

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMERO
SINTETIZADO POR *Sphingomonas capsulata*

ANA LUIZA DA SILVA BERWANGER

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

MARÇO DE 2005

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMERO SINTETIZADO POR *Sphingomonas capsulata*

Ana Luiza da Silva Berwanger

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Francine F. Padilha, D.Sc.
Orientador

Prof. Helen Treichel, D.Sc.
Orientador

Prof. Adilma R. P. Scamparini, D.Sc.

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.

Erechim, 23 de março de 2005

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho a minha mãe Ivone,
companheira incansável de todas as
horas.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto da dedicação e colaboração de muitas pessoas. Mesmo não citando o nome de cada uma delas, deixo registrado aqui, meu sincero agradecimento, aos colegas de laboratório, funcionários da central de materiais (prédios 9 e 11), alunas da graduação que trabalharam voluntariamente neste projeto e professores, que de alguma forma contribuíram para a concretização do mesmo.

Agradeço o estímulo, a amizade e a dedicação de minhas orientadoras Francine Padilha e Helen Treichel.

Aos professores Marco Di Luccio, Rogério Luis Cansian, Eunice Valduga e Silvia Egues, por suas valiosas sugestões, que muito enriqueceram este trabalho.

Aos colegas do mestrado, pela amizade e constante troca de experiências.

Aos bolsistas Alexandre Carvalho e Lindomar Lerin, do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, por sua importante colaboração.

A amiga Claudia Kuiawinski, que sempre incentivou a todos nós.

Aos amigos da Marsul Proteínas Ltda., que apoiaram e entenderam minha decisão de cursar o mestrado.

A URI - Campus de Erechim, por disponibilizar a estrutura e a CAPES, CNPq, FAPERGS e FAPESP pelo apoio financeiro.

A Ivone e Miguel, pelo carinho, apoio e compreensão. Vocês são as pessoas mais importantes pois acompanharam junto comigo todos os momentos, alegres e tristes, durante esses dois anos. A vocês, todo o meu amor.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMERO SINTETIZADO

POR *Sphingomonas capsulata*

Ana Luiza da Silva Berwanger

Março/2005

Orientadores: Francine Ferreira Padilha

Helen Treichel

Biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana, também conhecidos como gomas ou exopolissacarídeos (EPS), que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. Apresentam-se como uma alternativa às gomas tradicionais, com aplicação em ampla faixa de pH e temperatura e um visível interesse por suas propriedades reológicas, sendo utilizados como espessantes, gelificantes e estabilizantes nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química e petroquímica. Glicose e sacarose são citadas como fontes de carbono preferenciais para a produção de biopolímeros, porém, a utilização de resíduos da agroindústria em bioprocessos permite a obtenção de substratos alternativos de baixo custo para processos fermentativos, que reduzem os custos de produção e auxiliam na destinação de resíduos, minimizando problemas ambientais. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de biopolímero a partir de *Sphingomonas capsulata* utilizando meio convencional (sacarose) e industrial (melaço bruto e pré-tratado e resíduo de proteína texturizada de soja), visando a otimização do processo fermentativo e a caracterização do biopolímero obtido. O polímero foi caracterizado

segundo a produtividade e as propriedades reológicas das soluções aquosas e salinas (solução de NaCl 3% e solução de CaCl_2 3%). Para as fermentações conduzidas a 28°C, 208 rpm, 72 h, foram obtidas produtividades de 0,038 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para o meio convencional, 0,240 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para extrato aquoso de resíduo de PTS 6%, 0,190 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para melaço bruto 8% e 0,290 $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ para melaço pré-tratado 8%. As soluções dos biopolímeros apresentaram comportamento pseudoplástico característico, com valores de viscosidade aparente, para soluções aquosas 3%, de 167,16 (goma sintetizada a partir de sacarose 4%) e de 108,86 (goma sintetizada a partir de melaço pré-tratado 8%), para uma taxa de cisalhamento de 13,2 s^{-1} , 25°C.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMER SYNTHESIZED BY *Sphingomonas capsulata*

Ana Luiza da Silva Berwanger

March/2005

Advisors: Francine Ferreira Padilha

Helen Treichel

Biopolymers are microbial polysaccharides, also known as gums or exopolysaccharides (EPS). They present the ability to form gels and viscous aqueous solutions. Such macromolecules may consist in an alternative to conventional gums, with a large working range of pH and temperature, of great interest for their rheological properties. They are applied as thickener, gelifying or stabilizing agents in food, pharmaceutical, chemical and petrochemical industry. Industry wastes represent an alternative source of low cost substrates for bioprocesses, reducing production costs and contributing to waste minimization. This work aimed to study the production of a biopolymer by *Sphingomonas capsulata* using conventional (sucrose) and industrial (raw and pretreated molasses and textured soy protein (TSP) waste) media, seeking to optimize the fermentation process and characterization of the biopolymer. The polymer was characterized based on the productivity and rheological properties of aqueous and saline solutions (3 wt% NaCl and 3 wt% CaCl₂). Fermentations carried out at 28°C, 208 rpm, 72 h, yielded 0.038 gL⁻¹h⁻¹ of polymer using conventional media. When 6% of aqueous extract of TSP was used productivity increased to 0.240 gL⁻¹h⁻¹. The fermentations carried out using 8% of raw

and pretreated molasses yielded $0.190 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ and $0.290 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectively. Aqueous solutions of the biopolymer at 3% presented characteristic pseudoplastic behavior and apparent viscosities of 167.16 (gum produced using 4% sucrose medium) and 108.86 (gum produced using 8% pretreated molasses medium), at a shear rate of 13.2 s^{-1} and 25°C .

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 GÊNERO <i>Sphingomonas</i>	15
2.1.1 CARACTERÍSTICAS.....	15
2.1.2 ANÁLISE GENÔMICA DO DNA DE BACTÉRIAS (RAPD).....	17
2.2 BIOPOLÍMEROS.....	18
2.2.1 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS POR FERMENTAÇÃO.....	22
2.2.2 SUBSTRATOS UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS.....	25
2.2.3 RECUPERAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS.....	29
2.2.4 ESTRUTURA QUÍMICA.....	30
2.2.5 REOLOGIA – VISCOSIDADE APARENTE E VISCOELASTICIDADE.....	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1 MICRORGANISMO.....	38
3.2 METODOLOGIA.....	38
3.2.1 MANUTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO MICRORGANISMO.....	38
3.2.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO MICRORGANISMO POR RAPD.....	39
3.2.2.1 SELEÇÃO DE <i>PRIMERS</i>	39
3.2.2.2 ANÁLISE DE RAPD.....	40
3.2.3 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO.....	41
3.2.4 PRODUÇÃO DE CÉLULAS.....	41
3.2.5 PRODUÇÃO E RECUPERAÇÃO DE POLÍMERO.....	42
3.2.5.1 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO EM MEIO CONVENCIONAL.....	42
3.2.5.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA MEIO CONVENCIONAL.....	43
3.2.5.3 RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO.....	43
3.2.5.4 ESTUDO DE MEIOS INDUSTRIAIS.....	44
3.2.6 ANÁLISE REOLÓGICA DO BIOPOLÍMERO.....	46
4 RESULTADOS.....	47
4.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DA COLÔNIA.....	47
4.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO MICRORGANISMO.....	47

4.3 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO.....	50
4.4 ENSAIOS PARA MEIO CONVENCIONAL.....	52
4.5 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA MEIO CONVENCIONAL.....	54
4.6 ESTUDOS COM MEIOS INDUSTRIAIS.....	58
4.7 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO EM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO.....	63
4.8 REOLOGIA DO BIOPOLÍMERO.....	63
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	83
5.1 CONCLUSÕES.....	83
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MEIOS INDUSTRIAIS.....	94

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana, também conhecidos como gomas ou exopolissacarídeos (EPS), que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA *et al.*, 2003).

