36 horas a 23°C, quando foi verificado se houve espessamento dos meios de cultura. Os frascos que apresentaram tal resultado foram considerados positivos para bactérias produtoras de goma, e a partir deles foi feito o isolamento das culturas através de técnica de esgotamento em placa em meio cana 11 sólido. As colônias que apresentaram formação de goma foram recuperadas e para evitar produção excessiva de goma, mantidas em tubos com meio sólido, base sacarose com 2% de sacarose.

3.5. Seleção da temperatura de incubação para máxima produção e viscosidade

Frascos Erlenmeyers contendo 50 mL de meio base sacarose foram inoculados com as culturas produtoras de gomas isoladas, e mantidos à temperaturas de 23°C e 30°C por 48 horas. Após o período de incubação, amostras do caldo com crescimento foram avaliados quanto à viscosidade aparente em viscosímetro Brookfield modelo DV-III.

3.6. Seleção das culturas quanto a produção de gomas a partir da sacarose

As culturas isoladas foram inoculadas em ambos os meios, base sacarose e base glicose, e incubadas durante 48 horas a 23°C. Em seguida foram centrifugadas, para separação de células bacterianas, a 8500g (9000 rpm), 4°C, durante 20 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado álcool etílico (concentração final de 70%), para verificar em qual dos açúcares houve produção de gomas.

3.7. Preparo das gomas de origem bacteriana

Após incubação em meio base sacarose a 23°C durante 48 horas, ou até que fosse notado o espessamento do meio de cultura, este foi centrifugado a 8500g, a 4°C durante 20 minutos, para

separação das células bacterianas. Os sobrenadantes foram colocados em sacos de diálise e dialisados contra polietilenoglicol MM 8000. A água de diálise contendo polietilenoglicol foi trocada até que a goma concentrada dentro do saco de diálise estivesse clara. A goma foi liofilizada em condições apropriadas e mantida em dessecador até o momento das análises.

3.8. Detecção de culturas produtoras de gomas que precipitam em diferentes concentrações de álcool

Para este teste foi empregada metodologia descrita no item 3.6., utilizando somente a sacarose como fonte de carbono. Foi adicionado álcool de modo que se obtivesse concentrações finais crescentes (5%, 10%, 20%, 50% e 70%). Amostras precipitadas nas diferentes concentrações finais de álcool foram coletadas e secas a 45°C.

3.9. Análise de massa molecular das gomas produzidas pelas bactérias isoladas

Para a análise de massa molecular utilizou-se a técnica de GPC (cromatografia de permeação em gel). As amostras de gomas foram dissolvidas em água deionizada e analisadas em um cromatógrafo de permeação em gel, marca Waters. As colunas utilizadas foram Styragel HT 3, HT4 e HT 5, da Waters. Condições

de análise: fase móvel: água, vazão: 0,8 mL min⁻¹ , temperatura interna do detector e das colunas: 40°C, volume injetado: 100 µL. Como padrões de massa molecular, foram utilizadas dextranas purificadas (marca Sigma) com diferentes massas moleculares.

3.10. Identificação das culturas isoladas

As culturas reisoladas e selecionadas foram caracterizadas inicialmente quanto à morfologia, Gram, reações de catalase e benzidina. As culturas Gram positiva, que apresentaram reações negativas para os testes de catalase e de benzidina, passaram por caracterização fisiológica quanto ao crescimento em diferentes condições segundo (AXELSSON, 1993): temperaturas de 10°C e 45°C; pH 4,4 e 9,6; concentração de NaCl de 6,5% e 18%, e verificação de metabolismo homofermentativo ou heterofermentativo, através da produção de gás a partir da glicose.

Todos os testes foram conduzidos em meio MRS líquido e incubados a 30°C. Para a verificação da produção de CO₂ a partir da glicose, a cultura foi inoculada em caldo MRS em tubos de ensaio fechados com tampão de algodão. Estes tubos foram colocados dentro de outro tubo maior, de rosca, contendo uma solução de borato de sódio 10% e vedados completamente com filme "teflon". O resultado positivo era verificado pela precipitação do borato na superfície da solução.

3.11. Influência das condições climáticas sobre a formação da “canjica”

Os dados sobre condições climáticas durante os anos de 1992 a 1997 (precipitação pluviométrica total mensal, umidade relativa média, dias de chuva, temperatura mínima média e temperatura máxima média) foram obtidos junto ao Departamento de Física e Meteorologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ. Os dados foram analisados seguindo o modelo estatístico (1) e empregando o teste de Student-Newman-Keuls.

Modelo estatístico (1):

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + M_j + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

Y_{ijk} = parâmetro avaliado no j étimo mês do i étimo ano;

μ = média geral da característica;

A_i = efeito fixo do i étimo ano ($i=92, 93, 94, \dots, 97$);

M_j = efeito fixo do j étimo mês ($j= 1, 2, 3, \dots, 12$);

e_{ijk} = erro aleatório.

3.12. Teste de influência de íons metálicos sobre a viscosidade aparente das gomas

Para este teste fez-se uso dos cátions encontrados em maiores concentrações nas “canjica” segundo análise de fluorescência de raios X (item 3.2.3). Soluções em água deionizada, contendo cátions monovalentes, divalentes e

trivalentes na forma de cloretos e em concentrações variáveis entre 5mmol L^{-1} a 140mmol L^{-1} , foram empregadas para dissolver gomas liofilizadas em concentrações final de 1,3%. Para o teste com cálcio, foram realizados experimentos utilizando-o também na forma de óxido de cálcio.

As gomas liofilizadas utilizadas foram as produzidas no ítem 3.7, selecionadas pela boa produção e influência na viscosidade aparente. Para os testes foram utilizadas uma mistura de todas as gomas selecionadas.

A viscosidade aparente das amostras e do controle, ou branco (sem adição de íons), foram determinadas em viscosímetro Brookfield modelo DV-III, nas seguintes condições: temperatura de 24°C , haste nº18, rotação 240-250 rpm, variando de 1 em 1.

3.13. Teste de influência de íons metálicos e temperatura sobre a viscosidade aparente das gomas

Esses testes foram conduzidos do mesmo modo que o descrito no item 3.12, mas avaliou-se também a influência do tratamento térmico brando, sobre a viscosidade aparente da solução. A solução de goma, preparada na concentração de cada íon, foi submetida à temperatura de 72°C por 5 minutos, seguido de resfriamento imediato em banho de gelo. A análise de viscosidade foi efetuada do mesmo modo descrito no item 3.12.

3.14. Teste de influência do pH e temperatura sobre a viscosidade aparente das gomas

Este teste foi conduzido com óxido de cálcio, visto que nas usinas de álcool este composto é utilizado como agente alcalinizante do caldo. Uma série de amostras de gomas dissolvidas em água deionizada teve seus pHs ajustados entre 7,0 até 12,0 (intervalo de 0,5) com óxido de cálcio. Somente um valor de pH ácido foi testado, e para o ajuste do pH da solução de goma em 4,0 foi utilizado o ácido fosfórico, por ser este o responsável pela acidez de solos. Após o ajuste dos pHs, as amostras foram submetidas a dois tipos de tratamento térmico: por volta de 100°C durante 15 minutos em banho-maria, e a 121°C por 15 minutos, em autoclave. Após a exposição ao calor, foram feitas avaliações visuais nas amostras para verificar a ocorrência da precipitação das gomas na forma de "canjica". Efetuada essa análise, as amostras foram resfriadas e mantidas a 4°C para acompanhar quaisquer alterações em decorrência da exposição prolongada em baixa temperatura.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ASPECTOS GERAIS DA "CANJICA"

Durante a safra de açúcar e álcool de 1994, em trabalho conjunto com a Copersucar, foram coletadas para análise, nove amostras de "canjica" provenientes de diferentes usinas da região de Piracicaba/SP. Nesse ano, assim como no anterior, 1993, a formação da "canjica" nas usinas alcançou níveis elevados. Nos anos seguintes, observou-se uma significativa queda na ocorrência do fenômeno da formação da "canjica", nas mesmas usinas anteriormente avaliadas, passando a ser esporádica.

Estruturalmente, as "canjicas" apresentavam coloração branca à ligeiramente acinzentada, com diâmetro variando de 1 a 15 mm, sendo encontrados na forma de grãos isolados (FIGURA 2a e 2b) ou aglomerados (FIGURA 2c).

Quando aglomeradas, as "canjicas" apresentavam semelhanças com a canjica de milho, ou com segmentos da superfície do couve-flor. Na forma isolada, apresentavam-se como grãos de arroz cozido e partidos. Os grãos de "canjica" apresentavam insolubilidade em água e certa elasticidade.

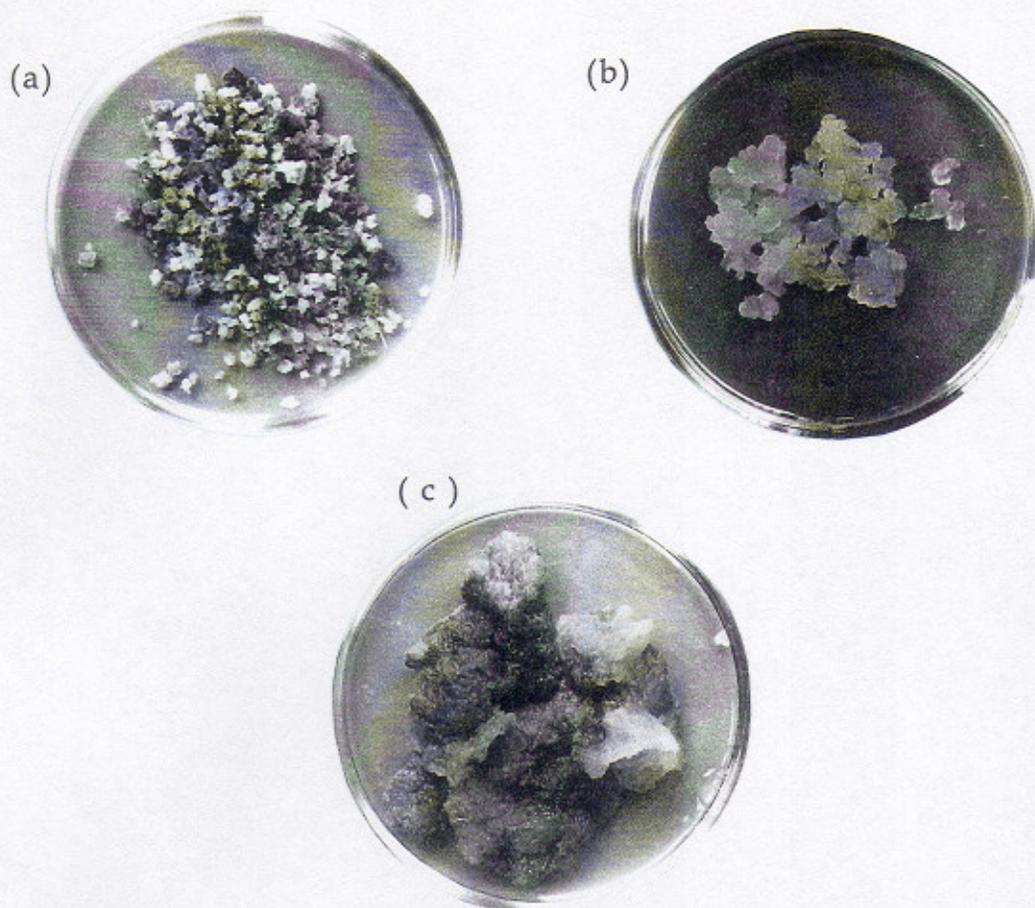


FIGURA 2. Grãos de "canjica" recém-coletadas em processos de fermentação alcoólica mostrando (a) e (b) grãos isolados e (c) grãos aglomerados.

4.2. ANÁLISE QUÍMICA E MICROSCÓPICA DA "CANJICA"

4.2.1. Cinzas, umidade, análise elementar e identificação de monômeros

Os dados apresentados, na TABELA 1, mostram que as nove amostras de "canjicas" isoladas das diferentes usinas são particularmente ricas em carboidratos, tendo a glicose como monômero componente. As amostras apresentam uma certa

semelhança entre si em termos de teor de umidade (com variação de 8 a 10%), e quanto aos teores de carbono (41,0 a 43,6%) e hidrogênio (6,0 a 7,0%); variando quanto aos teores de nitrogênio (0,51 a 1,395) e enxofre (0,04 a 0,13%).

Uma variação maior no teor de cinzas, na faixa de 0,7 a 3% entre as amostras, pode ser atribuída a maior ou menor presença de material inorgânico agregado, proveniente da matéria prima e das plantas de processamento das diferentes usinas analisadas. Além disso, diferentes variedades de cana-de-açúcar podem mostrar diferenças significativas em sua composição química, entre eles, o conteúdo de cinzas presente (SHARMA et al., 1979). Fatores ambientais, incluindo qualidade da água de irrigação, capacidade de troca catiônica presente no solo, fertilizantes aplicados, maturidade da cana e nível de matérias estranhas também levam a alteração no conteúdo de cinzas presentes no caldo de cana-de-açúcar (KIRBY & KINGSTON, 1978).

A presença de nitrogênio juntamente com a do enxofre no polímero podem ser atribuídas ao material protéico, provenientes de microrganismos contaminantes (bactérias e leveduras) presentes no caldo de cana, além de compostos químicos da matéria prima. O nitrogênio e o enxofre ocorrem em compostos orgânicos das células principalmente na forma reduzida como grupos amino e sulfidríla, respectivamente (STANIER et al, 1986). Uma correlação linear muito estreita entre os teores de N e S ($r=0,99$) observada nessas amostras indicam que esses estão essencialmente na forma orgânica e não na forma inorgânica (sulfatos, sulfitos, nitratos, nitritos, amônia, etc). Esses componentes agregados podem fazer parte dos microrganismos responsáveis pela síntese da "canjica". Já a ausência de correlação

linear existente entre o teor de N e as cinzas indica que estes últimos, os minerais, são provenientes dos contaminantes aleatórios incorporados à “canjica” durante a sua formação.

TABELA 1. Composição química das “canjicas” coletadas em diferentes usinas de álcool.

Amostra	Umidade %	Cinzas %	%C	%H	%N	%S	Monômero
1	8,90	0,72	43,0	7,10	0,87	0,08	glicose
2	8,80	2,60	41,4	6,80	0,79	0,08	glicose
3	9,70	0,62	41,6	6,80	0,72	0,07	glicose
4	8,80	0,71	41,6	6,80	0,43	0,04	glicose
5	9,70	3,00	41,0	7,00	0,44	0,04	glicose
6	10,1	0,60	43,4	7,00	0,48	0,05	glicose
7	8,30	0,64	43,6	7,20	0,65	0,06	glicose
8	8,00	1,00	41,3	6,00	1,39	0,13	glicose
9	8,70	0,65	42,0	6,80	0,51	0,05	glicose
média	9,00	1,17	42,1	6,83	0,70	0,07	-----

C= carbono; H= hidrogênio; N = nitrogênio; S= enxofre

4.2.2. Análise de íons metálicos

Na TABELA 2 pode-se verificar o conteúdo de íons metálicos presentes nas amostras de “canjica”, evidenciando a existência de teores variáveis dos diferentes metais em relação a cada amostra de “canjica”. As variações acentuadas nos teores de metais podem ser atribuídas a variedades genéticas de cana, bem como ao tipo de solo (SAI et al., 1995). Outros autores relacionam tais variações a incorporação constante de metais ao caldo de cana

que ocorre na planta de processamento, como resultado da calagem da água de lavagem e dos equipamentos utilizados no processo, que podem acontecer em pequenas, mas em variáveis quantidades (FERNANDEZ et al., 1993). Além disso, segundo KUMAR et al. (1989), a composição química da cana-de-açúcar também varia de acordo com a qualidade da cana. Notaram ainda que os teores de P^{+3} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cu^{+3} e K^{+} diminuíram, enquanto que os teores de Na^{+} , Ca^{+2} , Mg^{+2} e Fe^{+3} aumentaram no caldo de cana queimada.

TABELA 2. Conteúdo de íons metálicos (%) na "canjica" obtido por fluorescência de raios X.

Canjica	Al	Si	P	Cl	K	Ca	Ti	Mn	Fe
1	0,44	0,44	0,17	0,02	0,01	0,09	0,01	0,00	0,09
2	0,85	0,26	0,14	0,03	0,04	0,09	0,02	0,01	1,19
3	1,05	0,06	0,13	0,02	0,01	0,10	0,01	0,00	0,05
4	0,87	0,07	0,11	0,02	0,08	0,11	0,01	0,02	0,05
5	0,46	1,72	0,09	0,02	0,02	0,09	0,08	0,01	0,41
6	0,89	0,11	0,10	0,04	0,06	0,16	0,00	0,01	0,06
7	0,97	0,16	0,12	0,05	0,04	0,17	0,01	0,00	0,16
8	0,81	0,08	0,26	0,03	0,06	0,18	0,00	0,01	0,06
9	0,82	0,03	0,18	0,17	0,34	0,69	0,00	0,03	0,16
média	0,79	0,32	0,15	0,04	0,07	0,19	0,01	0,01	0,25

Diferenças existentes entre as amostras de "canjica" podem também ser atribuídas ao tipo de caldo de cana no qual elas foram coletadas, uma vez que segundo SHARMA & GUPTA (1969), grandes diferenças entre teores de elementos químicos e conteúdos de cinzas foram observadas, por ocasião de análises realizadas em plantas de cana-de-açúcar que se encontravam em diferentes estágios de maturação.