Apresentam-se como uma alternativa às gomas tradicionais, com um visível interesse por suas propriedades reológicas, sendo utilizados amplamente como espessantes, gelificantes e estabilizantes nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química e petroquímica (PACE, 1991; MAUGERI, 2001). Exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para definir sua aplicação final. Tais propriedades são determinadas por sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, seu peso molecular médio e sua distribuição (PACE, 1991).

Nas últimas décadas observou-se progressos significativos em relação à identificação, caracterização e utilização de polissacarídeos sintetizados por microrganismos (PADILHA, 1997). Inúmeros biopolímeros têm sido produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana, xantana, curculana, alginato bacteriano, zanflo, gelana, welana, escleroglucana, pululana, celulose bacteriana (SUTHERLAND, 1992; MARTINS & SÁ-CORREIA, 1993; GIAVASIS *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; GIAVASIS *et al.*, 2003; KALOGIANNIS *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2003). Outros, tais como indicana, emulsana, pululana, ciclossóforanas, clairana, diutana vêm sendo estudados, sem ainda terem sua produção em escala industrial (MAUGERI, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001; CHI & ZHAO, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003). Dextrana, xantana e gelana são praticamente ainda os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em larga escala, tendo relevada importância no mercado de gomas (MAUGERI, 2001).

O desenvolvimento de novos produtos, principalmente nas áreas de alimentos e fármacos trará novos desafios para as aplicações de biopolímeros, uma vez que estes deverão suportar técnicas modernas na indústria de alimentos, tais como processamento UHT e a vácuo, microondas, extrusão, e outros, além de novas formulações contendo baixos teores de gordura, sal e calorias (MAUGERI, 2001).

O estudo de novas condições de cultivo e seleção de microrganismos pode representar a descoberta de linhagens mais produtoras e processos mais produtivos. Como exemplo pode-se citar a produção de pululana a partir da levedura *Rhodotorula bacarum* (CHI & ZHAO, 2003) e alterações na composição do meio de cultivo (alta osmolaridade)

promovendo um maior rendimento de succinoglucana a partir de *Rhizobium meliloti* YE-2 (S1) (NAVARINI *et al.*, 1992).

Novos polissacarídeos podem ser obtidos também através da manipulação genética de linhagens já conhecidas. Por exemplo, a manipulação genética de *Xanthomonas campestris* (VANDERSLICE *et al.*, 1989 apud MAUGERI, 2001) e *Acetobacter xylinum* NRRL B42 (MORRIS *et al.*, 1993 apud MAUGERI, 2001) resultou em mutantes que produziram polímeros (xantana e acetana) diferenciados nas cadeias laterais.

Com o propósito de produzir polissacarídeos a partir de alimentos, alguns microrganismos da família *Lactobacteriaceae*, tais como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* H414 estão sendo estudados. Sob o ponto de vista industrial, seu uso pode tornar-se economicamente inviável, devido aos baixos rendimentos e a instabilidade das linhagens que perdem facilmente o caráter mucóide. Por outro lado, a total bio-compatibilidade e o caráter “natural” do produto representam um ponto importante a favor do possível uso em alimentos no futuro (GRUTER *et al.*, 1992, 1993 apud MAUGERI, 2001).

Pode-se citar ainda a pesquisa de biopolímeros que, entre outras propriedades, apresentam potencial de uso em produtos das linhas *diet* e *light* como a clairana, produzida a partir de *Beijerinckia* sp. 7070, (MOREIRA *et al.*, 2003), e a pululana, produzida a partir de *Aureobasidium pullulans* (CHI & ZHAO, 2003).

Um novo biopolímero, chamado de goma diutana, sintetizado por bactérias do gênero *Sphingomonas*, foi recentemente isolado. Ele apresenta propriedades reológicas semelhantes as da goma xantana, porém estas parecem ser potencializadas devido principalmente a diferenciação de peso molecular (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001).

Esta goma tem despertado interesse principalmente na área petrolífera, em substituição à goma xantana, para aplicação em projetos de recuperação terciária de petróleo (EOR), devido às suas desejáveis propriedades físico-químicas como estabilidade em condições salinas, alta viscosidade em soluções aquosas com baixa concentração de polímero e aplicação em ampla faixa de temperatura (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001). Também se mostra interessante para a indústria de alimentos e farmacêutica devido às suas propriedades de formar emulsões estáveis, ter alta viscosidade e melhor estabilidade térmica que outras gomas.

Como se pode verificar, novos polissacarídeos microbianos vêm sendo intensivamente estudados, mostrando um amplo campo de aplicações, nas mais diversas áreas.

A produção de biopolímeros por microrganismos pode ser, em meio líquido contendo fonte de carbono e sais minerais, processo utilizado para a maioria destes, como por exemplo dextrana e xantana, ou por via enzimática, utilizando enzimas purificadas, sem adição do microrganismo (RODRIGUES, 1989 apud PADILHA, 1997).

O rendimento e a qualidade do biopolímero dependem da composição do meio, da linhagem e das condições de fermentação utilizadas (SUTHERLAND, 1983 apud ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a; CASAS *et al.*, 2000).

Glicose e sacarose são citadas como fontes de carbono preferenciais para a produção de biopolímeros (SUTHERLAND, 2002), porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como melaço de açúcar de beterraba (KALOGIANNIS *et al.*, 2003), soro de leite (NITSCHKE *et al.*, 2001), casca de café e bagaço de mandioca (WOICIECHOWSKI, 2001) para a produção de goma xantana; e soro de leite (FIALHO *et al.*, 1999) e resíduo de soja (JIN *et al.*, 2003) para a produção de goma gelana.

A utilização de resíduos da agroindústria em bioprocessos permite a obtenção de substratos alternativos de baixo custo para processos fermentativos, que reduzem os custos de produção e auxiliam na destinação de resíduos, minimizando problemas ambientais.

Considerando o exposto, este trabalho tem como objetivo geral estudar a produção de biopolímero a partir de *Sphingomonas capsulata* e como objetivos específicos estudar meios convencional e industriais pré-tratados ou não para produção de biopolímero em agitador orbital e analisar as propriedades reológicas de viscosidade aparente das soluções aquosas dos biopolímeros a 3% em duas temperaturas (25, 60°C) e das soluções salinas dos biopolímeros (solução de NaCl 3% e solução de CaCl₂ 3%), 25°C. Tais resultados fornecerão subsídios para a ampliação da escala do processo de produção do biopolímero em fermentador de 2L e pela indústria de alimentos.

Os capítulos 1 e 2 deste trabalho, onde constam a introdução e a revisão bibliográfica, procuram fornecer base teórica e resultados obtidos na literatura referentes ao tema proposto. O capítulo 3 apresenta o material e a metodologia analítica utilizada no decorrer do trabalho, enquanto no capítulo 4 encontram-se os resultados obtidos na produção e caracterização do biopolímero estudado. As conclusões e sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no capítulo 5.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo busca-se fornecer embasamento teórico e resultados obtidos na literatura sobre o tema em estudo. Inicialmente fala-se do gênero *Sphingomonas*, citando suas características, e também da análise genômica de bactérias através da técnica de RAPD. Após, são apresentadas noções gerais sobre biopolímeros destacando-se sua importância, produção por fermentação, substratos utilizados, processos de recuperação e caracterização estrutural e reológica.

2.1 Gênero *Sphingomonas*

2.1.1 Características

Este gênero foi classificado em 1983, por Yabuuchi *et al.* e apresenta como características serem Gram negativos; não formadores de esporos; diâmetro de célula de 0,5 µm; com formato de bastão ou cocobacilos retos ou curvos; não têm flagelos, mas algumas espécies podem exibir motilidade em meio semi-sólido; são catalase positivas e oxidase positivas; são quimiorganotróficos, sem necessidade de fatores de crescimento especializados; não produzem indol nem acetilmetilcarbinol; não são proteolíticos nem gelatinolíticos; produzem ácido por oxidação de carboidratos, mas não por fermentação; e as colônias normalmente tornam-se amarelas após vários dias à temperatura ambiente (HOLT *et al.*, 1994).

Muitas espécies de *Sphingomonas* têm sido isoladas de ambientes hospitalares, contudo, a maioria das espécies produtoras de polissacarídeos foi obtida de amostras de solo, rios, água de consumo e tubos de cobre corroídos, bem como da superfície da rizosfera de plantas. A homologia da sequência 16S rRNA permite classificar o gênero *Sphingomonas* na subclasse α -4 das proteobactérias (ASTHAPUTRE & SHAH, 1995b; GIAVASIS *et al.*, 2000).

Algumas espécies não são móveis e não têm metabolismo fermentativo (aeróbios estritos), mas todas contêm uma série de componentes raros, que têm 18 a 21 carbonos e uma cadeia reta saturada, ou diidroesfingosinas monoinsaturadas ou diidroesfingosinas contendo ciclopropano em um glicolípido ceramida. Esse glicolípido contém um ácido graxo 2-hidróxi amida, que é um indicador da composição de lipídeos novos e que pode ser útil no desenvolvimento de um método de isolamento de linhagens de *Sphingomonas* (GIAVASIS *et al.*, 2000).

O conteúdo de guanina + citosina do DNA genômico varia de 61 a 67%. Nenhum éster ou amida ligado a ácidos graxos 3-OH foi detectado no gênero *Sphingomonas*, cuja falta de qualquer componente lipopolissacarídeo em sua membrana celular, contrasta com a maioria das bactérias Gram negativas. O envelope celular consiste de uma membrana celular que inclui proteínas, quinonas respiratórias e fosfolipídeos e outra membrana contendo os glicofosfolipídeos com os grupos carboidratos ligados externamente. Os raros glicoesfingolipídeos, típicos de *Sphingomonas* podem ter um papel análogo àquele dos lipopolissacarídeos encontrados na maioria das bactérias Gram negativas. Embora rara entre os procariontes, esta composição de membrana vista na *Sphingomonas* é totalmente difundida entre os eucariontes (KAWAHARA *et al.*, 1991; GIAVASIS *et al.*, 2000).

Parece que muitos membros da família *Sphingomonas* são associados ao solo. Esta observação e a composição do envelope celular têm conduzido a especulações que a *Sphingomonas* pode estar relacionada aos primeiros eucariontes (GIAVASIS *et al.*, 2000).

Várias fontes de carbono podem ser utilizadas aerobicamente por espécies de *Sphingomonas*, especialmente D-glicose, D-frutose, D-manose, D-galactose, maltose, L-arabinose, gentobiose, metil piruvato, glicogênio, dextrina e celobiose. Uma análise do perfil de ácidos graxos de *Sphingomonas* spp. mostrou que o ácido graxo predominante foi o ácido *cis*-11-octadecenóico (ácido *cis*-vacênico), seguido pelo ácido hexadecanóico (ácido palmítico). Segundo Pollock (1993), a presença do ácido 2-hidroximirístico (2-OH-14:0) foi típica de todas as espécies de *Sphingomonas* testadas até agora (GIAVASIS *et al.*, 2000).

Todas as linhagens produtoras de *sphingans* excretam pigmentos carotenóides amarelos solúveis em metanol (nostoxantinas), diferentes dos pigmentos amarelos produzidos por *Xanthomonas campestris*, que são arilpolienos bromatados (xanthomonadinas). Estes dois pigmentos têm diferentes espectros de absorbância (GIAVASIS *et al.*, 2000).

Algumas linhagens de *Sphingomonas* hidrolisam a esculina, não crescendo em ágar MacConkey, não produzindo indolase ou citocromo oxidase, mas são positivas para a catalase. Elas também são resistentes a 20mg/mL de ampicilina, estreptomicina, kasugamicina ou hidromicina e parcialmente resistentes a kanamicina. Contudo, são sensíveis a níveis similares (20 mg/mL) de rifampicina e vancomicina (GIAVASIS *et al.*, 2000).

2.1.2 Análise genômica do DNA de bactérias (RAPD)

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma variação do PCR (reação da polimerase em cadeia), que consiste na amplificação de seqüências de DNA usando-se *primers* (seqüências iniciadoras) escolhidos sem um prévio conhecimento das bases a serem copiadas. É uma técnica simples que requer pequenas quantidades de DNA, não necessitando o conhecimento prévio da biologia molecular dos organismos a serem estudados, podendo ser aplicada a qualquer espécie. O polimorfismo entre os produtos de amplificação é detectado freqüentemente e o nível de regiões polimórficas é geralmente alto. São úteis como marcadores genéticos e podem ser detectados através do exame de um gel de agarose corado com brometo de etídio (WILLIAMS *et al.*, 1990, 1993; SILVEIRA *et al.*, 2000).

A técnica consiste no anelamento do *primer* com o DNA alvo em ciclos de amplificação a baixa estringência (especificidade), resultando em produtos de amplificação que são característicos de um genoma em particular e denominado *fingerprinting*. Sua alta capacidade discriminatória é útil para estudos epidemiológicos, investigação de fontes de contaminação, relacionamento de isolados de origens diferentes e identificação de isolados diferentes de uma mesma origem e na obtenção de mapas genéticos (WILLIAMS *et al.*, 1990; SILVEIRA *et al.*, 2000).

Porém, são necessários um alto grau de padronização e controle interno para se obter perfis reprodutíveis de DNA. Há muitos parâmetros nos quais pequenas mudanças alteram os perfis. Apesar do conceito da técnica ser simples, esses parâmetros devem estar dentro de limites ótimos para reprodutibilidade; isto é, concentrações adequadas de DNA, magnésio, *primer* e enzima, assim como o número de ciclos. Aumentando-se a seqüência e o tamanho dos *primers* usados para RAPD pode-se obter um número ilimitado de comparações possíveis entre os perfis, aumentando assim seu poder discriminatório (SILVEIRA *et al.*, 2000; ZHOU & JIAO, 2004).

Embora seja recente e apresente suas limitações, a técnica de RAPD tem sido aplicada com resultados satisfatórios para vários microrganismos (SILVEIRA *et al.*, 2000). Por exemplo, Williams *et al.* (1990) utilizaram a técnica do RAPD para analisar o DNA das bactérias *Escherichia coli*, linhagens 037, 641 e 642; *Listeria monocytogenes*, linhagem 681; *Staphylococcus aureus*, linhagem 684 e *Salmonella typhimurium*, linhagem 706, com o objetivo de determinar se *primers* curtos podem ser usados para amplificar segmentos de DNA de genomas pequenos. Eles observaram que genomas tão pequenos como o da

Escherichia coli (4×10^3 kbp) suportam amplificação e que a bactéria pode ser distinguida de acordo com os modelos de bandas de seu DNA sobre um gel de agarose.

Zhou e Jiao (2004) investigaram a contaminação por *Listeria monocytogenes* em alimentos, em mercados chineses, através de análise de RAPD e descobriram que os modelos *fingerprint* gerados por RAPD são fortemente influenciados pela reação de amplificação, preparo do molde de DNA, e pela técnica de separação usada, tal como tamanho e composição do gel e condições de migração, quando é usada a eletroforese. Mostraram que através de padronização rigorosa, o método de RAPD apresenta dados reprodutíveis e que a concentração correta de dNTP, que deve ser selecionada e usada, irá influenciar também na formação de modelos de bandas mais claros e mais polimórficos. Através deste trabalho foi estabelecido um método de RAPD simples, rápido, discriminatório e reprodutível para a sub-tipagem molecular de *Listeria monocytogenes*.

Vários autores citam o RAPD como ideal no estudo do polimorfismo genômico; o método tem sido usado para comparar diferenças intra e inter específicas em bactérias, podendo ser usado tanto em DNA purificado como em extratos de células cultivadas em caldo ou em ágar (WILLIAMS *et al.*, 1990; SILVEIRA *et al.*, 2000).