4.2.3. Espectroscopia no infravermelho

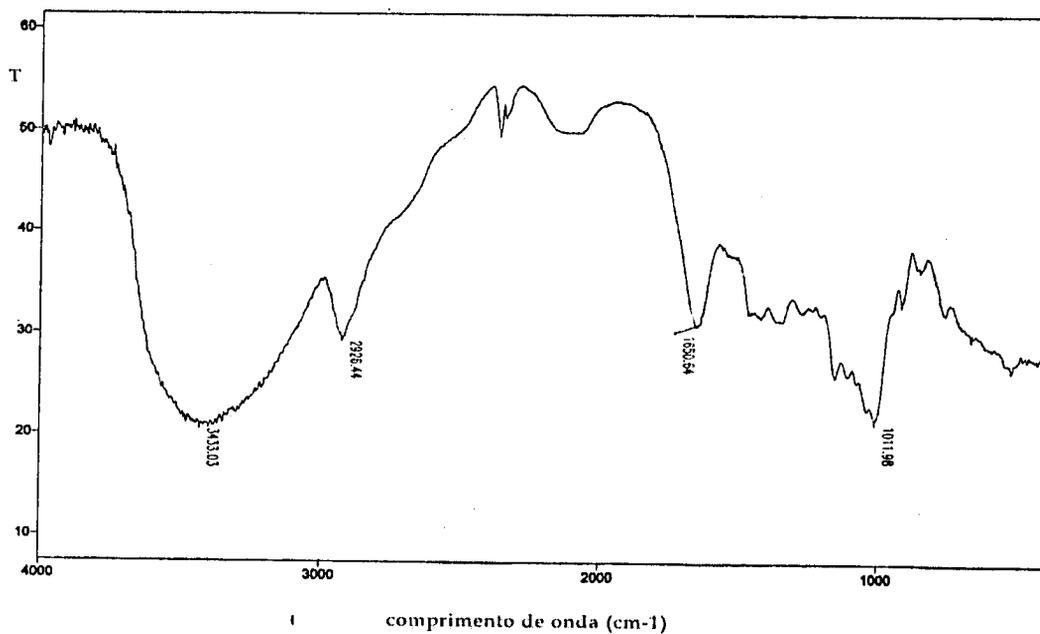
A cromatografia descendente em papel para a análise da composição de açúcar presente na "canjica", mostrou a presença de glicose (TABELA 1). Tal resultado sugeriu a presença de dextrana como polímero componente da "canjica", embora essa, ao contrário da dextrana, mostrasse insolubilidade no meio aquoso do caldo de cana.

Analisando as "canjicas" e comparando-as com a dextrana através de espectroscopia no infravermelho, verificou-se tratar do mesmo polímero (FIGURA 3). Nos espectros de infravermelho, as posições dos picos são expressas em comprimentos de onda ou em frequências. A frequência de absorção de uma vibração fundamental é determinada principalmente pelas massas dos átomos em vibração e pela intensidade da força de ligação entre ambos. Sendo assim, os diversos grupos funcionais contidos numa molécula absorvem em ondas diferentes (COLLINS, 1973). Nos espectros mostrados na FIGURA 3a ("canjica") e FIGURA 3b (dextrana) e comparados com a literatura (NAKANISHI & SOLOMON, 1977), observam-se respectivamente praticamente as mesmas vibrações de estiramento da ligação C-H (em 2926,44 e 2924,97 cm^{-1}), ligação C-O (em 1011,98 e 1011,43 cm^{-1}), sendo que em 3433,03 e 3440,35 cm^{-1} evidencia-se a presença de O-H, caracterizando a presença de dextrana na "canjica".

Como consequência da complexidade dos espectros de infravermelho se torna altamente improvável que dois compostos diferentes apresentem espectros idênticos, sendo portanto, um

método seguro de identificação (NAKANISHI & SOLOMON, 1977).

(a)



(b)

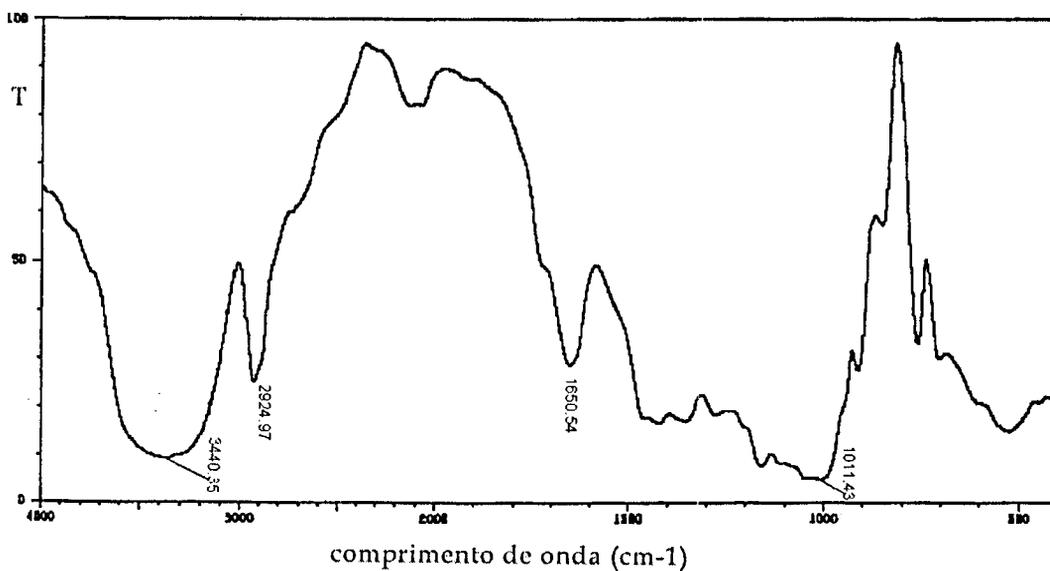


FIGURA 3. Espectros de infravermelho da (a) "canjica" e de (b) um padrão de dextrana

4.2.4. Cromatografia à gas acoplada a espectrometria de massas (CG-MS)

O resultado obtido da espectroscopia de infravermelho além de evidenciar a presença de dextrana como elemento básico das "canjicas", também sugeriu um particular arranjo estrutural das glicoses, o que seria o fator determinante da insolubilidade desse material. Segundo a literatura, (JEANES et al., 1954; SIDEBOTHAM, 1974), a solubilidade de polímeros varia, entre outros motivos, com o tipo de linhagem que os produziu, sendo que, grandes conteúdos de ligação 1,6 contribuem para o aumento da solubilidade em água.

Fez-se necessário, portanto, a realização de uma análise estrutural do polímero. Para isso, foram realizadas análises de CG-MS, empregando-se nelas padrões de ligações 1,4 e ligações 1,6, correspondendo respectivamente aos compostos amilose e dextrana (contendo 95% de ligações do tipo 1,6). Em condições experimentais idênticas, foram analisados por cromatografia gasosa, ambos os padrões de ligações glicosídicas bem como as amostras de "canjica". O padrão de ligação 1,4 foi obtido com um tempo de retenção de 18,093 minutos (FIGURA 4a), enquanto para o padrão 1,6, o tempo de retenção foi de 18,394 minutos. (FIGURA 4b). As amostras de "canjicas", em idênticas condições cromatográficas, apresentou o maior pico com tempo de retenção em 18,241 minutos (FIGURA 4c).

Comparando-se os espectros de massa referentes aos sinais obtidos para os padrões (FIGURA 5) com os disponíveis na literatura (McLAFFERTY & STAUFFER, 1989), concluiu-se que os

padrões de ligações 1,4 (FIGURA 5a) e 1,6 (FIGURA 5b), indicaram respectivamente a presença dos compostos 1,4,5-tri-O-acetil-2,3,6-tri-O-metilglucitol e 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metilglucitol. Pode-se observar também que o espectro de massa da "canjica" (FIGURA 5c) é quase idêntico ao padrão mostrado na FIGURA 5b, e que determina a presença de 1,5,6-tri-O-acetil-2,3,4-tri-O-metilglucitol.

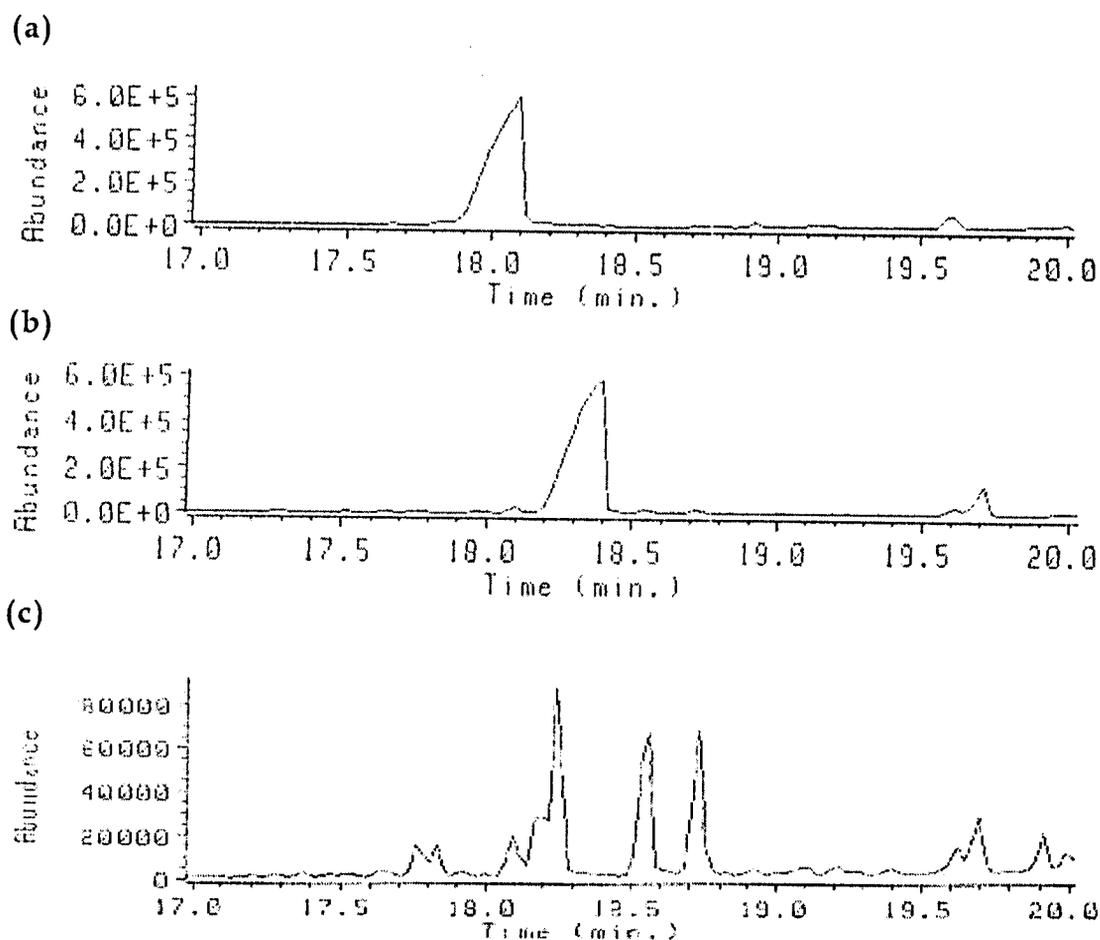


FIGURA 4. Cromatogramas dos alditóis acetatos parcialmente metilados derivados de: (a) padrão 1,4; (b) padrão 1,6 e (c) "canjica". Condições cromatográficas: gás de arraste hélio; volume de injeção 1 μ L; coluna Ultra 2 HP; temperatura da coluna 130°C/5 minutos até 300°C com aumento de 7°C/minuto; temperatura do injetor e detector de 250°C e 280°C, respectivamente.

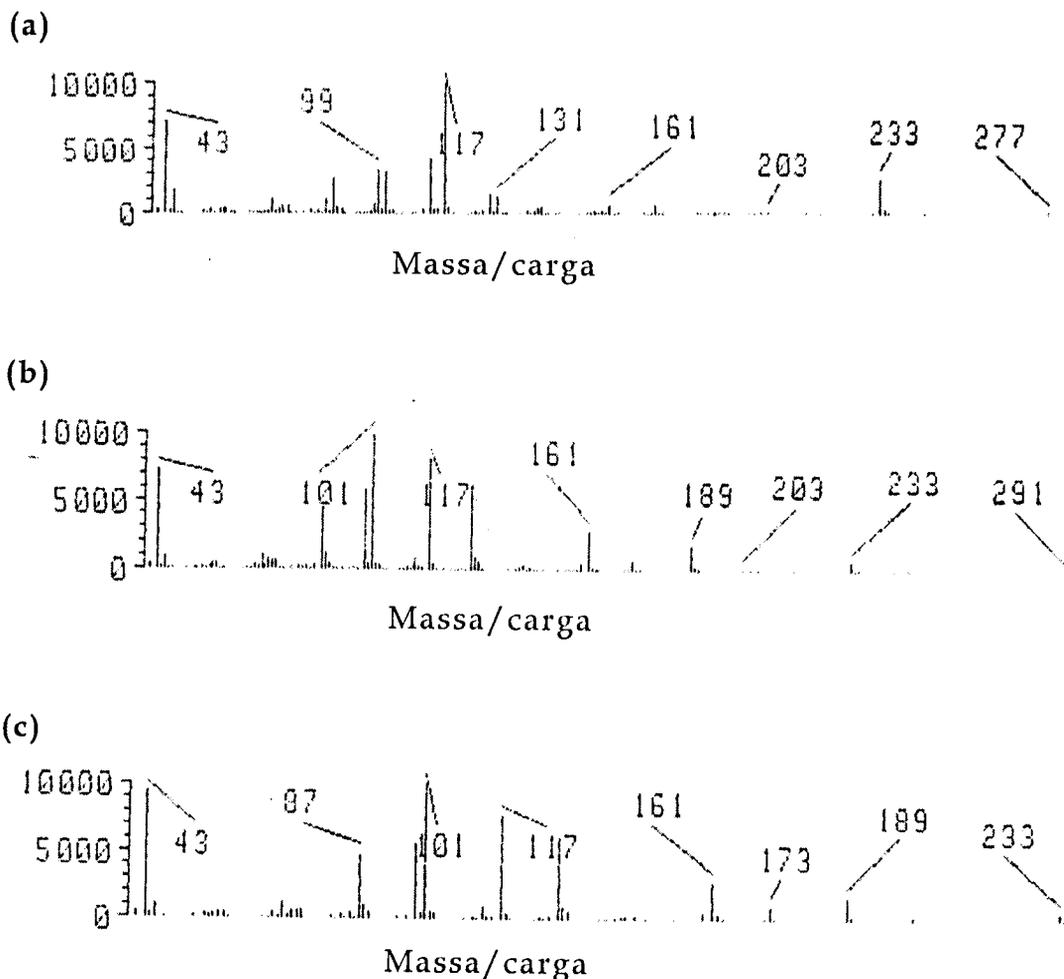
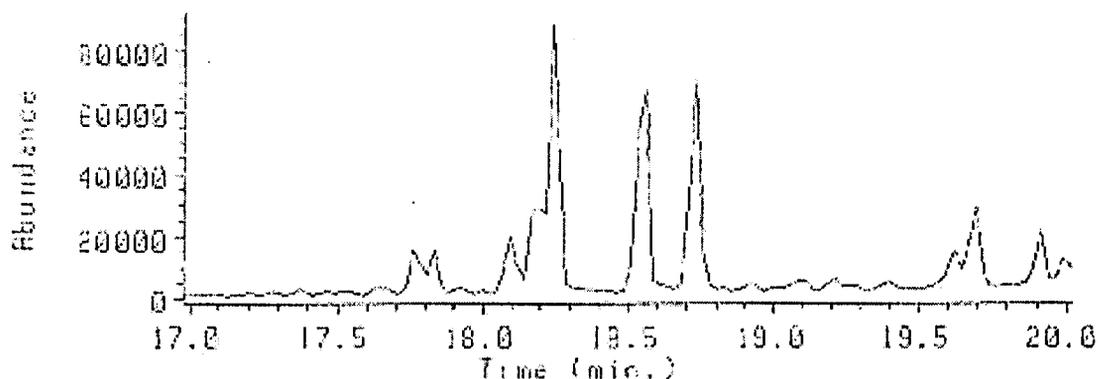


FIGURA 5. Espectros de massa obtidos a partir de: (a) padrão de ligação 1,4; (b) padrão de ligação 1,6 e (c) "canjica".