A principal limitação do uso de marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informações genéticas por loco. Além disso, algumas bandas são de fácil interpretação enquanto outras são ambíguas. Também pode-se citar a não discriminação dos genótipos heterozigotos dos homozigotos e a baixa reprodutibilidade entre laboratórios (WILLIAMS *et al.*, 1990; SILVEIRA *et al.*, 2000).

2.2 Biopolímeros

Biopolímeros microbianos são polissacarídeos produzidos por microrganismos, que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA *et al.*, 2003), mesmo em baixas concentrações.

Muitos microrganismos produzem grandes quantidades de polissacarídeos sob as mais variadas condições. Esses polissacarídeos têm papéis específicos como compostos de armazenamento (glicogênio), compostos estruturais (quitina), mediadores das interações do microrganismo com o meio ambiente (polissacarídeos extracelulares) (PACE, 1991).

A biossíntese de EPS (exopolissacarídeos) está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio ambiente (WILKINSON, 1958 apud MOREIRA, 2002), sendo que esses EPS desempenham diferentes papéis, que incluem: proteger o microrganismo contra desidratação; servir de

barreira, impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular; acoplar e neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuar como fonte de carbono e energia; converter o excesso de substrato em uma massa espumosa que é mais difícil de ser metabolizada por outros microrganismos; interagir com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas (PACE, 1991).

Em relação à origem, as gomas podem ser provenientes de plantas terrestres, subdividindo-se em estruturais (amido, celulose, pectina, etc.), exudatos (goma arábica) e oriundos das sementes (goma guar e locusta); de plantas aquáticas (ágar, carragena); e de microrganismos (dextrana, gelana, xantana, etc.), que recebem a denominação de biopolímeros microbianos (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Os biopolímeros microbianos podem ser divididos em três grandes grupos, segundo sua localização morfológica: intracelulares, integrantes da parede celular e extracelulares (exopolissacarídeos ou EPS) (BLACK, 1993 apud MOREIRA, 2002). Os EPS despertam maior interesse porque podem ser recolhidos diretamente do meio para o qual são secretados.

Polissacarídeos tradicionais, tais como amido, alginatos, goma arábica, goma guar e goma de algaroba são largamente empregados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e química. No entanto, o suprimento, a qualidade e a homogeneidade destes podem, exceção feita ao amido, flutuar, por uma série de motivos, tornando-se, às vezes, um sério problema para as indústrias (MAUGERI, 2001).

Os polissacarídeos obtidos de microrganismos são uma alternativa válida, pois possuem propriedades similares aos tradicionais e, em alguns casos mais vantajosos, por possuírem propriedades específicas que o qualificam para o desenvolvimento de novos produtos. As gomas microbianas não dependem de condições climáticas, contaminação marinha ou falha na colheita, que prejudicam a oferta das gomas tradicionais e, além disso, são menos suscetíveis à variabilidade em sua qualidade, pois sua produção pode ser controlada cuidadosamente. Finalmente, em nível microbiano existem técnicas genéticas que permitirão obter polissacarídeos com propriedades específicas (MAUGERI, 2001). Têm como principal desvantagem o seu elevado custo, o que se deve aos processos de produção que são intensivos em capital e energia (PACE, 1991; MAUGERI, 2001).

A indústria de alimentos é um dos principais consumidores de polissacarídeos, onde estes são aplicados primordialmente como espessantes ou agentes de suspensão e gelificantes. Os polissacarídeos são importantes também por outras propriedades, que incluem emulsificação, estabilização de emulsões, controle de cristalização, inibição de sinérise, encapsulação e formação de filmes (MAUGERI, 2001).

Vários biopolímeros têm sido produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana (produzida por bactérias dos gêneros *Leuconostoc* e *Streptococcus*), xantana (produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*), curculana (produzida pelas bactérias *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes* e *Agrobacterium radiobacter*), alginato bacteriano (produzido por bactérias dos gêneros *Azotobacter*, principalmente *Azotobacter vinelandii*, e *Pseudomonas*), zanflo (produzido pela bactéria *Erwinia tahitica*), gelana (produzida pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*, anteriormente classificada como *Pseudomonas elodea*), welana (produzida por espécies de *Alcaligenes*), escleroglucana (produzida por diferentes espécies de *Sclerotium*), pululana (produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*), celulose bacteriana (produzida pela bactéria *Acetobacter xilinum*) (SUTHERLAND, 1992; MARTINS & SÁ-CORREIA, 1993; GIAVASIS *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; GIAVASIS *et al.*, 2003; KALOGIANNIS *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2003).

Outros biopolímeros que estão em estudo, não sendo produzidos em escala industrial, podem ser citados, tais como: indicana (produzida por *Beijerinckia indica*), emulsana (produzida por *Acinetobacter calcoaceticus*), pululana (produzida pela levedura *Rhodotorula bacarum*), ciclossóforanas (produzidas por *Rhizobium*, *Agrobacterium* e algumas espécies de *Xanthomonas*), clairana (produzida por *Beijerinckia* sp.), diutana (produzida pelo gênero *Sphingomonas*) (MAUGERI, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001; CHI & ZHAO, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003). Até o momento, dextrana e xantana são, praticamente ainda os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em larga escala. A goma gelana é o terceiro polissacarídeo produzido comercialmente por biossíntese microbiana, utilizado na indústria de alimentos (MAUGERI, 2001).

A principal característica dos polímeros é sua capacidade de modificar a reologia de soluções, além de serem, em sua maioria, multifuncionais, isto é, exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para definir sua aplicação final. Tais propriedades são determinadas por sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, seu peso molecular médio e sua distribuição. Os EPS microbianos podem ser polímeros de monossacarídeos aniônicos, neutros e catiônicos ou derivados destes e, frequentemente, contêm grupos laterais como acetato, piruvato, succinato, componentes lipídicos, nitrogênio orgânico ou íons inorgânicos. O grau de substituição destes grupos laterais tem um importante efeito sobre as propriedades dos polímeros (PACE, 1991).

A goma xantana é um polissacarídeo natural e um importante biopolímero industrial. Foi descoberta na década de 1950 e comercializada a partir da década de 1960 (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). É um heteropolissacarídeo produzido por cultivo aeróbio de culturas

de *Xanthomonas campestris*, normalmente pelo pv *campestris* (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001).

Sua aplicação em inúmeros segmentos industriais entre eles alimentos, fármacos, químico, petroquímico deve-se, principalmente, às suas propriedades reológicas que permitem a formação de soluções viscosas a baixas taxas de concentração (0,05-1%) e ampla faixa de estabilidade a pH e temperatura, características conferidas devido à sua estrutura ramificada e seu alto peso molecular (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; SUTHERLAND, 2002). Quando em conjunto com galactomananas (goma guar, goma de algaroba e goma locuste) apresenta aumento sinérgico de viscosidade, formando géis termorreversíveis (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; WANG *et al.*, 2002a; WANG *et al.*, 2002b; PARADOSSI *et al.*, 2002; SUTHERLAND, 2002).

Um problema importante relacionado com a produção de xantana deve-se à instabilidade das linhagens de *Xanthomonas campestris*, resultando em uma variação de peso molecular do polissacarídeo, e do grau de piruvatação e acetilação. Com a identificação dos genes responsáveis pela síntese do polissacarídeo é possível, através de manipulações genéticas, alterar o grau de acetilação, aumentar o grau de piruvatação em 45% e aumentar o rendimento da goma em 20% (MAUGERI, 2001).

A goma gelana foi descoberta em 1978, mas só obteve aprovação do FDA dos EUA para uso em alimentos na década de 1990. É um polissacarídeo extracelular produzido por *Sphingomonas paucimobilis* (ATCC 31461), anteriormente classificado como *Pseudomonas elodea*. (GIAVASIS *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001).