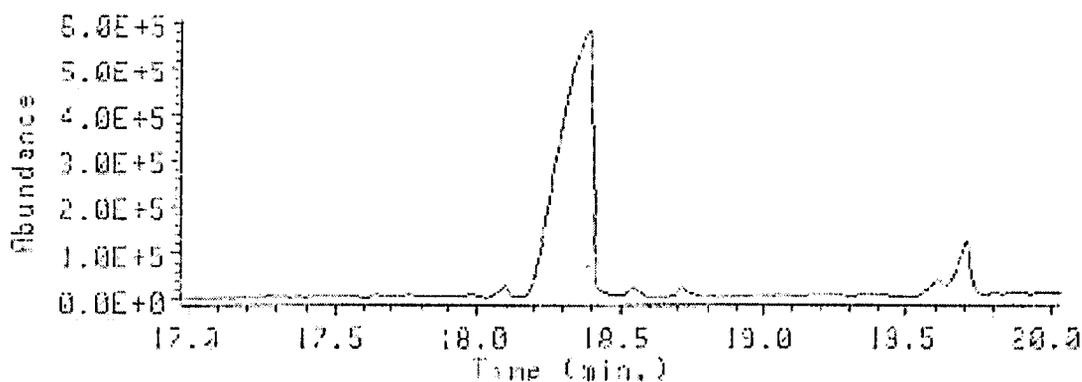
Na FIGURA 6, os resultados mostram o comportamento dos sinais após a mistura da amostra da "canjica" com o padrão de ligação 1,6. Observou-se que a adição desse padrão na amostra de "canjica" intensificou o respectivo sinal do referido cromatograma. A comparação desses dados com espectros fornecidos pela literatura (McLAFFERTY & STAUFFER, 1989), revelaram a presença do composto 1,5,6-tri-*o*-acetil-2,3,4-tri-*o*-metilglucitol. Confirma-se, portanto, a presença de unidades monoméricas de glicose unidas predominantemente por ligações do tipo 1,6, podendo ser considerada como uma dextrana de

estrutura linear. Na TABELA 3, pode-se observar os fragmentos primários e os tempos de retenção dos alditóis acetato, derivados da amostra de "canjica" e dos padrões de ligações utilizados.

(a)



(b)



(c)

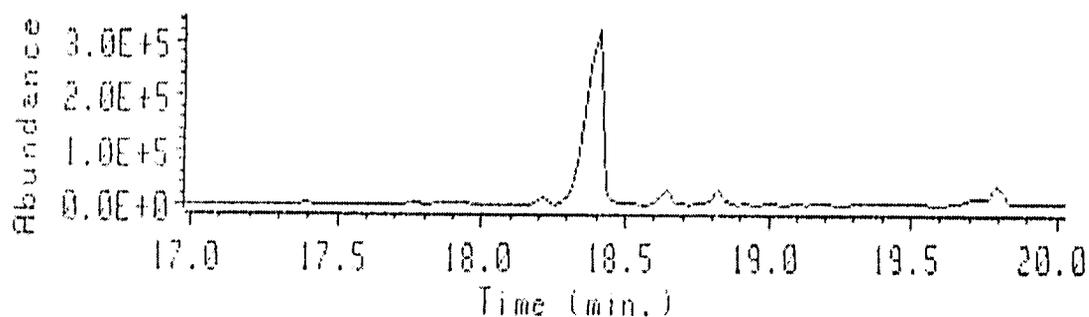


FIGURA 6. Cromatogramas dos alditóis acetatos parcialmente metilados derivados da (a) "canjica", (b) do padrão 1,6 e (c) os dois ("canjica" e padrão 1,6) injetados juntamente. Condições cromatográficas: gás de arraste: hélio; coluna Ultra 2 HP; temperatura da coluna 130°C/5 minutos até 300°C com aumento de 7°C/minuto; temperatura do injetor e detector de 250°C e 280°C, respectivamente.

Os resultados obtidos através da análise das “canjicas” por CG-MS, confirmam os dados obtidos por cromatografia em papel e espectroscopia de infravermelho. Dessa forma, observou-se que os monômeros de glicose, que constituem as nove “canjicas” analisadas, estão unidos predominantemente por ligações do tipo 1,6. Embora os resultados indiquem uma aparente exclusividade de glicose como componente da “canjica”, não se deve descartar a possibilidade de existência de traços de outros açúcares associados à dextrana os quais, por razões de baixa concentração não foram identificados pela técnica de CG-MS. Além disso, deve-se considerar que a técnica de cromatografia em papel não apresenta a mesma sensibilidade comparando-se ao CG-MS.

TABELA 3. Dados de CG-MS para os alditóis acetato derivados da “canjica” e dos padrões de ligação 1,4 e 1,6.

Composto	t_r	Fragmentos
	(minutos)	Primários (m/z)
1,5,6-tri-o-acetil-2,3,4-tri-o-metilglucitol	18,394	43,101,117,161,189,203,233,291
1,4,5-tri-o-acetil-2,3,6-tri-o-metilglucitol	18,093	43,99,117,131,161,203,233,277
“canjica”	18,241	43,87,101,117,161,173,189,233

t_r = tempo de retenção

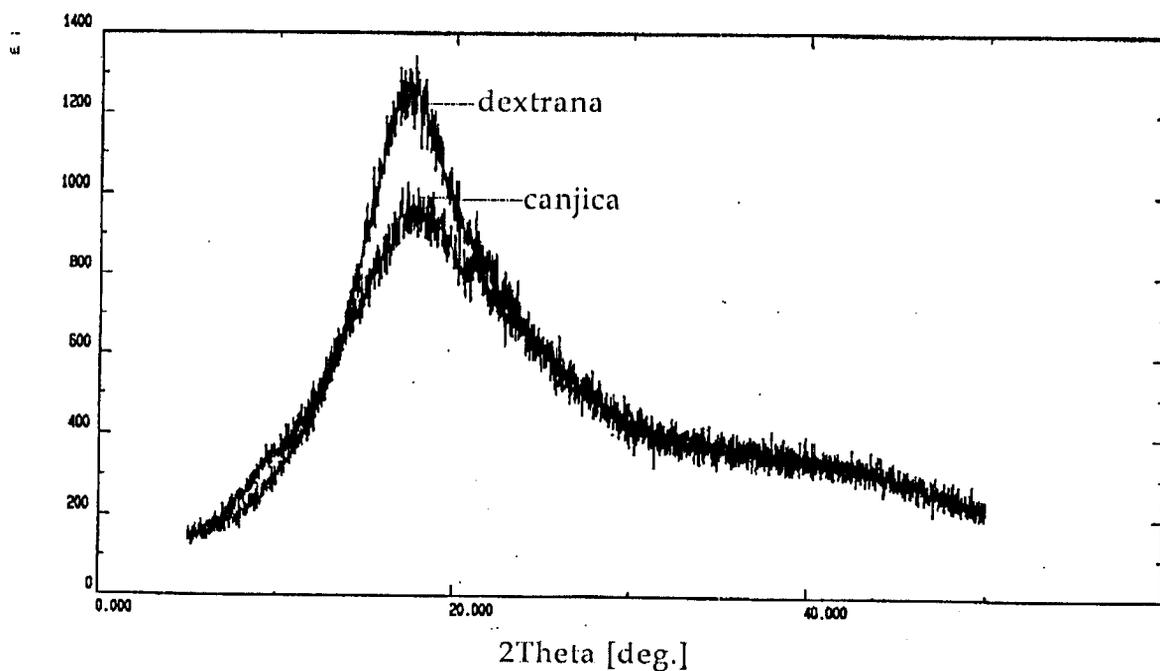
m/z = relação massa sobre carga

4.2.5. Difração de Raios X

Comparando os resultados obtidos a partir de análises de difração de raios X utilizando amostras de dextrana purificada comercial como padrão e a de “canjica” (FIGURA 7a) observa-se um maior grau de organização estrutural da dextrana, enquanto que no caso da “canjica” (FIGURA 7b) nota-se a presença de duas

bandas, uma em 9,580 e outra em 21,200 (em valores de 2theta), ambas ausentes na amostra padrão. Essas duas bandas provavelmente correspondem a outro tipo de material agregado à dextrana.

(a)



(b)

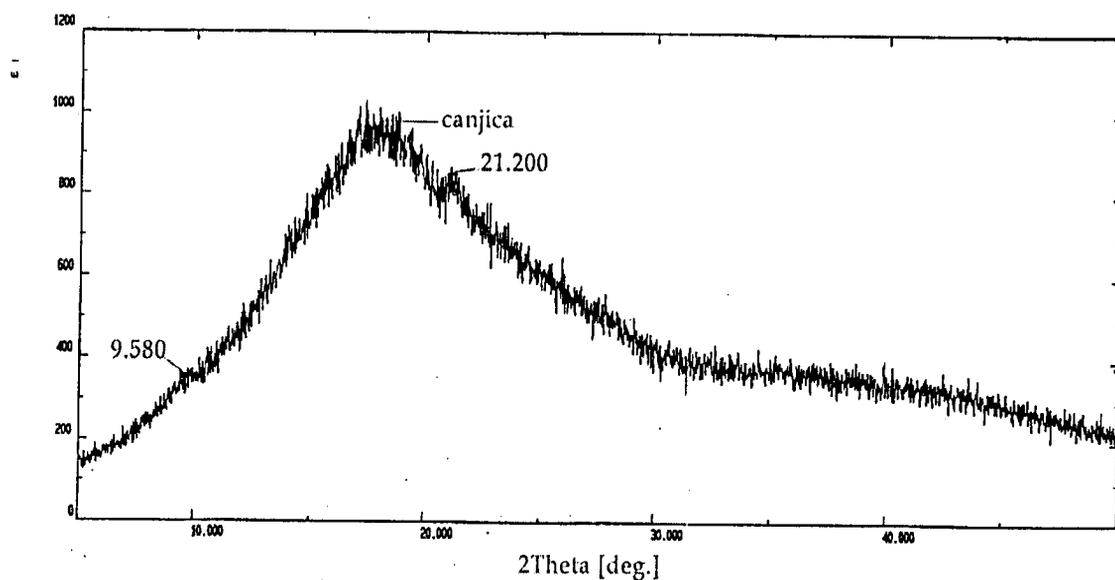


FIGURA 7. Padrão de difração de raios X da (a) dextrana e da "canjica" e (b) da "canjica", utilizando goniômetro horizontal e feixe de 30Kv e 20mA com colimador $K_{\alpha}Cu$ e filtro K_{β} .

Tal resultado descarta portanto, a exclusividade da dextrana na “canjica” e sugere uma influência desta composição mista sobre a solubilidade em água. A diferença da intensidade entre as duas amostras pode ser atribuída a diferença de pureza entre as amostras.

4.2.6. Considerações a respeito da análise química da “canjica”

A ocorrência do fenômeno da formação de “canjicas”, durante o processamento de açúcar e álcool, sempre foi atribuído pelos técnicos das usinas, à presença de dextrana, uma vez que estudos já haviam demonstrado a presença desse tipo de polímero associado ao caldo de cana (EGAN, 1966; KENERY et al., 1967; LEONARD & RICHARDS, 1969; TILBURY, 1975; ALSOP, 1983).

Por outro lado, esses resultados discordam de outros apresentados pela literatura (SIDEBOTHAM, 1974), em que se estabelece uma relação em que o tipo de ligação química é associado com a solubilidade do polímero. Em 1993, CASTILLO et al. isolaram três linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* que produziam dextransas insolúveis em água com considerável quantidade de ramificações. Já a “canjica” coletada na indústria, mostrou tratar-se de um material polimérico rico em ligações do tipo 1,6, portanto com estrutura linear e também insolúvel em meio aquoso.

Admitindo-se que as “canjicas” são de fato constituídas exclusivamente pelo polímero dextrana, o esperado seria um

polímero altamente ramificado e com diferentes tipos de ligações químicas nos pontos de ramificação, o que lhe conferiria tal característica de insolubilidade em meio aquoso. Portanto, pode-se sugerir que, embora a "canjica" tenha estrutura típica de uma dextrana linear, alguns fatores adicionais podem estar envolvidos em um mecanismo de enovelamento e formação do seu aspecto característico. Além disso pelos dados apresentados na TABELA 2, pode-se verificar a presença de Al^{+3} , Mn^{+2} , Ca^{+2} , Si^{+} , Ti^{+} , Fe^{+3} e K^{+} associados a todas as "canjicas", em quantidades variáveis. Tal resultado sugere que estes cátions podem interagir com a estrutura linear da dextrana de forma que ela se enovele.

Deve-se considerar também a existência de outro composto associado à "canjica" além da dextrana, como mostrado na difração de raios X e que pode ser o responsável pela sua característica de insolubilidade.

Os estudos conduzidos por JEANES et al. (1954) e confirmado por ALSOP (1983), mostraram que diferentes linhagens de bactérias produzem dextranas distintas, com uma variação da porcentagem de ligações 1,6, do tipo de ligação nos pontos de ramificação bem como na porcentagem de ramificação. Segundo os autores, as dextranas produzidas por diferentes bactérias apresentam estruturas que variam em relação a quantidade de ramificações apresentadas. Diante disso pode-se sugerir que as "canjicas" coletadas nas diferentes usinas são formadas por polímeros produzidos pelos mesmos tipos bacterianos.

4.2.7. Aspectos microscópicos da “canjica”

Análises de microscopia óptica das “canjicas” recém coletadas no processo fermentativo mostraram a presença de bactérias, predominantemente bacilos, e leveduras, associados ao material amorfo. As micrografias estão mostradas na FIGURA 8. A presença desses microrganismos tanto pode estar relacionada a própria microbiota presente durante o processo de fermentação alcoólica, como também pode ser relacionada a possibilidade desses microrganismos serem os responsáveis pela produção da dextrana e apresentação dessa na forma característica da “canjica”.

Não se deve descartar a possibilidade da associação desses microrganismos presentes na “canjica”, através de interações e liberação de compostos a partir do seu metabolismo, levar à precipitação do polímero na forma de “canjica”, conforme citaram BEVAN & BOND (1971). Os autores verificaram a produção de polímero semelhante à “canjica”, a quem denominaram goma “*tapyoca-like*”, e atribuíram tal formação como decorrente da associação de linhagens de *Leuconostoc*, de leveduras (*Picchia* ssp ou *Hansenula* ssp) e pequenos bastonetes. Trabalho envolvendo análises de grãos de “kefir” também mostrou essa associação, mas nesse caso, a bactéria láctica normalmente presente é do gênero *Lactobacillus*, enquanto a levedura é uma *Saccharomyces* (PIDOUX et al., 1990).

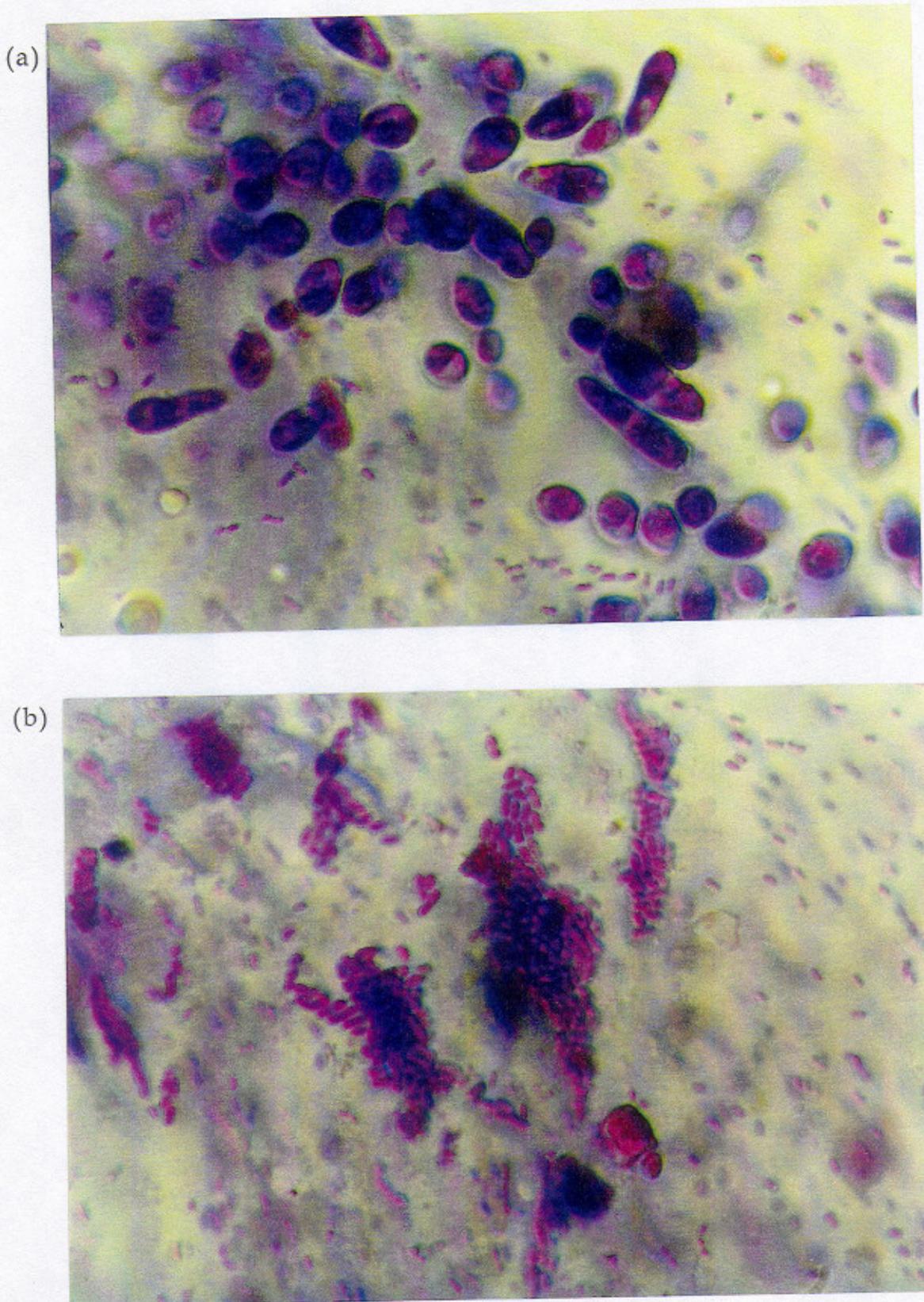


FIGURA 8. Aspectos microscópicos da "canjica" e microrganismos associados (1.250x). (a) aspecto geral da "canjica" com leveduras e bacilos e (b) detalhe dos bacilos.