Apresenta propriedades que a tornam atrativa comercialmente tais como: produção de um gel termorreversível quando aquecido e resfriado e solubilidade em água fria, além da possibilidade de formação de géis a frio com o uso de seqüestrantes como o EDTA. É vendida para uso em meios de cultura, como agente gelificante, sob o nome de Gelrite (Kelco). No entanto, tem grande potencial de uso na indústria de alimentos, onde irá concorrer com o ágar na fabricação de confeitos e doces (MAUGERI, 2001; SUTHERLAND, 2002).

Os *sphingans* (goma welana – PS 130, goma ramsana – PS 194, goma diutana – PS 657, e os biopolímeros PS 88, PS 198 e NW 11) são exopolissacarídeos de estrutura semelhante à gelana, produzidos por outras espécies de *Sphingomonas*. Não formam géis, mas podem formar soluções aquosas viscosas de alta estabilidade térmica (GIAVASIS *et al.*, 2000; SUTHERLAND, 2002).

A diutana, também conhecida como S-657, foi apresentada no ano de 2000, pelo grupo de biopolímeros da Kelco na International Association of Drilling Contractors – Society of Petroleum Engineers. É um polissacarídeo extracelular produzido por fermentação aeróbica de linhagens do gênero *Sphingomonas* (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001; DILTZ & ZELLER, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001; SAKATA *et al.*, 2003; WINSTON *et al.*, 2003).

Devido principalmente à diferenciação de peso molecular, as propriedades reológicas da goma xantana parecem ser potencializadas na diutana, o que a torna de extremo interesse para a recuperação terciária de petróleo. Apresenta propriedades tais como alta viscosidade e melhor estabilidade térmica, além de possuir ação emulsificante (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001). Acredita-se que a goma diutana tenha potencial para aplicação também na indústria de alimentos por apresentar propriedades espessantes, estabilizantes e boa estabilidade térmica.

2.2.1 Produção de biopolímeros por fermentação

A produção de biopolímero depende da composição do meio, da linhagem e das condições de fermentação utilizadas, obtendo-se deste modo uma variação nos rendimentos e na qualidade do polímero (SUTHERLAND, 1983 apud ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a; CASAS *et al.*, 2000).

O meio de fermentação típico para produzir a gelana em sua forma potássica, usado pela Kelco, consiste de glicose (30 gL^{-1}), sais e Promsoy (Central Soya, Chemurgy Division, Fort Wayne, Ind.), uma proteína concentrada de soja (KANG *et al.*, 1982; GIAVASIS *et al.*, 2000). Algumas variações deste meio, tais como a substituição de Promsoy por extrato de levedura e MgMoO_4 por NaMoO_4 (MANNA *et al.*, 1996) ou NH_4NO_3 por NH_4Cl ou NH_3 (LOBAS *et al.*, 1992) são citadas. Esses meios são caracterizados por uma alta razão C:N (carbono: nitrogênio), fornecendo um meio complexo e suplementado de vitaminas para melhorar o crescimento celular (GIAVASIS *et al.*, 2000).

Nampoothiri *et al.* (2003) estudaram as necessidades nutricionais para a produção otimizada de gelana em um meio sintético a base de sais, mostrando que o amido solúvel (20 gL^{-1}) foi a melhor fonte de carbono e a triptona (0,5% p/v) a melhor fonte de nitrogênio, e também, que a suplementação do meio de produção com L-treonina (5 gL^{-1}) melhorou ligeiramente a formação de gelana.

O meio de produção ótimo para xantana inclui: sacarose (40 gL^{-1}), ácido cítrico ($2,1 \text{ gL}^{-1}$), sais de amônia, potássio, magnésio, sódio, zinco, ferro e cálcio, ácido bórico e ácido clorídrico concentrado, sendo o pH ajustado para 7,0 (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000;

CASAS *et al.*, 2000). Glicose e sacarose são as fontes de carbono mais freqüentes, usadas em concentrações de 2-4%, pois altas concentrações inibem o crescimento. Nitrogênio pode ser fornecido nas formas orgânica ou inorgânica, sendo que a razão C:N usada no meio de produção deve ser menor que a usada durante o crescimento. Glutamato é a melhor fonte de nitrogênio, usada em concentrações de 15 mM. Pequenas quantidades de ácidos orgânicos adicionados ao meio, melhoram a produção (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Dentre os parâmetros que influenciam a fermentação, podemos citar pH, temperatura, taxas de agitação e aeração e suprimento de nitrogênio. Os valores de pH usualmente recomendados para a produção de gelana variam de 6,5 a 7,0, sendo a maioria das fermentações conduzida a 30°C (KANG *et al.*, 1982; LOBAS *et al.*, 1992; DREVETON *et al.*, 1996; GIAVASIS *et al.*, 2000). Martins e Sá-Correia (1993), estudando os perfis de temperatura da síntese de gelana mostraram que, embora a temperatura ótima de crescimento celular seja 30-35°C, os maiores rendimentos de goma foram obtidos quando a fermentação foi conduzida a 20-25°C (MARTINS & SÁ-CORREIA, 1993; GIAVASIS *et al.*, 2000).

As temperaturas empregadas para a produção de xantana variam de 25-34°C. Shu e Yang (1990) concluíram que a temperatura ótima para a produção de xantana depende do meio de produção usado, sendo esta de 28°C para o meio otimizado por García-Ochoa (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A maioria dos pesquisadores aponta o pH neutro como ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que este decresce para 5,0 durante a produção de xantana, devido aos grupos ácidos presentes no polímero. Um estudo dos efeitos do pH mostrou que seu controle melhora o crescimento celular mas não tem efeito sobre a produção de xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Altas taxas de oxigenação (e agitação) promovem a síntese ótima de gelana, possivelmente porque a maior produção do biopolímero ocorre durante a fase de crescimento do microrganismo. Uma agitação de 250 rpm é adequada para a mistura do caldo de gelana. (GIAVASIS *et al.*, 2000).

A faixa de oxigenação recomendável para a produção de xantana é de 1,5-3,5 mM O₂/L/minuto, e um bom nível de aeração é requerido para se obter uma boa produção de goma em processos fermentativos, uma vez que ocorre grande aumento da viscosidade do meio ao longo da fermentação (WOICIECHOWSKI, 2001).

Na produção de gelana, pode ser interessante usar um meio com nitrato como única fonte de nitrogênio, para reduzir a demanda de O₂ das células e, ao mesmo tempo, garantir uma fermentação prolongada e altamente produtiva (GIAVASIS *et al.*, 2000). Para a produção de xantana, quando são usadas somente fontes de nitrogênio orgânicas, recomenda-se 0,4-0,5% (p/v), e quando nitrato de amônio é empregado como fonte inorgânica de nitrogênio, as quantidades recomendáveis são 0,045-0,09% (p/v) (WOICIECHOWSKI, 2001).

A produção de biopolímeros por microrganismos pode ser realizada em meio líquido contendo fonte de carbono e sais minerais, como visto, ou por via enzimática, utilizando enzimas purificadas, sem adição do microrganismo (RODRIGUES, 1989 apud PADILHA, 1997).

Moreira *et al.* (2003) estudaram a produção de clairana por via enzimática, através de inativação e lise celular e pelo processo convencional com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. Utilizaram o meio YM acrescido de sais de potássio e magnésio, extrato de levedura, triptose e sacarose (50 gL⁻¹), 24°C, 180 rpm, e 54 horas de incubação. Concluíram que é possível produzir o biopolímero via enzimática e que, provavelmente, enzimas intra e extracelulares estão envolvidas, permanecendo ativas no meio e começando a atuar antes de 30 horas de fermentação. Mostraram também que o processo via enzimática através de lise é mais eficiente, pois libera os polissacarídeos produzidos intracelularmente para o meio externo.

O conhecimento das vias biossintéticas, bem como de seus mecanismos de controle é importante para aumentar a eficiência de conversão e a produtividade da fermentação, assim como para alterar o peso e a composição molecular do polímero (PACE, 1991). A goma xantana é o único biopolímero do qual se conhece a via metabólica e a enzima indutora do processo, sendo que para os demais, esta via tem sido apenas sugerida (RODRIGUES, 1989 apud PADILHA, 1997; GIAVASIS *et al.*, 2000; SÁ-CORREIA *et al.*, 2002).