4.3. GOMAS PRODUZIDAS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

4.3.1. Isolamento de microrganismos produtores de gomas

A ocorrência de polímeros externamente à parede celular é uma característica comum em microrganismos. Tais polissacarídeos podem ser encontrados tanto na forma de discretas cápsulas ao redor da célula ou podem ser secretados como uma massa amorfa no meio de crescimento microbiano. De qualquer forma, esses exopolissacarídeos conferem uma certa proteção ao microrganismo em relação à agentes externos, favorecendo seu desenvolvimento no seu meio de crescimento.

Para a realização do presente trabalho, objetivando-se o isolamento de bactérias lácticas produtoras de gomas a partir da sacarose, foi escolhido o meio de cultura Cana 11 (UENO, 1992). Segundo a autora, esse meio permite o crescimento de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* em condições estacionárias, mostrando parâmetros como constante máxima de crescimento (μ), e latência (L), em níveis semelhantes aos obtidos quando utilizado o meio Man, Rogosa & Shape (MRS), que é um meio tradicional para o cultivo de bactérias lácticas. Outra característica interessante é a presença de sacarose como encontrado na cana-de-açúcar no meio Cana 11, possibilitando, dessa forma, a produção de

polissacarídeos a partir desse substrato, possivelmente através da liberação da enzima dextransacarase.

Analisando os caldos de cana recém-colhidos, foi observada a existência de microrganismos produtores de material gomoso, que era observado após 24 horas de cultivo através da verificação do espessamento do meio de crescimento. A inoculação de amostras dos caldos que apresentaram espessamento observável, evidenciou em cultivo realizado em meio sólido, a presença de colônias altamente produtoras de gomas. A coleta dessas colônias e sua inoculação em outro meio para isolamento tinha de ser realizada em 24 horas para evitar o contato entre os materiais poliméricos produzidos pelos isolados, de modo a evitar uma consequente contaminação entre as colônias.

4.3.2. Identificação de microrganismos produtores de gomas

A partir dos métodos de isolamento empregados, foram selecionadas somente as bactérias Gram positiva, produtoras de goma e que apresentassem os testes de catalase e benzidina negativos. Tal procedimento baseou-se em dados da literatura (TILBURY, 1971; SIDEBOTHAM, 1974) e visou a seleção de microrganismos do grupo láctico. Esses mesmos autores mostraram a importância de bactérias lácticas, especialmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* como contaminantes naturais do caldo de cana, assim como sua relação com o mecanismo de produção de exopolissacarídeos.

Submetendo as bactérias produtoras de gomas selecionadas como pertencentes ao grupo láctico às análises propostas por AXELSSON (1993), pode-se verificar que todas os microrganismos isolados em cana recém-colhidas e moídas, pertencem ao gênero *Lactobacillus*, uma vez que além das características fisiológicas apropriadas ao gênero, todos os isolados possuíam a forma de bastonetes. Na TABELA 4 observam-se as características diferenciais das bactérias isoladas (identificadas por números) a partir de caldo de cana-de-açúcar recém colhida e moída.

Estes resultados poderiam ser explicados de acordo com SILVA & CANHOS (1990), que avaliando o caldo de cana durante o resfriamento em torre, também encontraram como predominantes as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (30%), sendo que as espécies mais encontradas foram *L. fermentum* (33%), *L. confusus* (18%) e *L. viridescens* (11%) .

Também GALLO (1990), determinando a microbiota bacteriana de mosto e de dornas da fermentação alcoólica, verificou a predominância do gênero *Lactobacillus* (59,75%), evidenciando assim a importância desse gênero como contaminante em caldo de cana. Entretanto, outro trabalho de isolamento de bactérias a partir de caldo de cana mostrou além de *Lactobacillus*, outros tipos bacterianos; dentre eles: *Acetobacter*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (AMORIM & OLIVEIRA, 1982)

O trabalho de isolamento aqui realizado visou à obtenção de microrganismos produtores de goma e do grupo láctico, não se constituindo, portanto, em um trabalho de levantamento da microbiota associado à cana-de-açúcar, limitando a possibilidade

de isolamento de uma variedade de bactérias. Além disso, é preciso considerar que a cana-de-açúcar utilizada nos experimentos foi cortada e imediatamente moída e analisada, evitando, portanto, a proliferação de microrganismos produtores de goma. De acordo com KENERY et al. (1967), qualquer atraso que ocorra entre a queimada e a colheita da cana, ou entre a colheita e o processamento dessa cana, pode criar condições favoráveis para o desenvolvimento de *Leuconostoc*. Trabalhou-se, portanto, em condições ideais de manejo da cana-de-açúcar. Já os resultados obtidos por TILBURY (1971) diferem dos nossos, visto que o autor detectou *Leuconostoc mesenteroides* em caldo de cana recém-colhida com uma contagem inicial entre 5×10^4 e 5×10^5 UFC/mL.

Embora a literatura (BOURNE et al., 1972; CASTILLO et al., 1993; LANDON et al., 1993) enfatize que as melhores bactérias produtoras de goma são as do gênero *Leuconostoc*, foi importante trabalhar com outras bactérias que apresentassem tal característica e que estivessem presentes no caldo de cana, como os lactobacilos, que estavam presentes nas "canjicas" recém coletadas (FIGURA 8).

Além disso, há tempos se conhece a associação de bactérias do gênero *Lactobacillus* em grãos de "kefir", sendo que o microrganismo é o responsável pela produção da dextrana presente (VAYSSIER, 1978; MOINAS et al., 1980; PIDOUX et al., 1988; GALLI et al., 1995; ZACCONI et al., 1995).

TABELA 4. Características diferenciais das bactérias isoladas a partir do caldo de cana recém colhido e analisadas segundo AXELSSON (1993).

cultura	CO ₂	10°C	45°C	6,5% NaCl	18% NaCl	pH 4,4	pH 9,6
1	+	+	-	+	-	+	-
2	+	+	-	+	-	+	-
3	-	-	-	+	-	-	-
4	+	+	-	+	-	+	-
5	+	+	-	+	-	+	-
6	+	+	-	+	-	+	-
7	+	+	-	+	-	+	-
8	+	+	-	+	-	+	-
9	+	+	-	+	-	+	-
11	+	+	-	+	-	+	-
12	+	+	-	+	-	+	-
13	+	-	-	+	-	+	-
14	+	+	-	+	-	+	-
15	+	-	-	+	-	+	-
16	+	+	-	+	-	+	-
17	+	+	-	+	-	+	-
18	+	+	-	+	-	+	-
19	+	+	-	+	-	+	-
21	+	+	-	+	-	+	-
22	+	+	-	+	-	+	-
23	+	+	-	+	-	+	-
26	+	+	-	+	-	+	-
28	+	+	-	+	-	+	-
29	+	+	-	+	-	+	-
30	+	+	-	+	-	+	-
31	+	-	-	+	-	+	-
32	+	+	-	+	-	+	-
33	+	+	-	+	-	+	-
34	+	+	-	+	-	+	-
35	+	+	-	+	-	+	-
38	+	+	-	+	-	+	-
40	+	+	-	+	-	+	-
43	+	+	-	+	-	+	-
45	+	+	-	+	-	+	-
46	+	+	-	+	-	+	-
47	+	+	-	+	-	+	-
48	+	+	-	+	-	+	-
50	+	+	-	+	-	+	-
51	+	+	-	+	-	+	-
52	+	+	-	+	-	+	-
53	+	+	-	+	-	+	-
54	+	+	-	+	-	+	-
55	+	+	-	+	-	+	-
56	+	+	-	+	-	+	-
57	+	+	-	+	-	+	-
59	+	+	-	+	-	+	-
60	+	+	-	+	-	+	-
61	+	+	-	+	-	+	-

(+) = crescimento

(-) = ausência de crescimento

Os lactobacilos, no caso da fermentação alcoólica, merecem atenção principalmente porque este gênero, além de produzir gomas, está frequentemente associado ao fenômeno da floculação de leveduras durante o processo fermentativo (YOKOYA & OLIVANETO, 1991). Normalmente, o *Leuconostoc* é encontrado em número reduzido nas dornas de fermentação devido a falta de competitividade desse gênero com a levedura no sistema de fermentação alcoólica, enquanto o *Lactobacillus* sobrevive durante o ciclo fermentativo (KAJI, 1989). Logo, deve-se considerar que, na prática, o *Leuconostoc* está presente no caldo de cana até o momento da fermentação; e pode-se encontrar, então, um caldo com alta viscosidade aparente em decorrência do seu crescimento, e conseqüente produção de gomas.

O aumento da viscosidade do caldo de cana nas usinas de álcool é considerado um fato corriqueiro, e esse fenômeno associa-se à presença de bactérias, principalmente do grupo láctico. A formação da "canjica", possivelmente deva estar relacionada com um caso excepcional que ocorre em situações de aumento de viscosidade causada pela presença de dextrana e a simultânea presença de outros fatores desconhecidos que podem influir no fenômeno. Neste caso, portanto, a presença de bactérias produtoras de gomas (como o *Lactobacillus*), poderia também interferir no processo de floculação de leveduras, em processos normais, ou caso estas gomas precipitassem em concentrações de álcool semelhantes ao que se obtém durante a fermentação alcoólica.

Considerando que a presença de *Leuconostoc* no caldo de cana também pode levar a um aumento de viscosidade antes do

início da fermentação, é possível supor que a formação da “canjica” possa ocorrer em casos extremos de aumento de viscosidade causada por ambos os microrganismos. Uma possibilidade é que no momento da formação da “canjica”, só o *Lactobacillus* esteja presente e esteja associado com a ocorrência do fenômeno.

4.3.3. Seleção de microrganismos produtores de gomas

Foi notado que algumas linhagens de *Lactobacillus* isoladas apresentavam um comportamento superior em termos de produtividade de goma no meio de cultura. A partir dessa observação, tais linhagens foram escolhidas para produção de gomas. Outro fator que influenciou, não só em termos de produtividade mas também de viscosidade aparente conferida ao caldo, foi a temperatura de crescimento dos microrganismos no caldo suplementado com sacarose como fonte de carbono. Pode-se observar na TABELA 5 que, entre as linhagens melhores produtoras de gomas, existe uma diferença em termos de viscosidade aparente em relação a temperatura de incubação. Em temperatura ambiente, em torno de 23°C, a viscosidade aparente do caldo foi superior em relação à obtida a 30°C; logo, a temperatura de 23°C foi utilizada sempre que se fez necessário o cultivo de microrganismos para produção de gomas.

Além disso, todas as culturas produtoras de gomas isoladas a partir do caldo de cana fresco, apresentaram produção de gomas em meio de cultura com sacarose e ausência de produção de goma em presença da glicose, sugerindo, portanto, a ação da

enzima dextransacarase na polimerização da glicose. Observou-se uma variação em relação à produtividade, sendo que as culturas que apresentaram maior produção de goma foram selecionadas para os testes de fatores que influenciam a formação da "canjica". Em análise por cromatografia em papel, todas essas gomas selecionadas eram constituídas por glicose.

TABELA 5. Influência da temperatura de incubação sobre a viscosidade aparente do meio inoculado com diferentes culturas.

Cultura	Viscosidade Aparente (cP)	
	23°C	30°C
6	11,1	3,9
8	13,9	4,0
22	11,8	3,6
38	60,0	38,6
42	49,5	28,2
43	5,70	1,8
44	22,0	19,5
46	47,0	27,0
54	27,5	13,0
57	38,3	2,1

Condições de análise: Viscosímetro Brookfield modelo DV-III, haste n° 18, 240-250 rpm, intervalos de 1 minuto com rotação variando de 1 em 1, temperatura de leitura 23°C.

Existem controvérsias na literatura a respeito da influência da temperatura sobre a viscosidade aparente. De acordo com TECANTE et al. (1986), baixas temperaturas de reação mostraram-se responsáveis pela produção de soluções menos viscosas, devido a redução de massa molecular da dextrana produzida. Por outro lado, CHOPLIN et al. (1986) mostraram que dextranas produzidas em baixas temperaturas são menos ramificadas e, portanto, mais viscosas, concordando com os dados apresentados por SABATIE & CHOPLIN (1986).

Em relação à produção de gomas por 10 mL de caldo inoculado, pode-se verificar na TABELA 6, que obteve-se alta produtividade de gomas em condições de laboratório. Os resultados apresentados na literatura (EGAN, 1971), mostram que em cana colhida e estocada por mais de um dia, tais valores variaram entre 9 a 10 mg/10 mL e entre 23 e 47 mg/10 mL, respectivamente, para a cana inteira e para a cana picada.

TABELA 6. Produtividade de goma (mg/10 mL) de diferentes culturas em meio base sacarose e 23°C.

Cultura	Produção de gomas (mg/10mL)
6	414,2
8	420,7
22	225,7
38	801,1
42	752,0
43	111,0
44	375,0
46	720,0
54	390,0
57	437,0

4.3.4. Detecção de culturas produtoras de gomas que precipitam em diferentes concentrações alcoólicas

Considerando a possibilidade de existirem gomas que precipitem em concentrações alcoólicas, semelhantes às obtidas durante a fermentação alcoólica (por volta de 10%), e que estas poderiam estar relacionadas à ocorrência do fenômeno de floculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi feita uma triagem das gomas produzidas pelas culturas isoladas. Observou-

se que todas as culturas produziram gomas detectáveis, as quais precipitaram somente acima de uma concentração final de 20% de álcool. ALSOP (1983), coloca um valor de 48% na concentração final como referência para precipitação de gomas em álcool, possibilitando a distinção entre gomas de alta e de baixa massa molecular, sendo a massa molecular inversamente proporcional à concentração de álcool adicionado.

Muitas vezes o caldo de cana já chega à planta de processamento com alta viscosidade aparente, em virtude da presença de contaminantes produtores de gomas. Nessas condições, existe a possibilidade dessas gomas formadas não precipitarem como "canjicas" no trocador de calor, e ficarem estáveis no caldo fermentativo, enquanto os níveis alcoólicos não estejam muito altos, após o que seriam precipitados pela ação do álcool e, conseqüentemente, arrastariam as leveduras envolvidas no processo de fermentação alcoólica como um mecanismo de floculação.

Para que se comprovasse a influência de gomas com diferentes massas moleculares na presença de baixa concentração de álcool, sobre o fenômeno da floculação, deveria existir, durante a fermentação, um máximo de produção de gomas de alta massa molecular no caldo de cana a ser fermentado. Os resultados de análise de massa molecular das gomas obtidas no presente trabalho, (FIGURA 9) mostram a predominância de gomas de alta massa molecular nas amostras. Foi observado que existe uma pequena proporção de gomas de baixa massa molecular em comparação com as de massa molecular maior que 2.000.000 Da, e que estas, de alta massa molecular não foram, portanto,

suficientes para que precipitassem em concentrações alcoólicas obtidas em um processo fermentativo normal, por volta de 10%.

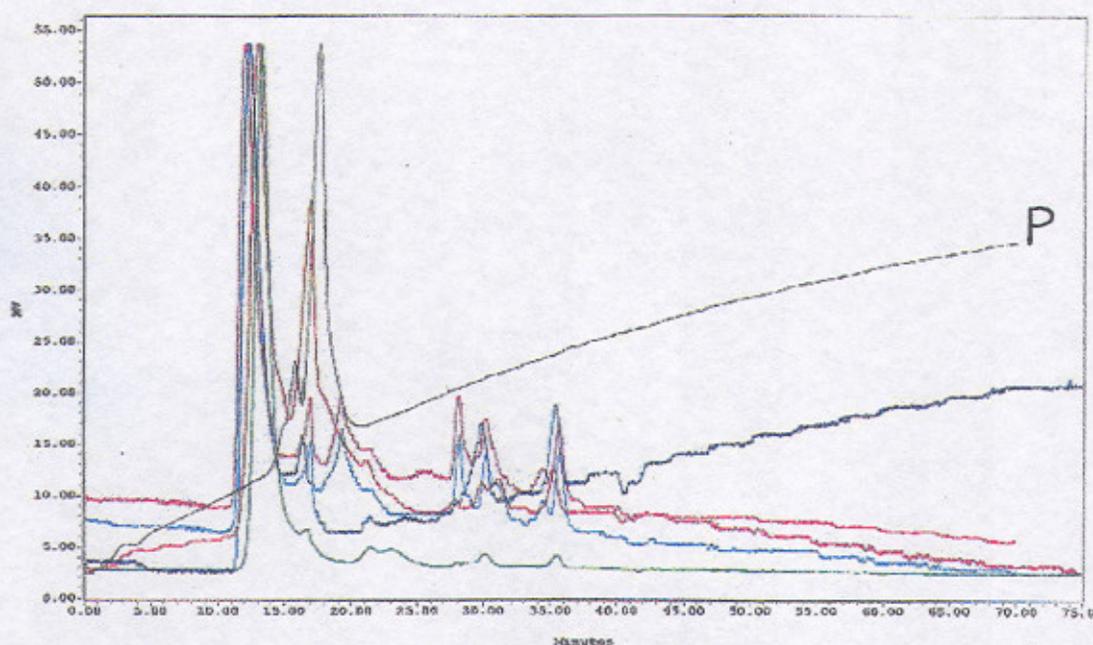


FIGURA 9. Cromatogramas (Intensidade x tempo) obtido por GPC (cromatografia de permeação em gel) de: padrão dextrana de MM 2.000.000 Da (P) e gomas produzidas pelas culturas de *Lactobacillus* selecionadas. Condições cromatográficas: fase móvel: água, vazão: 0,8 mL min⁻¹, temperatura do detector e das colunas: 40°C e volume da amostra injetada: 100µL.

Assim sendo, pode-se afirmar que os lactobacilos produtores de gomas isolados, não estão envolvidos num processo de floculação através da precipitação das gomas produzidas e presentes em caldos de fermentação, pois em caldos fermentados obtem-se, normalmente, valores finais médios de 10% de álcool (CHERYAN & MEHAIA, 1983).

Segundo a literatura (ROBYT & WALSETH, 1979; ALSOP, 1983), a concentração de sacarose presente no caldo necessária para máxima produção de gomas de alta massa molecular varia

de 2,0 a 17,9%. Tais valores são facilmente obtidos em caldo de cana madura; portanto, não se deve descartar a hipótese de que, em condições especiais, a concentração de gomas de alta massa molecular seja suficiente para permitir a sua precipitação em teores alcoólicos presentes em fermentação alcoólica.

4.4. FATORES ENVOLVIDOS NA FORMAÇÃO DA "CANJICA"

Dentre todas as culturas produtoras de gomas isoladas e testadas durante o presente trabalho, nenhuma delas chegou a produzir gomas com aspecto característico da "canjica", conforme descrito no item 4.1 e mostrado na FIGURA 2, e nem apresentaram insolubilidade no meio de cultura testado. Tal resultado sugere, provavelmente, a existência de outros fatores importantes ocorrendo preliminarmente ou durante as etapas do processo fermentativo, que devam estar envolvidos no processo de formação do polímero com aspecto da "canjica".

4.4.1. Influência das condições climáticas

Relacionar a maior frequência do processo de formação da "canjica" durante as safras de 1993 e 1994, às condições do clima desses anos pode ser correto, uma vez que a mesma cana-de-açúcar, posteriormente utilizada no processo fermentativo das usinas, sofreu a influência dos aspectos climáticos. Chama a atenção o fato de que, nos anos seguintes à observação da ocorrência do fenômeno, este voltou a ser um evento esporádico.

Alguns autores relacionaram a interferência das condições climáticas, sobre a cana-de-açúcar, como fator importante no desenvolvimento de microrganismos produtores de gomas (YATES 1996; MORO du BOIL, 1997). Segundo YATES (1996), o índice pluviométrico afeta a qualidade da cana, influenciada principalmente pela umidade do solo. Os danos físicos no colmo causado por temporais (FOSTER et al., 1980; IRVINE, 1981) e por geadas (SINGH & SINGH, 1975; LEGENDRE et al., 1984) também elevam as chances de contaminação da cana-de-açúcar.

Por outro lado, deve-se considerar que se realmente as condições climáticas tiveram influência sobre a formação da "canjica", a grande maioria das usinas da região deveria ser afetada e não somente algumas unidades. De qualquer modo, não se pode descartar completamente esta influência climática, pois a qualidade do caldo de cana, em associação com outros fatores desconhecidos presentes nas usinas, poderiam levar à ocorrência do fenômeno.

Sendo assim, foi realizado um levantamento junto ao Departamento de Física e Meteorologia da ESALQ, sobre as condições climáticas da região de Piracicaba/SP. Os dados foram coletados em um local próximo às usinas avaliadas, devido a não disponibilidade e ou impossibilidade da obtenção de dados específicos a cada uma das usinas desta região.

O levantamento cobriu o período compreendido entre 1992 e 1997, com tomadas diárias envolvendo os seguintes parâmetros: precipitação pluviométrica, umidade relativa, dias de chuva, temperatura média mínima, e temperatura média máxima. Os dados foram avaliados mensalmente, considerando que a

ocorrência de “canjica” sempre foi estabelecida em safras. Além disso, não haviam informações referentes ao mês ou dias exatos em que se observou a formação da “canjica” em cada usina.

Deve-se considerar que, as safras dos anos de 1993 e 1994 foram especialmente críticas no que se refere ao fenômeno da formação de “canjicas” durante os processos de industrialização da cana. Portanto, ao efetuar as análises estatísticas, procurou-se verificar se houve nesse período alguma ocorrência atípica que merecesse ser considerada, e que poderia ter influenciado a ocorrência de “canjicas” naquelas duas safras em especial. Os resultados das análises estatísticas envolvendo as condições climáticas estão apresentadas na TABELA 7.

TABELA 7. Médias e desvios padrão de parâmetros climáticos observados na região de Piracicaba/SP durante os anos de 1992 a 1997.

Ano	Precipitação pluviométrica	Umidade Relativa	Dias de Chuva	Temperatura mínima.	Temperatura máxima.
1992	109,21 ± 85,23 ^{a(1)}	77,72 ± 3,74 ^a	11,08 ± 6,44 ^a	17,89 ± 2,74 ^a	24,74 ± 1,88 ^b
1993	110,30 ± 64,90 ^a	79,5 ± 3,61 ^a	11,50 ± 6,4 ^a	17,84 ± 4,13 ^a	25,79 ± 2,26 ^a
1994	115,10 ± 93,97 ^a	76,66 ± 7,12 ^a	8,83 ± 5,04 ^a	18,10 ± 5,37 ^a	26,00 ± 2,32 ^a
1995	137,29 ± 116,87 ^a	78,35 ± 6,21 ^a	10,17 ± 5,64 ^a	18,24 ± 3,00 ^a	25,83 ± 2,26 ^a
1996	132,60 ± 110,54 ^a	79,02 ± 4,80 ^a	11,33 ± 6,69 ^a	18,25 ± 3,90 ^a	25,00 ± 2,37 ^{ab}
1997	113,22 ± 105,72 ^a	77,72 ± 5,01 ^a	10,08 ± 6,64 ^a	25,35 ± 2,75 ^a	18,18 ± 4,06 ^{ab}

Fonte: Departamento de Física e Meteorologia da ESALQ- Piracicaba/SP

⁽¹⁾médias e desvios padrão seguidos de mesma letra na coluna são estatisticamente iguais ($P > 0,05$) pelo teste de Student-Newman-Keuls.

Para os parâmetros da precipitação pluviométrica, umidade relativa, dias de chuva e temperatura média mínima, não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os anos avaliados. Por outro lado, para o parâmetro da temperatura média máxima, observa-se que o efeito do ano foi significativo. Apesar de os dados não terem sido coletados exatamente nem no

local da usina e nem no local do cultivo da cana-de-açúcar, pode ter ocorrido um efeito importante que mereça maior estudo, de modo que se possa afirmar, que não existam diferenças entre os outros parâmetros analisados e que realmente exista uma diferença significativa sobre a temperatura média máxima como se observa. Estudos complementares são necessários para que se possa afirmar que, diferenças entre temperaturas, durante a época de plantio e o desenvolvimento da cana-de-açúcar, estejam influenciando a qualidade da matéria prima, com consequente influência sobre a formação da "canjica".

4.4.2. Influência de íons metálicos e tratamento térmico

Observando os dados apresentados na TABELA 2, pode-se notar a presença de íons metálicos agregados ao material polimérico das "canjicas", as quais tanto podem estar relacionados com a formação de uma estrutura diferencial das dextranas, como ser resultado de arraste desses íons presentes no ambiente fermentativo.

A utilização das concentrações de cátions foi baseada em estudos feitos por outros autores empregando diferentes tipos de gomas (TANG et al., 1995) e as concentrações de gomas, por se adequarem ao equipamento disponível para as análises de viscosidade aparente. As gomas liofilizadas utilizadas foram produzidas por diferentes linhagens de *Lactobacillus*, isoladas de caldo de cana fresco e que mostraram boa produção, com grande influência na viscosidade aparente.

A FIGURA 10 mostra o comportamento da viscosidade aparente das gomas em presença de diferentes cátions. A adição de alumínio e cálcio resultou em pequeno aumento da viscosidade aparente da amostra em relação aos outros cátions, sendo que o cálcio exerceu um efeito inicial superior ao do alumínio, o qual se igualou conforme aumento da rotação da haste. Já os demais íons testados (manganês, ferro e potássio), nas mesmas concentrações, levaram a uma diminuição da viscosidade aparente da amostra.

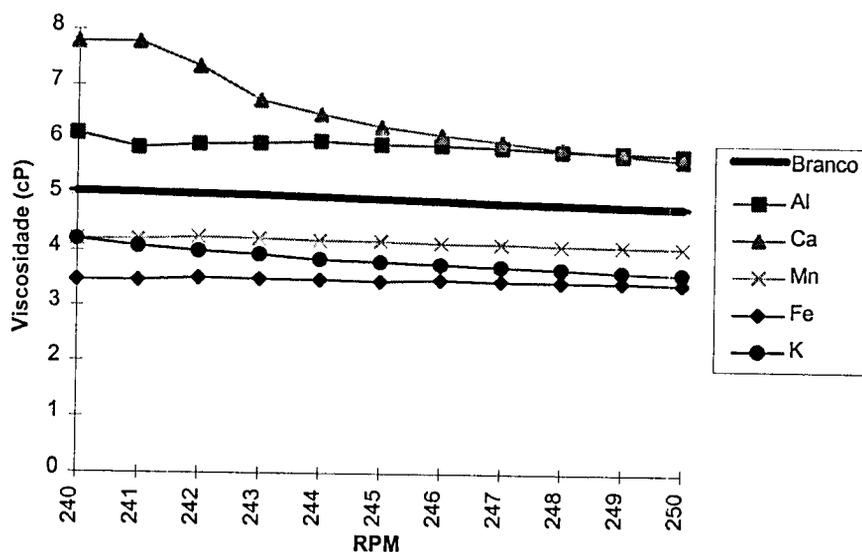


FIGURA 10. Gráfico (viscosidade x rotação) após a adição de 5 mmol L⁻¹ de diferentes cátions sobre a viscosidade aparente (cP) da amostra de goma. Condições de análise: Viscosímetro Brookfield DV-III, haste n° 18, 240-250 rpm, intervalo de 1 minuto, rotação variando de 1 em 1; temperatura de leitura 23°C.

A submissão da solução gomosa a tratamento térmico brando (72°C/5 min.) acarretou uma alteração no comportamento da amostra. Pode-se verificar na FIGURA 11, que após o tratamento térmico houve uma diminuição da viscosidade

aparente da amostra quando comparada com o controle (sem tratamento térmico), independentemente do cátion associado, sendo que o íon cálcio foi o único que manteve a viscosidade aparente da amostra em índices superiores.

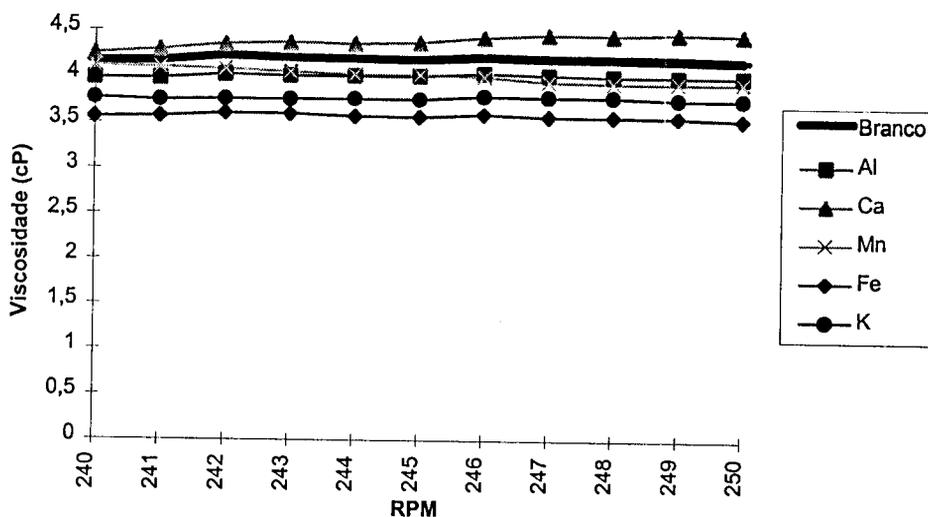


FIGURA 11. Gráfico (viscosidade x rotação) após a da adição de 5 mmol L⁻¹ de diferentes cátions e tratamento térmico brando (72°C/5 minutos) sobre a viscosidade aparente (cP) da amostra. Condições de análise: Viscosímetro Brookfield DV-III, haste n° 18, 240-250 rpm, intervalo de 1 minuto, rotação variando de 1 em 1; temperatura de leitura 23°C.

O tratamento da goma em presença de cátions, especialmente o cálcio, a uma concentração de 5 mmol L⁻¹, em presença ou ausência de choque térmico, ocasionaram uma alteração na viscosidade aparente da amostra, sem que se verificasse qualquer alteração visual semelhante à “canjica” ou mesmo alterações em termos de diminuição de solubilidade da amostra no meio aquoso. Esses dados mostram que o tratamento térmico, ainda que brando, causa uma alteração nas propriedades reológicas da amostra, independentemente da presença de íons.

A mistura dos dois cátions (alumínio e cálcio) em concentrações de 5 mmol L⁻¹ e 140 mmol L⁻¹ sobre uma solução de goma, mostrou que concentrações mais elevadas, são mais eficientes em termos de aumento de viscosidade aparente (FIGURA 12). Quanto ao tratamento térmico, verifica-se que o calor tem influência sobre a diminuição da viscosidade aparente das amostras, e que a adição de cálcio, ao contrário do alumínio, confere maior estabilidade da goma em relação ao calor, não permitindo que a viscosidade aparente diminua muito. O cálcio, quando em associação com o alumínio, mostrou este mesmo comportamento.

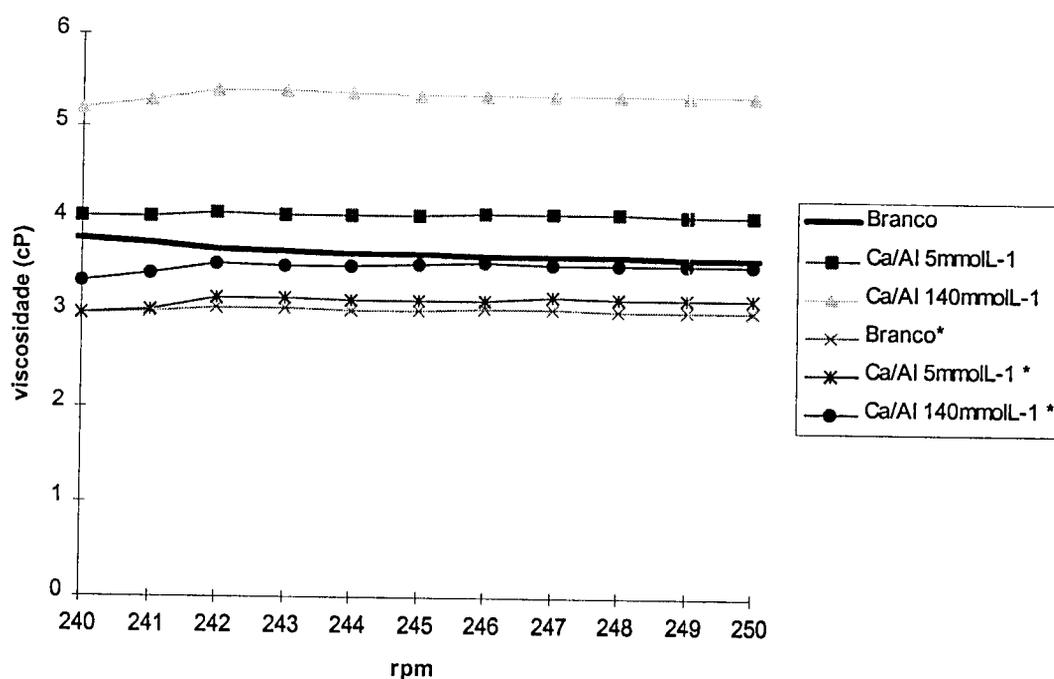


FIGURA 12. Gráfico (viscosidade x rotação) após a mistura de cátions cálcio e alumínio em diferentes concentrações. sobre a viscosidade aparente da amostra. Condições de análise: Viscosímetro Brookfield DV-III, haste nº 18, 240-250 rpm, intervalo de 1 minuto, rotação variando de 1 em 1; temperatura de leitura 23°C). O índice (*) significa presença de tratamento térmico (72°C/5 minutos).