Para muitos microrganismos, a cinética e a eficiência de produção de polímeros, o peso molecular e sua estrutura podem ser afetados por variações nas condições de crescimento. As relações cinéticas entre o crescimento e a formação de produtos são importantes para determinar o modo de operação mais econômico. A velocidade e eficiência de formação de polímero são influenciadas pela natureza dos fatores limitantes de crescimento, assim como por outras variáveis ambientais como oxigênio dissolvido, pH e

temperatura. Variações nos grupos substituintes podem afetar drasticamente as propriedades reológicas do polímero e, portanto, sua aplicação (PACE, 1991).

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração iniciais, intermediários e finais, de um ou mais componentes do sistema de cultivo (biomassa, produtos e substrato), em função do tempo de fermentação, permitindo assim os traçados das curvas de ajuste. Escolhe-se para o estudo cinético o produto de interesse econômico e o substrato limitante, isto é, o valor da concentração inicial de substrato (S_0) que definirá a concentração máxima (X_m) da população microbiana (HISS, 2001).

Uma vez que esses valores de concentração representam parte de um conjunto de dados, necessários ao dimensionamento de uma instalação produtiva, fica evidente que sem o conhecimento da cinética torna-se inviável a transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial. Cabe mencionar que a cinética possibilita também uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo (pH, temperatura, etc.), por intermédio de variáveis como: velocidades de transformação e fatores de conversão, obtidos a partir das curvas de ajuste $X=X(t)$ (biomassa em função do tempo), $P=P(t)$ (produto em função do tempo) e $S=S(t)$ (substrato em função do tempo) (HISS, 2001).

Entretanto, os critérios de comparação entre diferentes condições são relativos, isto é, dependem do que se espera obter de um determinado processo fermentativo. Outro aspecto que merece atenção, é que os métodos comumente utilizados para a medida da concentração celular representam uma informação muito simples do que ocorre em um fenômeno biológico. O microrganismo promove a transformação de substrato em produto através da atividade de enzimas que são sintetizadas pelo próprio microrganismo. Sendo essas sínteses controladas pelo meio externo (fenômenos de indução e repressão), torna-se muito difícil, senão impossível, identificar qual(is) medida(s) são realmente representativas da transformação em estudo; dificuldade esta que ocorre mesmo nos sistemas mais homogêneos (HISS, 2001).

2.2.2 Substratos utilizados na produção de biopolímeros

A literatura cita o uso de glicose e sacarose como fontes de carbono preferenciais para a produção de biopolímeros (SUTHERLAND, 2002), porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como melaço, resíduo da indústria de soja, soro de leite, casca de café e bagaço de mandioca, entre outros (NITSCHKE *et al.*, 2001;

WOICIECHOWSKI, 2001; KALOGIANNIS *et al.*, 2003; JIN *et al.*, 2003; CHI & ZHAO, 2003; BOZA *et al.*, 2004; BAE & SHODA, 2004).

O melaço é um subproduto do processo de produção de açúcar, tanto o açúcar de beterraba quanto o açúcar de cana, sendo definido como um xarope que escoa do estágio final da cristalização do açúcar. É uma das mais econômicas fontes de carbono na indústria microbiana, sendo usado como substrato em fermentações. Apesar de suas similaridades, melaço de beterraba e de cana possuem diferenças significativas com relação aos componentes nitrogenados, açúcares fermentescíveis, cinzas e vitaminas (STOPPOCK & BUCCHOLZ, 1996 apud KALOGIANNIS *et al.*, 2003; KOTZAMANIDIS *et al.*, 2002 apud BAE & SHODA, 2004).

O subproduto do processamento da soja, é uma rica fonte de proteínas, vendido como resíduo, de baixo valor econômico. Dependendo do processo de obtenção, possui também valores significativos de carboidratos; por exemplo, o resíduo do processo de proteína texturizada de soja possui em torno de 28-32% de carboidratos e 50-54% de proteínas (SOY PROTEIN COUNCIL, 1987; MARSUL PROTEÍNAS LTDA, 2004).

O soro de leite, resultante da fabricação de queijos vem sendo estudado como uma fonte alternativa para a produção de goma xantana. A produção diária de soro de leite atinge quantidades muito elevadas e seu descarte representa um sério problema ambiental. Entretanto, possui alto teor de lactose além de proteínas e sais minerais, constituindo um meio de cultura rico e de fácil obtenção (STAUFFER & LEEDER, 1978 apud NITSCHKE *et al.*, 2001).

No processo de beneficiamento do café por via seca, a casca constitui o principal resíduo da industrialização, representando cerca de 50% em massa do café seco (CARDOSO, 1994 apud WOICIECHOWSKI, 2001), e no processo por via úmida gera-se um resíduo aquoso com alto teor de matéria orgânica diretamente fermentescível. A simples disposição no meio ambiente da casca ou da polpa de café resulta no desperdício de uma biomassa que poderia ser útil devido a seu grande volume, alta biodegradabilidade e alto conteúdo de matéria orgânica diretamente fermentescível (WOICIECHOWSKI, 2001).

O bagaço de mandioca, resíduo obtido a partir da extração da fécula de mandioca, que é descartado, apresenta um teor de amido que varia entre 50 e 70%. Este resíduo pode ter diversas aplicações, entre elas, ser usado como substrato na produção de biomassa microbiana, além de metabólitos primários ou secundários em processos fermentativos, pois é essencialmente carboidrato (WOICIECHOWSKI, 2001).

A utilização, em processos fermentativos, de substratos alternativos de baixo custo, tais como resíduos agro-industriais, permite a redução dos custos de produção, minimizando problemas ambientais pois auxilia na destinação desses resíduos. Nesse contexto, pode-se citar diversos trabalhos que utilizam resíduos da agroindústria para a produção de biopolímeros.

Kalogiannis *et al.* (2003) pesquisaram a produção de xantana a partir de um meio otimizado composto de 175 gL^{-1} de melaço, 4 gL^{-1} de K_2HPO_4 e um pH inicial neutro. Seus resultados indicaram que o K_2HPO_4 serve como um agente tamponante e também como um nutriente para o crescimento da *Xanthomonas campestris* e ainda, que o melaço de açúcar de beterraba parece ser um substrato industrial adequado para fermentações desta goma.

Nitschke *et al.* (2001) pesquisaram a produção de goma xantana a partir de meios de cultivo a base de soro de leite, em um sistema combinando soro integral e soro filtrado e obtiveram um rendimento geral do processo de 55%.

Woiciechowski (2001) demonstrou que hidrolisados de casca de café pré-tratados ou não, bem como hidrolisados de bagaço de mandioca suplementados com várias fontes de nitrogênio, são substratos viáveis para a produção de goma xantana por fermentação com *Xanthomonas campestris*. A melhor produção de xantana foi obtida com o uso de nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, com um fator de conversão de substrato em produto da ordem de 75%.

Jin *et al.* (2003) usaram resíduo de grão de soja, um subproduto da indústria de molho de soja, como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, na produção de goma gelana, obtendo uma produção maior de goma ($7,5 \text{ gL}^{-1}$) do que quando trabalharam com o meio convencional que continha peptona e nitrato de amônio como fontes de nitrogênio. A caracterização deste resíduo mostra valores de 17,2% de carboidratos e 33,4% de proteína.

Bae e Shoda (2004) pesquisaram a produção de celulose bacteriana por *Acetobacter xylinum* BPR 2001, usando melaço como fonte de carbono, em processos em batelada e batelada alimentada. Para melhorar a produção de celulose bacteriana, utilizaram o melaço pré-tratado com calor e ácido sulfúrico, obtendo um aumento na concentração de polímero de 76% quando comparado com a produção obtida com melaço que não passou por pré-tratamento.