Os resultados obtidos, ainda que insuficientes para elucidar a questão sobre a formação de "canjicas" a partir de dextrana, mostram que os íons cálcio exercem de alguma forma influência sobre as características físicas das gomas. Este dado é interessante, uma vez que grandes quantidades de cálcio (na forma de óxido) são normalmente utilizados para tratamento do caldo de cana a ser fermentado, com o intuito de precipitar componentes indesejáveis ao processo. Imediatamente após a adição do óxido de cálcio, o caldo é submetido a tratamento térmico e, em seguida, resfriado em trocadores de calor.

Considerando que é justamente nesta etapa que ocorre a formação de "canjica", repetiu-se o teste adicionando cálcio na forma de óxido à solução de goma até a obtenção de pH alcalino (por volta de 9,0), seguido de tratamento térmico e posterior acidificação até pH 6,0.

Observou-se, nessas condições, pequeno aumento da viscosidade aparente da amostra (FIGURA 13), a qual não foi tão significativa a ponto de considerar que a maneira pela qual o íon é adicionado exerça grande influência sobre a viscosidade aparente da amostra.

A partir desses resultados, pode-se mostrar que o tratamento de gomas produzidas exclusivamente por bactérias do gênero *Lactobacillus*, com cátions e tratamento térmico brando, não é suficiente para reproduzir a formação da "canjica" em condições experimentais.

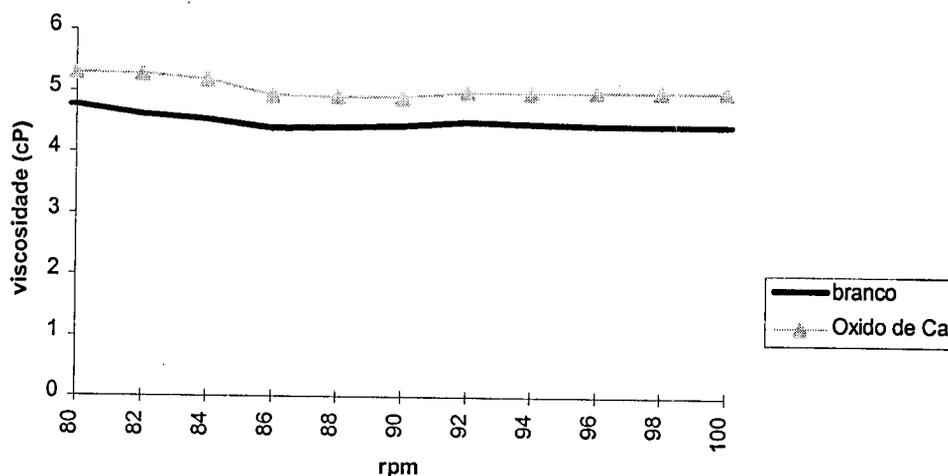


FIGURA 13. Gráfico (viscosidade x rotação) após a adição de óxido de cálcio e tratamento térmico (72°C/15 minutos) sobre a viscosidade aparente da amostra. Condições de análise: Viscosímetro Brookfield DV-III, haste nº 18, 240-250 rpm, intervalo de 1 minuto, rotação variando de 1 em 1; temperatura de leitura 23°C.

Ao contrário de polissacarídeos aniônicos, as dextranas são polissacarídeos neutros e dependem, portanto, de fatores adicionais para que os íons interajam com a molécula de goma, alterando, deste modo a estrutura conformacional da molécula. A presença de íons metálicos agregados à "canjica", bem como a influência da presença de cálcio e alumínio sobre a viscosidade aparente das gomas, pode causar no ambiente de fermentação alcoólica um enovelamento visível além de levar à uma diminuição significativa na solubilidade do polímero.

Segundo WHISTLER (1972), polissacarídeos de ocorrência natural, solúveis em água, possuem características estruturais que previnem ou retardam associações intermoleculares, embora em

estruturas solúveis em água e lineares as moléculas possuem ligações que permitem alto grau de flexibilidade

4.4.3. Influência do pH alcalino e tratamento térmico

Existem duas possibilidades que devem ser consideradas: uma é a formação de um fenômeno de enovelamento das cadeias de polímero que se torcem pela presença de cátions; outra é a formação de ligações éter em presença de pH alcalino ou ácido, principalmente em altas temperaturas, através de um mecanismo de substituição nucleofílica. A ocorrência de ligações éter uniria duas cadeias de dextrana. Embora os grupos sejam neutros, eles têm certa tendência a ganhar ou perder elétrons, e por essa razão, apresentar caráter de reagentes eletrófilos ou nucleófilos (MORRISSON & BOYD, 1973).

No caso dos processos envolvidos na fermentação alcóolica e que podem ser relacionados com a formação de diferentes estruturas na presença de íons, chama a atenção a influência da adição de óxido de cálcio. Este composto é rotineiramente utilizado como agente flocculante de partículas coloidais, eventualmente presentes no caldo e que poderiam prejudicar as etapas posteriores da fermentação. Normalmente, adiciona-se óxido de cálcio de modo que o pH atinja o valor de 9,0, sendo que este processo é feito antes do choque térmico, sugerindo que a ocorrência do fenômeno da formação da "canjica" no trocador de calor, esteja relacionado com a presença de pH alcalinizado pelo óxido de cálcio. Não se deve descartar também a presença de

outros íons no ambiente da fermentação, os quais podem ter influência no enovelamento da dextrana na forma de "canjica".

Pode-se supor também, que nas usinas que apresentaram a formação de "canjicas" no trocador de calor, o caldo de cana quando submetido ao tratamento com óxido de cálcio e posterior tratamento térmico, já apresentava dextrana pré-formada, conferindo uma certa viscosidade aparente ao caldo. Uma possibilidade a ser considerada seria que esta dextrana, linear e solúvel em meio aquoso, por influência de fatores adicionais, como íons adicionados e temperatura elevada, se alterasse fisicamente tornando-se insolúvel.

O tratamento com óxido de cálcio realizado em soluções com alta viscosidade aparente devido à presença de gomas, de modo a ajustar o pH do caldo de cana entre valores de 7,0 a 12,0, torna-se um estudo importante considerando que o mesmo processo ocorre durante o processamento do caldo para a fermentação alcoólica.

Ao realizar este teste, objetivou-se avaliar o comportamento de uma solução gomosa em condições de pH variáveis, seguida de tratamento térmico feito por autoclave, supondo um possível erro durante a adição de óxido de cálcio. Tal procedimento poderia influenciar o processo de formação de "canjica" a partir da dextrana eventualmente presente no caldo. Em pH alcalino poderia ocorrer ligações éter entre os monômeros componentes da dextrana o que a faria adquirir uma característica enovelada atípica.

Além disso, deve-se considerar o conhecido fenômeno da retrogradação que ocorre com outro polissacarídeo, o amido, no qual a influência da temperatura é muito importante. A retrogradação é o processo em que o amido, no estado dissolvido (gelatinizado), reverte para a forma insolúvel em água (JANKOWSKI, 1992). JACOBSON et al. (1997) quantificaram a retrogradação ocorrida em amido proveniente de diferentes fontes aquecendo a solução do polissacarídeo, primeiramente a temperaturas entre 98°C e 100°C, e depois mantendo a solução a 4°C. Deve-se considerar também que o aquecimento do amido, em diferentes temperaturas acima da temperatura de gelatinização, pode afetar profundamente a retrogradação (FISHER & THOMPSON, 1997).

O processo da retrogradação pode ser quantificado através da observação de precipitados cristalinos, que são formados devido à tendência para formação de ligações intermoleculares da fração linear do amido, conferido pela amilose. No processo de retrogradação, ocorre liberação de moléculas de água anteriormente ligadas às cadeias de amilose (BOBBIO & BOBBIO, 1995).

Em nenhum dos tratamentos feitos com as amostras de gomas produzidas em laboratório, foi possível verificar uma alteração visual na solução viscosa. A etapa de acidificação da solução foi realizada também com ácido fosfórico considerando uma possível influência da acidez do solo sobre a cana recém cortada, deixada no solo e utilizada posteriormente no processo.

A manutenção das gomas que sofreram tratamento térmico intenso, a 4°C durante 60 dias, não provocou alterações. Esse fato

se opõem ao resultado obtido por JACOBSON et al. (1997), que mantiveram uma solução de outro tipo de polissacarídeo, o amido, por 56 dias nessa temperatura, e observaram a ocorrência do fenômeno da retrogradação.

Aliada aos fatores analisados no presente trabalho como possíveis responsáveis pela formação da “canjica” nas usinas de açúcar e álcool, vale ressaltar a importância de outros inúmeros fatores, sobre uma eventual precipitação da goma. Dentre esses fatores pode-se citar: a concentração microbiana inicial; o tipo de contaminantes microbianos presentes; a temperatura e o pH durante o processo; o brix do caldo; o tipo e a quantidade de polissacarídeos presentes; presença de íons metálicos incorporados junto com a cana-de-açúcar, presença de íons adicionados durante o processo, e mesmo o cultivar e o grau de maturação da cana utilizada. Segundo LANDON et al. (1994), a síntese da enzima dextranacarase se eleva com o aumento da sacarose, portanto outro fator adicional a ser considerado seria o grau de maturação da cana.

Algumas dessas variáveis, isoladamente ou em conjunto, durante as etapas preliminares da fermentação alcoólica, podem dar origem ao fenômeno da formação de “canjica” e justificar a ocorrência esporádica, numa determinada safra ou durante um processamento, ou mesmo em grande intensidade como ocorreu nos anos de 1993 e 1994.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados apresentados e discutidos anteriormente pode-se concluir:

1. As "canjicas", isoladas da indústria da fermentação alcoólica, apresentam em sua composição homopolissacarídeos, sendo que os monômeros de glicose são unidos predominantemente por ligações do tipo 1,6. Análises de infravermelho confirmam a presença de dextrana, embora a difração de raios X evidencie outro tipo de material não identificado agregado ao polímero.
2. O material polimérico da "canjica" apresenta conteúdo de íons metálicos agregados, entre eles Al, Si, P, Cl, K, Ca, Ti, Mn e Fe.
3. A predominância de ligações 1,6 na dextrana da "canjica" não é suficiente para que o material polimérico apresente solubilidade em meio aquoso.
4. Existe uma associação de microrganismos (leveduras e bacilos) na "canjica", sugerindo que tais microrganismos estão envolvidos no processo, conferindo as características granuladas e de insolubilidade apresentada pela "canjica".
5. É possível isolar grande número de *Lactobacillus* produtores de homopolissacarídeos formados por glicose, a partir de caldo de cana fresco.

6. Os polissacarídeos produzidos por *Lactobacillus* precipitam somente em concentrações alcoólicas superiores a 20%, embora essas gomas apresentem grande proporção de polissacarídeos com massa molecular maior que 2.000.000 D.
7. Os *Lactobacillus* isolados a partir de caldo de cana fresco, conferem uma maior viscosidade ao meio de cultura, em virtude da produção de gomas, quando crescidos a 23°C do que a 30°C.
8. Isoladamente, nenhuma das culturas de *Lactobacillus*, quando crescidas em meio de sacarose, produziu gomas com aspecto característico da “canjica”.
9. A adição de 5 mmol L⁻¹ de íon cálcio leva a um pequeno aumento na viscosidade aparente da solução gomosa, em presença ou ausência de tratamento térmico (72°C/5 minutos). A adição dos íons alumínio, manganês, ferro e potássio na mesma concentração e condições leva a uma diminuição da viscosidade aparente.
10. A adição de 5 e 140 mmol L⁻¹ de íon cálcio e alumínio juntos, sem tratamento térmico, leva ao aumento da viscosidade aparente da solução gomosa; já em presença de tratamento térmico esses valores levam a uma diminuição da viscosidade aparente.
11. O tratamento de uma solução gomosa com óxido de cálcio, obtendo-se diferentes pH alcalinos até 12,0, não leva a alteração visual como observado nas “canjicas”. Tal alteração também não é conseguida com pH 4,0. A inclusão de

tratamento térmico, tanto brando como extremo, não são suficientes para causar tal alteração.

12. Um monitoramento detalhado, nas usinas em que a formação da "canjica" acontece com maior frequência, poderia ser realizado com o intuito de se coletar uma maior variedade possível de dados durante o processo. Dessa forma seria possível identificar e relacionar as diferentes condições presentes no momento da eventual formação da "canjica", de modo que seja possível avaliar as variáveis que realmente são importantes para desencadear o fenômeno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJONGWEN, N.L ; BARKER, P.E. 1993. Scale-up studies of non-aerated fed-batch fermentation of dextransucrase and the industrial synthesis of dextran using the enzymatic route. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, London v.56, n.1, p. 113-118.
- ALEXANDER, J.B. ; MATIC, M.1974. Starch: its occurrence, importance and removal in sugar manufacture. **Proc. Tech. Sess. Cane Sugar Refining Research** p. 113-28.
- ALSOP, R.M. 1983. Industrial production of dextran. **Progress in Industrial Microbiology** , New York, v.18, p.1-44.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A . J. 1982. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Açúcar e Álcool**, Piracicaba, v. 5, p.12-18.
- ANDERSON, D.M.W.; CREE, G.M. 1966. Studies on acid uronic materials. XIV. Methylation with the sodium hydride-methyl iodide-dimethyl sulfoxide system. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.2, p. 162.
- AOAC, 1995. Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Edited by Patricia Cunniff.. 2 vol.
- ASPINALL, G.O ; JIANG, K.S. 1974. Rapeseed hull pectin. **Carbohydrate Research** , Amsterdam, v.38, p. 247-255.
- AXELSSON, L.T. 1993. **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. In: Salminen, S e von Wright, A . (Eds). "Lactic acid bacteria". Marcel Dekker, Inc. N.Y. pp 1-63.
- BARKER, S. A ; BOURNE, E.J.; BRUCE, G.T.; STACEY, M. 1958. Immunopolysaccharides. Part XI. Structure of an *Acetobacter capsulatum* dextran. **Journal of Chemical Society**, London v.13 ,p. 4414.
- BEVAN, D. ; BOND, J. 1971. Microorganisms in field and mill - a preliminary survey. **Proc.-Queensland Society Sug Cane Tech.** 1971: p.137-143.
- BHATNAGAR, R; PRABHU, K.A . 1978. Effect of disinfectants on dextran producing *Leuconostoc* bacteria . In "Proc. Fifty Joint Conv. "FSTA (1978) 10 10L702.
- BLAKE, J.D.; CLARKE, M.L. 1984 a . A water soluble polysaccharide from stand-over cane.3. Studies on the measurement of sarkaran. **International Sugar Journal** , Glamorgan, v. 86, p. 255-259.

- BLAKE, J.D.; CLARKE, M.L. 1984 b . A water soluble polysaccharide from stand-over cane. 4. Studies on the physical properties and origin of sarkaram. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v 86, p.276-279.
- BLAKE, J.D.; LITTLEMORE, J. 1984 a . A water soluble polysaccharide from stand-over cane. 1. Isolation and structural characterization from the field. *International Sugar Journal* , Glamorgan , v.86, p.222-226.
- BLAKE, J.D.; LITTLEMORE, J. 1984 b . A water soluble polysaccharide from stand-over cane. 2. Isolation and structural characterization from molasses. *International Sugar Journal*, Glamorgan , v. 86,p. 235-240.
- BLAKENEY, A.B.; HARRIS, P.J.; HENRY, R. J.; STONE, B.A.. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analyses. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v.113, p. 291-299.
- BOBBIO,F.O.; BOBBIO, P.A. 1995. *Introdução à química de alimentos*. 2ª. ed., São Paulo, Livraria Varela. 223p.
- BOTTAZZI, V. 1988. An introduction to rod-shaped bacteria. *Biochemie*. v. 70, p.303-315.
- BOURNE,E.J.; SIDEBOTHAM,R.L.; WEIGEL, H. 1972. Types and percentages of secondary linkages in the dextrans elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v.22, p. 13-22.
- BRUIJN, J. 1966. Deterioration of sugar cane after harvesting. 1. Changes in juice composition. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v. 68, p. 331-334.
- BRUIJN, J. 1970. Deterioration of sugar cane after harvesting. 3. Enzymatic hydrolysis of the polysaccharide formed. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v .72, p.195-198.
- CARPITA, N.C.; SHEA, E.M. 1990. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (CG-MS) of partially methylated alditol acetates. In: *Analyses of Carbohydrates by GLC and MS*. Edited by Biermann, C.J.; McGinnis, G.D. CRC Press Inc. Boston, 2ª.ed.
- CASTILLO , E.; ITURBE, F.; LOPEZ-MUNGUÍA, A.; PELENC, V.; PAUL, F.; MONSAN, P. 1993. Dextran and oligosaccharide production with glucosyltransferase from different strains of *Leuconostoc mesenteroides*. *Ann. N.Y. Acad. Science*, New York, 672, p.425-430.
- CERNING, J. 1990. Extracelullar polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Rev.* v.87, p. 113-130.