Boza *et al.* (2004) concluíram que a encapsulação de células de *Beijerinckia* influenciou principalmente o crescimento celular e a produção de biopolímero. Para este

estudo utilizaram um meio de fermentação contendo melaço de cana (1,5% p/v) e leveduras da indústria cervejeira autolizadas (2,0% p/v).

Chi e Zhao (2003) otimizaram o meio e as condições de cultivo de pululana, em agitador orbital, pela levedura *Rhodotorula bacarum*. Este meio continha glicose (8% p/v), hidrolisado de torta de soja (2% p/v), além de sais de potássio, magnésio, sódio e amônio, pH 7,0. Obtiveram 5,9% de pululana em 60 horas, 28°C, 180 rpm; que foi o maior rendimento de pululana produzido por levedura até então.

Porém, sabe-se que os meios industriais utilizados para a produção de polissacarídeos são bastante complexos e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção destes, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação e purificação (TREICHEL, 2004). Altas concentrações de metais pesados no meio causam problemas críticos durante a fermentação, tais como inibição do crescimento microbiano, influenciam o pH do substrato e estão envolvidos na inativação das enzimas associadas com a biossíntese do produto (ROUKAS, 1998). Entretanto, contaminantes como metais pesados e inibidores específicos são removidos parcialmente com pré-tratamentos (STOPPOCK & BUCCHOLZ, 1996 apud KALOGIANNIS *et al.*, 2003). Estes pré-tratamentos clarificam o meio sem provocar prejuízos na fermentação, garantindo maior facilidade na extração e purificação de bioprodutos (TREICHEL, 2004).

Roukas (1998) investigou o pré-tratamento de melaço de açúcar de beterraba através de diferentes métodos tais como o uso de resinas de troca de cátions, ácido sulfúrico, fosfato tricálcico, ferrocianeto de potássio, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e sal dissódico, com o objetivo de aumentar a produção de pululana. Neste estudo, o pré-tratamento com ácido sulfúrico mostrou melhores resultados com relação à concentração e ao rendimento de polissacarídeo e à utilização de açúcar, na produção de pululana.

Squarezi *et al.* (2004) estudaram metodologias de pré-tratamento ácido, utilizando ácido fosfórico, para a água de maceração de milho, a fim de viabilizar sua utilização como substrato para produção de enzimas e polissacarídeos de alto valor agregado. Obtiveram como melhor condição de pré-tratamento um pH antes do repouso de 3,0, 24 horas de repouso e um pH após o repouso de 5,5.

Bae e Shoda (2004) realizaram o pré-tratamento do melaço para utilizá-lo na produção de celulose bacteriana. Esse pré-tratamento consistiu de etapas de diluição do melaço, centrifugação, tratamentos com calor (120°C/ 20 minutos seguido de repouso a temperatura ambiente por uma noite) e ajuste de pH com ácido sulfúrico.

2.2.3 Recuperação de biopolímeros

Após a fermentação, é realizada a recuperação dos biopolímeros. Giavasis *et al.* (2000) citam os processos relatados por Kang *et al.* (1982) e por Manna *et al.* (1986) que compreendem as seguintes etapas na recuperação da gelana: pré-tratamento envolvendo esterilização do caldo fermentado, resfriamento (80-85°C) e ajuste de pH (sendo este ajuste realizado somente quando se quer obter gelana na forma desacetilada); remoção de células, que pode ser por filtração ou centrifugação; precipitação do biopolímero usando 2 volumes de isopropanol 99% ou 4 volumes de propanol; secagem (55°C/ 1h) ou liofilização do biopolímero.

García-Ochoa *et al.* (2000) apresentaram um processo de recuperação de xantana que envolve etapas de: desativação ou lise das células, através de processos químicos, mecânicos ou térmicos; remoção das células por filtração (se necessário, fazer a diluição antes da filtração); recuperação do polímero por precipitação com solventes orgânicos (etanol, isopropanol, misturas de sais e álcool); separação precipitado/ solvente, sendo o precipitado lavado várias vezes com o solvente que é evaporado posteriormente; secagem do biopolímero em secadores contínuos ou em batelada, a vácuo ou com circulação forçada de gás inerte.

Portanto, as células podem ser eliminadas fisicamente através de centrifugação (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; GIAVASIS *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; CHI & ZHAO, 2003; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003; BOZA *et al.*, 2004) ou filtração (KANG *et al.*, 1982; GIAVASIS *et al.*, 2000). Métodos químicos ou enzimáticos podem ser usados como alternativa, complementados com operações posteriores de purificação/ concentração (PACE, 1991; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Os polímeros são recuperados por centrifugação e precipitados preferencialmente com solventes orgânicos solúveis em água como etanol ou acetona (KANG *et al.*, 1982; MARTINS & SÁ-CORREIA, 1993; ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; GIAVASIS *et al.*, 2000; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003; CHI & ZHAO, 2003; BOZA *et al.*, 2004). A quantidade de solvente necessário para a completa precipitação depende da força iônica e da composição do polímero apesar de não depender de sua concentração. A precipitação com solventes também resulta em purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis no solvente (PACE, 1991).

Como métodos alternativos de recuperação primária do polímero, a literatura cita a precipitação seletiva com detergentes catiônicos e ainda a produção de uma forma insolúvel

de polímero por adição de certos sais ou por ajuste de pH (PACE, 1991; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; DRUZIAN, 2000).

Posteriormente os polímeros são purificados e secos em estufa, a baixas temperaturas (KANG *et al.*, 1982; ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; GIAVASIS *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; BOZA *et al.*, 2004) ou liofilizados (GIAVASIS *et al.*, 2000; DILTZ & ZELLER, 2001) e, então, preparados para as análises subseqüentes de determinação da estrutura e reologia. A purificação dos EPS pode ser feita por sucessivas diálises contra água deionizada (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; DILTZ & ZELLER, 2001; CHI & ZHAO, 2003), por reprecipitação fracionada com solvente (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; CHI & ZHAO, 2003) ou com detergentes catiônicos, pelo uso de métodos cromatográficos ou ainda com agentes químicos ou enzimas que interagem de forma específica com certos grupos (DRUZIAN, 2000).

Estes tratamentos químicos, físicos ou biológicos têm a finalidade de alterar sua pureza, reologia ou obter características especiais no produto final. Por exemplo, a goma xantana é tratada com dialdeídos para aumentar sua dispersividade e com formaldeído para aumentar sua viscosidade. Para torná-la compatível com outros polissacarídeos como a carboxi metil celulose, trata-se com celulasas e com ácido poliacrílico para formação de um copolímero (PACE, 1991; MAUGERI, 2001).

A secagem rápida a altas temperaturas pode resultar em um produto com baixa solubilidade ou com reologia pobre em solução, como pode ocorrer com o alginato bacteriano. Porém, o aquecimento controlado da xantana pode resultar em um produto com melhor reologia em solução (PACE, 1991).

2.2.4 Estrutura química

A estrutura química de cada biopolímero, bem como os grupos substituintes que ele possui determinam suas características reológicas e, portanto, suas potenciais aplicações (PACE, 1991).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo cuja estrutura primária contém unidades pentassacarídicas repetidas formadas por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico, na razão molar de 2,8:2,0:2,0. Sua cadeia principal consiste de unidades de β -D- glicose ligadas nas posições 1 e 4, assemelhando-se à celulose, mas com ramificações alternadas nas posições C-3. Possui ainda grupos acetil e piruvato na molécula. Seu peso molecular varia de 2×10^6 a 20×10^6 Da (daltons),

dependendo da associação entre as cadeias, das condições de fermentação, do preparo da amostra e do método utilizado (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001).

A conformação e a estrutura da gelana dependem da concentração de polímero, da temperatura, do meio aquoso e da presença de cátions mono ou divalentes na solução (YUGUCHI *et al.*, 1993 apud GIAVASIS *et al.*, 2000). A goma gelana é constituída de unidades repetidas de um tetrassacarídeo que contém D-glicose, ácido D-glucurônico e L-ramnose e ainda grupos substituintes acetil e L-glicerato (GIAVASIS *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001). Possui uma estrutura em dupla hélice, que é estabilizada por pontes de hidrogênio entre as cadeias, envolvendo os grupos carboxilados e os resíduos glucuronatos (CHANDRASEKRAN *et al.*, 1988 apud BANIK *et al.*, 2000).