- CHAPLIN, M.F.; KENNEDY, J.F. 1986. **Carbohydrate analysis-a practical approach serie. N°2.** IRL Press. Oxford - England 226p.
- CHERYAN, M.; MEHAIA, M.A. 1983. A high performance membrane bioreactor for continuous fermentation of lactose to ethanol. **Biotechnology Letters, Kew, v.5, n.8, p.519-524.**
- CHOPLIN, L. ; SABATIE, J. 1986 The effect of synthesis temperature on the rheological properties of microbial culture research **Biotechnology Letters , Kew, v.6, p.425-430.**
- CHOU, C.C.; WNUKOWSKI, M. 1980. Dextran problem in sugar refining: a critical laboratory evaluation. **Proc. Tech. Sess. Cane Sugar Refining Research, 1980, p.1-25.**
- CLARKE, M.A ; ROBERTS, E.J; GODSHALL, M.A , BRANNAN, M.A.; CARPENTER, F.G.; COLL, E.E. 1980. Sucrose loss in the manufacture of cane sugar. **Sugar y Azucar , Engliword, v.75, p.64-68.**
- COLLINS, E.A . 1973. **Experiments in polymer science.** A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons, New York., 530 p.
- COOL, E.E.; CLARKE, M.A .; ROBERTS, E.J., 1978. Dextran problems in sugar production. **Proc. Tech. Sess. Cane Sugar Refining Research, p. 92-108.**
- COPERSUCAR, DIVISÃO INDUSTRIAL 1983. Microbiological control in sugar and alcohol manufacture. **Boletim Técnico Copersucar , São Paulo, p. 22-23, 2-17.**
- COREY, E.J.; CHAYKOVSKY, M. 1962. Methylsulfanylcarbanion. **Journal of Americam Chemical Society, Easton, v. 84, p. 866**
- COVACEVICH, M.T.; RICHARDS, G.N. 1977. Studies on dextran isolated from raw sugar manufactured from deteriorated cane. I. Isolation, purification and structure of the dextrans. **International Sugar Journal, Glamorgan, v. 79, n.937, p. 3-9.**
- CREMATA, J.A .; OROZCO, L.R.. 1980. A new polysaccharide isolated from high viscosity final molasses: structural study. **Proc. International Society Sugar Cane Techn. 17, 2546-2555.**
- DAY, D.F. 1984.. Dextran control in the sugar house. **Sugar Journal, New Orleans, v.46, n.10, p. 16-17.**

- DE VOS, W.M. 1996. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology Serology, Amsterdam**, v.70, p.223-242.
- DOCO, T; WIERUZESKI, J.M.; FOURNET, B. 1990. Structure of an exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 198, p.313-312.
- DOMAN, K.; ROBYT, J.F. 1994. Production and selection of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* constitutive for glucansucrase. **Enzyme and Microbiology Technology, Surrey**, v.16, n.8, p. 659-664.
- DOMAN, .K.; ROBYT, J.F. 1995. Dextransucrase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. **Enzyme and Microbiology Technology** , Surrey, v.17, n.12, p. 1050-1056.
- DYKES, G.A ;GEORNARAS, I.; HOLY, A .1995. Advantages of sucrose-dependent extracelular polysaccharide production to lactic acid bacteria in sucrose rich medium. **Letters in Applied Microbiology**, Blackwell, v.21, n.5, p.327-329.
- EGAN, B.T. 1966. Some effects of sugar storage rot on cane juice quality. **Proc. Qd. Society Sugar Cane Technology 33rd Conf.** P. 11-20.
- EGAN, B.T. 1971. Post harvesting deterioration losses in sugar cane. **Sugar Journal**, New Orlenas, v.33, n.9, p.9-13.
- EGAN, F.A. 1983. Lactic acid of meat and meat products. **Antonie Van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology Serology**, Wageningen, v.49, p.327-336.
- ELGAL, G.M. 1982. Minor constituents of sugar and filtration.. **Proc. Sugar Process.Research Conf.**, p.104-117.
- EVANS, T.H.; HIBBERT, H. 1946. Bacterial polysaccharides. In **Advances in carbohydrate chemistry**, 2, 203-233. Academic Press, Inc., New York.
- FARHATULLAH, 1982. Invisible sugar losses caused by microbial activity. **Pakistan Society of Sugar Technology**, v.18, p.245-265
- FERENCI. T.; LEE, K.S.1991. Recovery of bacteria from growth media by starch-dependent floc formation. **Biotechnology and Bioengineering.**, New York, v. 38, n. 3, p. 314-318.
- FERNANDEZ, E.A.N.; BACCHI, M.A.; FERRAZ, E.S.B. 1993. Sugar cane mill wear investigation using a nuclear analytical technique (INAA). **International Sugar Journal**, Glamorgan, v.95, n.1129,p. 33-36.

- FISHER, D.K. ; THOMPSON, D.B. 1997. Retrogradation of maize starch after thermal treatment within and above the gelatinization temperature ranges. **Cereal Chemistry**, St Paul, v. 74, n,3, p.344-351.
- FOSTER, D.H.; INKERMAN, P.A ; McNEIL, K.E.1980. Studies on cane deterioration in Australia. **Proc. International Society Sugar Cane Techn.** 17, p. 2204-2220.
- GALLI, A.; FIORI, E; FRANZETTI, L; PAGANI, M.A; OTTOGALLI, G. 1995. Microbiological and chemical composition of "sugar" kefir grains. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, Milano, v.45, n.1, p.85-95.
- GALLO, C.R. 1990. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e dornas de fermentação alcoólica**. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. 388p. Tese (Doutorado em Ciências de alimentos).
- GALVEZ M.A; LOPEZ-MUNGUIA, A . 1991. Production and characterization of a dextranase from an isolated *Paecilomyces lilacinus* strain. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.36, n.3, p.327-331.
- GANCEL,F.; NOVEL, G. 1994. Exopolisaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp *termophilus* culture research 1. Conditions of production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.77, n. 685-688.
- GANOUE, P.B.; FAHRASMANE, L.; PARFAIT, A . 1987. *Bacillus* spp. in sugar cane fermentation media. **Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology**, Bruxelas, v.42, n.6, p. 192-194.
- GIRAFFA, G. 1994. Microbial polysaccharides produced by lactic acid bacteria in the dairy industry. **Industrie Alimentari** , Pinerolo, v.33, n. 324, p.295-298.
- GREENFIELD, P.F.; GERONIMOS, G.L. 1978. Effect of dextrans on the viscosity of sugar solutions and molasses. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v.80, p. 67-72
- GROBBEN,G.J; SIKKEMA,J.; SMITH,M.R.;BONT-JAM, D. 1995. Production of extracelular polysaccharide by *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* NCFB 2772 grown in a chemically defined medium. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.79, n.1, p. 103-107.
- GUILART, B.; CUERVO, R. ; RODRIGUEZ, L.; PACHECO,N. 1988. Isolation and characterization of dextranase-producing microorganisms. **Cuba-Azucar**. July/Sept. 13-18.

- GUPTA, A. ; PRABHU, K.A .1993. Control of Leuconostoc contamination in the sugar industry. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v.95, n.1137, p. 356-358.
- HAN, Y.W.; SCHUYTEN, H. A.; CALLIHAN, C.D. 1971. Combined effect of heat and alkali in sterilizing sugarcane bagasse. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 36, n.2, p.335-338.
- HAN, Y.W. ; WATSON, M.A . 1992. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane and beet molasses. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 9, n.3/4, p.257-260.
- HARRIS, P.J.; HENRY, R. J.; BLAKENEY, A.B.; STONE, B.A.1984. An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.127, n.1, p.59-73
- HEHRE, E.J.1941. Production from sucrose of a serologically reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract. **Science**, New York, v.93,p.237.
- HEHRE, E.J 1956. Natural synthesis of low molecular weight (clinical type) dextran by a streptococcus strain. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.222, p. 739-750.
- HENRY, R. J; HARRIS, P.J.; BLAKENEY, A.B.; STONE, B.A. 1985. Separation of alditol acetates from plasticizers and other contaminants by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.262, p. 249-256.
- HERRERA, V.E.; AXCELL, B.C.1991. Induction of premature yeast flocculation by a polysaccharide fraction isolated from malt husk. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 97, n.5, p. 359-366.
- HIDE, P.; KENIRY, J.S.; MAHONEY, V.C. 1976. Observations on the occurrence and nature of polysaccharides in sugar cane. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 39, n. 2, p.25-31
- IMRIE, F.K.E. ; TILBURY, R. H. 1972. Polysaccharides in sugar cane and its products. **Sugar Technology Review**, Amsterdam, v.1, p. 291-361.
- IRVINE, J.E. 1981. Field origins of dextran and other substances affecting sucrose crystallization. **Proc. Tech. Session Cane Sugar Ref. Research**, 1980, 116-120.
- ITAYA, K.; YAMAMOTO, T. 1975. Dextranase as an enzyme associating with alkaline earth metal ions. **Agricultural of Biological Chemistry**, Tokyo, v. 39, p. 1187-1192.

- JACOBSON, M.R; OBANNI, M; BEMILLER, J.N. 1997. Retrogradation of starches from different botanical sources. **Cereal Chemistry**, St Paul, v.74 , n.5. p.511-518.
- JANKOWSKI, T. 1992. Influence of starch retrogradation on the texture of cooked potato tuber. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxfordshire, v. 27, n.6. p. 637-642.
- JEANES, A .; HAYNES, W.C.; WILHAM, C.A.; RANKIN, J.C.; MELVIN, E.H.; AUSTIN, M.J.; CLUSKEY, J.E., FISHER, B.E.; TSUCHIYA, H.M. ; RIST, C.E. 1954. Characterization and classification of dextran from ninety-six strains of bacteria. **Journal of American Chemical Society**, Easton, v. 76, p. 5041-5052.
- JEANES, A .; HAYNES, W.C; WILHAM, C.A. 1956. Characterization of dextrans from four types of *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.71, p.161-173, 1956.
- JEANES, A . 1966. **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**, John Wiley and Sons Inc. vol 4 p 805-824. Wiley-Interscience, N.Y.
- JEANES, A .1977. Dextrans and pululans: Industrially significant α -D-glucans. **ACS Symp. Ser. No 45: 284-298.**
- JUMING, T.; TUNG, M.A.; YANYIN, Z. 1996. Compression strength and deformation of gellan gels formed with mono and divalent cations. **Carbohydrate Polymer**, Barking, v.29, n.1, p. 11-16.
- KABOLI, H.; REILLY, P.J.1980. Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. . 22, p.1055-1069.
- KAJI, D.A .1989. **Influência da temperatura e infecção láctica na fermentação alcoólica.** Campinas, Tese de Mestrado, Faculdade de engenharia de alimentos, UNICAMP.
- KAWAHARA, S.; YOSHIKAWA, A.; HIRAKI, T.; TSUTSUMI, A. 1996. Interactions of paramagnetic metal ions with gellan gum studied by ESR and NMR methods. **Carbohydrate Polymer**, Barking, v.30, n.2/3, p.129-133.
- KEMP, P.J. 1983. Methods of dextran determination to aid cane sugar recovery and quality. **Hawaii Sugar Technology**, Honolulu, v.41, p.148-153.

- KENERY, J.S.; LEE, J.B., DAVIS, C.W. 1967. Deterioration of mechanically harvested chopped-up cane. Part I. Dextran - a promising quantitative indicator of the processing quality of chopped-up cane. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 69, p.330-333.
- KEPEC, M.1996. Application of quaternary ammonium compounds and formalin as disinfectants in sugar production. **Food Technology and Biotechnology**, New York, v. 34, n. 2/3, p. 101-105.
- KITCHEN, R. A .1988. **Polysaccharides of sugarcane and their effects on sugar manufacture** . Chemistry and processing of sugarbeet and sugarcane. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam , Netherlands.
- KIM, D.; ROBYT, J.F. 1996. Properties and uses of dextransucrases elaborated by a new class of *Leuconostoc mesenteroides* mutants. **Biotechnology Progress**, New York, v.12, p.125-144.
- KIRBY, L.K.; KINGSTON, G. 1978. Inorganic ash and cane topping. **Proc. Qd. Society Sugar Cane Technology** 42: 263-269.
- KOBAYASHI; M.; MATSUDA, K. 1974. . The dextransucrase isoenzymes of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. **Biochemica Biophysics Acta**, Amsterdam, v.370, n.2; p.441-449.
- KOEPSEL, H.J. ; TSUCHIYA, H.M. 1952. Enzymatic synthesis of dextran. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 63 , p.293:295.
- KUHN, R.; TRISCHIMANN, H.; LOW, I. 1955. Zur permethylation von zuchern und glykosiden. **Angew Chem.** v.67, p.32
- KUMAR, S.; KUMAR, D.; SINHA, R.N. 1989. Changes in yield attributes, juice quality and mineral nutrients in cane juice due to smut infection. **Indian Sugar**, Calcuta, v.39, n.4, p. 233-237.
- KURANE, R.; TAKEDA, K.; SUZUKI, T.. 1986. Screening for and characteristics of microbial flocculants. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, V 50, n.9, p. 2301-2307.
- LANDON, R.S.; WEBB, C. 1990. Separating enzyme (dextransucrase) production and product (dextran) synthesis within a traditional fermentation process. **Process Biochemistry**, London, v.25, n.1, p. 19-23.
- LANDON, R.S.; LAW, R.C.S.; WEBB, C. 1993. Fermentation broth rheology during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512(F) as a possible tool for control. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.40, n.2/3, p.251-257.

- LANDON, R.S.; HUDSON, I.H.; KRAMER, W.; WEBB, C. 1994. A model off dextranucrase synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. **Food Bioproducts Process**, Chicago, v. 72, n.4, p.209-215.
- LAPPAN, R.E. ; FOGLER, H.S. 1994. *Leuconostoc mesenteroides* growth kinetic with application to bacterial profile modification. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.43, n. 9, p.865-873.
- LAZIC,M.L.; VELJKOVIC, V.B.; VUCETIC, J.I.; VRVIC, M.M. 1993. Effect of pH and aeration of dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* . **Enzyme and Microbiology Technology**, Surrey, v. 15, n. 4, p. 334-338.
- LEATHERS, T.D.; AHLGREEN, J.A.; COTE, G.L. 1997. Alternansucrase mutants *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-21138. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Boston, v.18, n.4, p.278-283.
- LEGENDRE,B.L.; TSIANG,W.S.C.; CLARKE,M.A . 1984. Changes in juice composition of sugarcane as affected by post-freeze deterioration in Louisiana. **Proc. Sugar Process.Research Conf.**p.92-107.
- LEONARD, G.J.; RICHARDS, G.N. 1969. Polysaccharides as causal agents in production of elongated sucrose crystals from cane juice. **International Sugar Journal** , Glamonger, v.71, p.263-267.
- LIMA, U.A.;AQUARONE, E.; BORZANI, W. 1982. **Produção de polissacarídeos**. In: Tecnologia das Fermentações. Ed. Edgard Blucher, São Paulo, 285p.
- LINDBERG, B.; SVENSSON, S. 1968. Structural studies on dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512. **Acta Chemica Scandinava**, Copenhagen, v. 22: p.1907-1912.
- LOPEZ, M.; CREMAT, J.A ; HERNANDEZ,M.; RAMOS,E. 1980. Determination of dextran in cane juices. **Cuba-Azucar**, Havana, April/Jun, 3-11.
- LOPEZ, Z.O ; MORENO, I.E.; FOGLIATA, F.A; AYALA, H.G. 1988. Microbial population of sugar juice that is neither affected nor deteriorated by fros. Its realation to alcohol fermentation. **Sugar-y-Azucar**, Engliword, v.83, n.9, p.21,24,26,27,30,31,34.
- LUCCA, A . J. de II; KITCHEN, R.A; CLARKE, M.A ; GOYNES, W.R. 1992. Mesophilic and termophilic bacteria in a cane sugar refinery. **Zuckerindustrie** , Berlin, v.117, n.4, p. 237-240.
- MADHU,K.; PRABHU,K.A . 1983. Use of dextranase as clarifying agent in cane juice. **International Spec. Symp. Yeasts(1983) 8 Meet.**, A156.

- MANCA DE NADRA, M.C.; STRASSER DE SAAD, A .M. 1995.
Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine.
International Journal of Food Microbiology, Amsterdam v. 27, n. 2/3, p.
101-106.
- MAUCH, W.; FARHOUDI, E. 1980. Quality factors in commercial white
granulated sugar. *Sugar Technology Review*, Amsterdam, v.7, p.87-171.
- McCLESKEY, C.S.; FAVILLE, L.W.; BARNETT, R.O. 1947. Characteristics of
Leuconostoc mesenteroides from cane juice. *Journal of Bacteriology*,
Washington, v. 54, p.697-708.
- McCURDY, R.D.; GOLFF, H.D.; STANLEY, D.W.; STONE, A.P. 1994.
Rheological properties of dextran related to food applications. *Food
Hydrocolloids* , Oxford, v. 8, n.6, p. 609-623.
- McLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D.B. 1989. **The Wiley - NBS registry of
mass spectral data**. A wiley-Interscience publication. John Wiley & Sons.
New York.
- MISAKI, A; TORII, T; SAWAI, T; GOLDSTEIN, I 1980. Structure of the
dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Carbohydrate Research*,
Amsterdam, v. 84, n.2,p. 272-285.
- MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHIMARI, K. 1996. Rheological and thermal
studies of gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions.
Carbohydrate Polymers, Barking, v.30, n.2/3,p:109-119.
- MOINAS, M; HORISBERGER, M; BAUER, H. 1980. The structural
organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and
transmission microscopy. *Archives of Microbiology*, Berlin, v.128, n.2,
157-161.
- MORRISON, R.T.; BOYD, R.N. 1973. **Química orgânica**. 7ª. edição. Fundação
Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1498p.
- MORO du BOIL, P.G. 1997. Effects of frost on cane quality and processing. A
survey of the literature. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v. 99,
n.1181, p. 238-241, 1997.
- MORRIS, V.J. 1992. Bacterial polysaccharides for use in food and agriculture.
Biotechnology Polymers , p.135-146
- MOZZI, F.; SAVOY-DE-GIORI, G; OLIVER, G; FONT-DE-VALDEZ, G, 1996.
Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under

different growth conditions. **Milchwissenschaft** 51, Munchen , v. 12, p. 670-673

- MURPHY, P.T. ; WHISTLER, R.L. 1973. **Dextran in industrial gums: Polysaccharides and their derivatives.**1973:: 513-542. 2nd edition. Academic Press. New York.
- NAKAJIMA , H; HIROTA, T; TOBA,T ; ADACHI, S. 1992. Strucutre of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subs *cremoris* SBT 0495. **Carbohydrate Research**, Amsterdan, v.224, p. 245-253.
- NAKAMURA, J.; MIYASHIRO, S.; HIROSE, Y. 1976. Screening, isolation and some proprieties of microbial cell flocculants. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v.40, n.2, p. 377-383.
- NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. 1977. **Infrared absorption spectroscopy.** 2nd. Ed. Holden Day Inc., San francisoc, 286p.
- NOVAK, L.J.; WITT, E.E.; HILER, M.J. 1955. Dextran and dextran products as soil-conditioning materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New York, v.3, n.12, p. 1028-1033..
- OLIVEIRA, O . C. ; URQUIAGA, S.S.; BODDEY, R. M. 1995. La quema de la caña: efectos a largo plazo. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 97, p.384-387.
- OHTSUKA, A. ; WATANABE, T. 1996. The network estrucutre of gellan hydrogels based on the structural parameters by the analysis of the restricted diffusion of water. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.30, n.2/3, p.135-140.
- PALMIERE, M.C.; GREENHALF, W.; LALUCE, C. 1996. Efficient flotation of yeast cells grown in bath culture. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.50, n.3, p. 248-256.
- PAZUR, J.H. 1986. Neutral polysaccharides. In: **Carbohydrate Analysis.** Edited by M.F. Chaplin & J.F. Kenedy. IRL Press, Oxford. 228p.
- PEREZ-OSGUERA, M.A ; GUERRECA, L.; LOPEZ-MUNGUIA, A . 1996. Proprieties of levansucrase from *Bacillus circulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlim, v. 45, n.4, p. 465-471.
- PIDOUX, M; BRILLOUET, J.M; QUEMENER, B. 1988. Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary kefir grains. **Biotechnology Letters**, Kew, v.10, n.6, p.415-420.

- PIDOUX, M; MARSHALL, V.M; ZANONI, P; BROOKER, B. 1990. Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, v.69, n.3, p. 311-320.
- PRAT, D; VALDIVIA, L.A; MONSAN, P; PAUL, F.; LOPEZ-MUNGIA, C. A. 1987. Effect of borate ions on dextransucrase acceptor reaction. *Biotechnology Letters*, Kew, v.9, n.1, p.1-6.
- RAVELO, B.S.; RAMOS, S.; MEJIAS. 1991a. Sugar cane deterioration and its implications in the factory. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v. 93, n.1108, p. 82-86.
- RAVELO, B.S.; RAMOS, S.; TORRES, P.B.M. 1991b. Inhibition of oligo- and polysaccharide formation during sugar cane deterioration. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v. 93, n.1113, p.180-183.
- RAVELO, B.S.; RAMOS, S.; TORRES, P.B. 1991c. Comparison of the main methods of predicting sugar cane deterioration. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v.93, n.1109, p.99-102.
- RIFFER, R. 1983 Na enzyme electrode for dextran analysis. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v 85, n.1013, p.131-136.
- ROBERTS, E.J.; JACKSON, J.T; VANCE, J.H. 1964. Progress in research on the soluble polysaccharides of sugarcane. *Proc. Tech. Sess. Cane sugar Refining Research* 76-74.
- ROBERTS, E.J.; CLARKE, M.A.; GODSHALL, M. A.; PARRISH, F.W. 1985. A glucan from sugarcane. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v.87, p. 227-231.
- ROBIJN, G.W; THOMAS, J.R; HAAS, H; BERG, D.J.C-VAN-DEN; KAMERLING, J.P; VLIAGENTHART, J.F.G. 1995. The structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v.276, n.1, p. 137-154.
- ROBIJN, G.W; GUTIERREZ-GALLEGO, R; BERG, D.J.C.-VAN-DEN; HAAS, H; KAMERLING, J.P; VLIAGENTHART, J.F.G. 1996a. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v 288, n.1, p. 203-218.
- ROBIJN, G.W; WIENK, H.L.T; BERG, D.J.C.-VAN-DEN; HAAS, H; KAMERLING, J.P; VLIAGENTHART, J.F.G. 1996b. Structural studies of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus paracasei* 34-1. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 85, n.1, p.129-139

- ROBYT, J.F. ; WALSETH, T.F. 1978. The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* B-512(F) dextransucrase. **Carbohydrate Research**, Amsterdam , v.61, p.433-445.
- ROBYT, J.F. ; WALSETH, T.F. 1979. Production, purification and proprieties of dextran-sucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 68, n.1; p. 95-111.
- ROBYT, J.F.1995. Mechanisms in the glucansucrase synthesis of polysaccharides and oligosaccharides from sucrose. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry** , New York, v.51, p. 133-168.
- ROLLER, S ; DEA, I.C.M. 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v.12 , n.3, p.261-277.
- SABATIE, J; CHOPLIN, L; PAUL, F; MONSAN, P. 1986 Shear-induced structure in enzymatically-synthesized dextran solutions. **Rheologica Acta**, Darmstadt, v.25, p.287-295.
- SAENG-ON, B.; DAENGSUBHA,W. 1984. Bacteria in sugar cane juice processed in Thailand **Kasetsart Journal**, v.18, n.3, p. 153-161.
- SAI, P.B.K.; RAM, M.M.; BAPU, R.S. 1995. Trace metals in cane juice and sugar factory products. Analyses by direct current plasma atomic emission spectrometry. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 97, n.1160, p. 362- 369.
- SAINZ, H.T.; JACINTO,H.L.; RAMOS, M.M. 1984. Microorganims in the raw cane sugar refining process. **Centro-Azucar**, v.11, n.1, p.91-96
- SAMANIEGO, R.L.; GONZALES,-GAPUD, V.S.1981. The effect of sucrose concentration, pH and incubation period on crude dextran synthesis using sugar cane molasses. **Proc. Phillipine Sugar Techn. Conv.** v.27, p.131-157.
- SAPPORO- BREWERIES. 1991. Preparation of dextran with cytostatic activity. Patent EP n°459367 - 04 Dez de 1991, appud cd room FSTA, AN: 92-02033.
- SCHNEIDER,F.; REINEFELD,E.; THIELECKE,K. 1971. Determination of dextran and levan in techical sugar juices. **Zucker**, Hamburg, v. 24, n.6, p.153-158.
- SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOSO, M.T.; VICENTE, A.L. 1976. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.93, n.6, p. 336-341.

- SEYMOUR, F; KNAPP, R; CHEN, E.; BISHOP, S; JEANES, A . 1979. Structural analyses of *Leuconostoc mesenteroides* containing 3-O- α -D-glucosylated α -D-glucosyl residues in both linear-chain and branch-point positions, or only in branch positions, by methylation and by C-NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, Amsterdam, v. 74, p.41-62.
- SHARMA, S.C.; GUPTA, N.S. 1969. Studies on the chemical composition of juices from different portions of BO50 and BO17 varieties of cane with age. *Proc. All Sugar Technology 3*: A6.1-A6.15.
- SHARMA, S.C.; JOHARY, P.C.; RAO, G.S.C. 1979. Some observations on the chemical composition of the cane juices of different promising varieties grown in North Bihar conditions and their clarification characteristics. *Indian Sugar* v. 23, n.3, p.141-147.
- SHEIKH, N.M. ; HORSAIN, M.1975. Production of dextran from sucrose by *Leuconostoc mesenteroides*. *Bangladesh Journal of Scientific Industrial Research* v.10, n.1/2, p. 80-83.
- SINGH, G. ; SINGH, S. 1975. Effect of freezing temperature on quality indicators of juice in sugarcane. *International Sugar Journal*, Glamorgan, v. 77, p.131-132.
- SIDEBOTHAM, R.L. 1974. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press Inc.: New York, 1973, p. 513-542.
- SILVA, N. da ; CANHOS, V.P. 1990. Characterization of the contaminant bacterial microflora of sugar cane juice in alcohol production. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos* , Campinas, v.20, n. 1, p.60-72.
- SIMON, P.; MEUNIER, R. 1970. *Microbiologie industrielle et gene biochemie*. Paris, Masson. p495.
- SMITH, E. 1970. Biosynthetic relationships between soluble and insoluble dextrans produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 12, p.33-37.
- SMITH, M.R.; ZAHNLEY, J. GOODMAN, N. 1994. Glucosyltransferase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington , v. 60, n. 8, p. 2723-2731.
- STANIER, R.Y., INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L.; PAINTER, P.R. 1986. *The microbiol world*, New Jersey 5^a.ed., Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 689p.

- STEPHEN, A .M. 1995. **Food polysaccharides and their applications**. Edited by Alistair M. Stephen, New York, M. Dekker, 654p.
- STINGELE, F; LEMOINE, J; NEESER, J.R 1997. *Lactobacillus helveticus* Lh59 secretes an exopolysaccharide that is identical to the one produced by *Lactobacillus helveticus* TN-4, a presumed spontaneous mutant of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.302 n. 3/4, p. 197-202.
- STRATFORD, M. 1996 Yeast flocculation: restructuring the theories in line with recent research, **Cerevisia** , Aartselaar, v.21, n.1, p. 38-45.
- STRAVER, M.H.; TRAAS, V.M.; SMITH, G.; KIJNE, J.W. 1994. Isolation and partial purification of manose-specific agglutinin from brewer's yeast involved in flocculation. **Yeast**, Davis, v.10, n. 9, p. 1183-1193.
- SUTHERLAND, D.N.; PATON, N. 1969. Dextran and crystal elongation: further experiments. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 71, n. 845, p. 131-135.
- SUTHERLAND, I.W. 1985. Biosynthesis and composition of Gram-positive bacterial extracellular and wall polysaccharides. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.39,p. 243-270.
- TAKAGI, H.; KADOWAKI, K. 1985. Purification and chemical proprieties of a flocculant produced by *Paecilomyces*. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v. 49, n.11, p. 3159-3164.
- TANG,J; TUNG,M.A; ZENG,Y. 1995. Gelling temperature of gellan solutions.IFT Annual Meeting 1995. Dep. of Agric. Eng., S. Dakota State Univ., Brookings, SD 57007, USA
- TANRISEVEN, A ; ROBYT, J.F. 1993. Interpretation of dextransucrase inhibition at high sucrose concentration. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 245, n.1, p. 97-104.
- TECANTE, A ; LOPEZ-MANGUIA A ; GARCIA-REJON, A . 1986 Rheological characterization of dextran-enzymatic synthesis media. **Journal of Applied Polymer Science**, New York, v.31, p.2337-2350.
- TILBURY, R.H. 1971. Dextrans and dextranase. **Proc. of the International Society Sugar Cane Tehnol.. XIV Congress**. October 22- November 5. N. Orleans. Louisiane, USA.

- TILBURY, R.H. 1975. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CARR, J.G. et al. **Lactic Acid Bacteria en beverages and food**. London, Academic Press, p. 177-191.
- TOEDA, K.; KURANE, R. 1991. Microbial flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201. **Agricultural Biological Chemistry**, Tokyo, v.55, n.11, p. 2793-2799
- TSUCHYA, H.M.; KOEPESELL, H.J.; CORMANN, J.; BRYANT, G.; BOGARD, M.O.; FERGER, V.H.; JACSON, R.W. 1952. The effect of certain cultural factors on production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.64, p. 521.
- UENO, M. 1992. **Efeito do brometo de cetiltrimetilamônio no metabolismo e na fisiologia de bactérias e leveduras**. Tese de doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos., Campinas, UNICAMP, 154p.
- VAYSSIER, Y. 1978. Le Kéfir: analyse qualitative et quantitative. **Revue Lait** v. 361, p.73-75.
- VELJKOVIC, V.B.; LAZIC, M.L.; SKALA, D.U. 1988. Studies on dextran fermentation broth rheology. **Enzyme and Microbiology Technology**, Surrey, v. 10, p.686-688.
- VISSER, R.; HOLZAPFEL, W.H.; BEZUIDENHOUT, J.J.; KOTZE, J.M. 1986. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopatogenic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 552-555.
- WATASE, M.; NISHINARI, K. 1993. Effect of potassium ions on the rheological and thermal properties of gellan gum gel. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.7, n.5, p. 449-456
- WHITESIDE-CARLSON, V.; ROSANO, C.L. 1951. The nutritional requirements for *Leuconostoc dextranicum* for growth and dextran synthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 583-589, 1951.
- WHISTLER, R.L. 1972. New developments in water soluble polysaccharides. **Abstracts Papers American Chemical Society** 164: ORLP 81.
- WYNTER, C.V.A.; GALEA, C.F.; COX, L.M.; DAWSON, M.W.; PATEL, B.K.; HAMILTON, D.S.; DE-JERSEY, J.; INKERMAN, P.A. 1995. Thermostable dextranses: screening, detection, and preliminary characterization. **Journal Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 203-212.
- YAMAMOTO, K.; YOSHIKAWA, K.; OKADA, S. 1993. Structure of dextran synthesized by dextrin dextranase from *Acetobacter capsulatus* ATCC 11894. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 57, n. 9, p. 1450-1453.

- YATES, R. A . 1996. Factors that affect the quality of sugarcane. Part I: climate. *International Sugar Journal*, Glamonger, v. 98, n. 1170, p. 280-284.
- YOKOYA, F. 1989. Microbiologia de processo: fermentação. In: EGUCHI, S.Y. et al. *Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool*. Campinas. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, p 1-22.
- YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. 1991. Características da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo v.22, n.1, p. 12-16, 1991.
- ZACCONI, C; DALLAVALLE, P; VESCOVO, M; PARISI, M.G; SCOLARI, G. 1995. Microbiological and chemical characterization of 'sugar grains'. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, Milano, v.45 , n.1, p. 27-36.
- ZAHNLEY, J.C; SMITH, M. R. 1995 Insoluble glucan formation by *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v.61 n.3, p.1120-1123
- ZEDAN, H.H.; EL-TAYEB, O .M.; HASHEM, A .A . 1983. Isolation and identification of dextran-producing microorganisms for Egyptian sugar factories. *Egyptian Journal of Microbiology*, Cairo, v. 18, n. 1/2, p. 191-204.
- ZHANG, W.; PICULLEL, L. NILSSON, S.; KNUTSEN, S.H. 1994. Cation especificity and cation binding to low sulfated carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v.23, n.2, p. 105-110.
- ZHENG, Y.W.; QING, Z.Z.; KONNO, M. ; SAITO, S. 1994. Sol-gel transition of alginate solution by the addition of various divalent cations: a rheological study. *Biopolymers*, New York, v.34, n.6, p.737-746.