Os *sphingans* (goma welana – PS 130, goma ramsana – PS 194, goma diutana – PS 657, e os biopolímeros PS 88, PS 198 e NW 11) possuem uma estrutura linear semelhante à gelana, com uma seqüência trissacarídica idêntica (D-glicose-ácido-D-glucurônico-D-glicose), com grupos acetil e moléculas de ramnose e manose na cadeia lateral em várias combinações, ligadas à cadeia principal trissacarídica (GIAVASIS *et al.*, 2000; SUTHERLAND, 1996 apud BANIK *et al.*, 2000).

A diutana possui uma cadeia principal constituída por unidades tetrassacarídicas repetidas contendo glicose, ácido glucurônico, glicose e ramnose e uma cadeia lateral contendo duas moléculas de ramnose (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001; DILTZ & ZELLER, 2001; SAKATA *et al.*, 2003). Apresenta uma estrutura terciária em dupla hélice (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001). Possui uma cadeia mais longa e peso molecular ($PM \geq 5 \times 10^6$ Da) maior do que as gomas xantana ($PM \geq 2 \times 10^6$ Da) e welana ($PM \geq 0,97 \times 10^6$ Da). Essa variação de peso molecular depende da interação molecular entre as cadeias, dos monossacarídeos constituintes, bem como de fatores associados às condições de fermentação (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; SAKATA *et al.*, 2003).

Os métodos de análises de polissacarídeos complexos baseiam-se, principalmente, na determinação dos constituintes dos resíduos obtidos após a hidrólise química dos polímeros nativos (WEI & FANG, 1990; RUITTER *et al.*, 1992; SCAMPARINI *et al.*, 2000). Esses são compostos de inúmeros resíduos de açúcares interligados por ligações glicosídicas (α e β), que podem diferir consideravelmente na sua suscetibilidade à hidrólise ácida. Ácidos urônicos são freqüentemente envolvidos por fortes ligações glicosídicas, particularmente nos tipos de ligações dos ácidos aldobiurônicos (DRUZIAN, 2000).

Os procedimentos empregados para a determinação destes constituintes, geralmente exigem hidrólise antes ou depois de reações de derivações e posterior separação, identificação, quantificação e determinação da seqüência dos resíduos glicosil e configurações anoméricas dos mesmos por técnicas e/ou métodos cromatográficos como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG) acoplada com espectrofotometria de massa (EM), auxiliada por técnicas de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (BOUFAR-ROUPE & HEYRAUD, 1987; HÁ & THOMAS, 1988; WEI & FANG, 1990; BLACK & FOX, 1996).

2.2.5 Reologia – viscosidade aparente e viscoelasticidade

As propriedades reológicas dos polissacarídeos em solução dependem de suas características físico-químicas intrínsecas, isto é, peso molecular, polidispersividade e grau de substituição. No caso dos polissacarídeos microbianos essas propriedades físico-químicas, bem como a eficiência de produção estão relacionadas ao processo fermentativo, linhagem bacteriana, composição do meio, pH, temperatura e outros parâmetros ambientais da fermentação. Fenômenos de transporte e mistura dos nutrientes no fermentador são os fatores que mais influenciam a biossíntese do biopolímero (BANIK *et al.*, 2000; CASAS *et al.*, 2000; DILTZ & ZELLER, 2001; NAVARRETE *et al.*, 2001).

Soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos apresentam comportamento pseudoplástico característico (AMANULLAH *et al.*, 1996; CACIK *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 2003; PADILHA, 2003).

A goma xantana forma soluções viscosas a baixas taxas de concentração (0,05-1%) e ampla faixa de estabilidade a pH e temperatura, características conferidas devido à sua estrutura ramificada e ao seu alto peso molecular, e apresenta comportamento pseudoplástico. Estas propriedades são importantes especialmente na indústria de alimentos, onde ela é usada como espessante e estabilizante de emulsões e suspensões. Aquelas com alto grau de acetilação e especialmente baixo grau de piruvatação, aumentam a viscosidade de suas soluções porque associações intermoleculares são favorecidas (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; SUTHERLAND, 2002). Em conjunto com galactomananas (goma guar, goma de algaroba e goma locuste) apresenta aumento sinérgico de viscosidade e formam géis termorreversíveis (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; WANG *et al.*, 2002a; WANG *et al.*, 2002b; PARADOSSI *et al.*, 2002).

Resultados de medições reológicas oscilatórias sugerem uma interação mais efetiva das galactomananas com os segmentos de xantana desordenados, que são mais

abundantes em baixas concentrações de sais, mas estão presentes em menor proporção para temperaturas menores que a temperatura de transição conformacional da xantana ($T_m \approx 43^\circ\text{C}$) (BRESOLIN *et al.*, 1998).

A gelana não forma gel em solução aquosa, mas a força do gel aumenta com a adição de sais de cálcio, de sódio, de potássio e de magnésio; com o aumento da concentração de polímero e com pH entre 4,0 e 7,0. Exibe comportamento fortemente pseudoplástico em solução aquosa 0,1% (p/v) (GIAVASIS *et al.*, 2000), formando soluções altamente viscosas ou géis fracos que podem tornar-se rígidos e quebradiços em presença de vários cátions, quando esta é desacetilada com álcali (BANIK *et al.*, 2000; SUTHERLAND, 2002).

Porém, a adição de ingredientes hidrofílicos como sacarose tende a diminuir a concentração iônica requerida para a força ótima do gel de gelana. A gelana é estável a altas temperaturas e mantém esta força a 90°C , enquanto a xantana perde 74% de sua viscosidade original a esta temperatura. Já a temperatura de fusão pode ser acima ou abaixo de 100°C , dependendo das condições de formação do gel (GIAVASIS *et al.*, 2000).

Na produção de gelana, o grau de esterificação, o peso molecular médio e a viscosidade intrínseca são dependentes da hidrodinâmica do fermentador. A viscosidade intrínseca do meio diminui com o aumento da taxa de cisalhamento e a viscosidade aparente de soluções de gelana aumenta na presença de sais, sendo que na ausência ela varia com o pH (BANIK *et al.*, 2004). A gelana nativa possui grupos substituintes L-gliceril e acetil. Os primeiros estabilizam a estrutura em dupla hélice, enquanto os segundos inibem a gelatinização. A ausência destes substituintes forma géis fortes e claros, comparáveis a agarose ou a gelatina (MAZEN *et al.*, 1999 apud RINAUDO, 2004; RINAUDO & MILAS, 2000 apud RINAUDO, 2004).

Ensaio viscoelásticos para misturas gelana/ gelatina mostraram que o módulo elástico (G') diminui com o aumento da temperatura, sendo que este decréscimo de G' depende da razão gelana/ gelatina. Para todas as soluções, G' aumentou com a concentração de NaCl, sendo este aumento menos pronunciado com o aumento da proporção de gelatina (LEE *et al.*, 2003). Robinson *et al.* (1991) exploraram a relação entre a estrutura primária, a conformação e as propriedades físicas de gelana, welana e ramsana mostrando que nas soluções de gelana, a resposta elástica (G') excedeu a resposta viscosa (G''), com pequena dependência da frequência em ambos os módulos. A pequena deformação na viscosidade dinâmica, medida sob oscilação de baixa amplitude, foi

substancialmente maior para valores equivalentes de frequência e taxa de cisalhamento do que a maior deformação para a viscosidade, em cisalhamento estacionário, sobre rotação.

Os *sphingans* (goma welana – PS 130, goma ramsana – PS 194, goma diutana – PS 657, e os biopolímeros PS 88, PS 198 e NW 11) não formam géis, embora eles possam formar soluções aquosas viscosas de alta estabilidade térmica, praticamente independente das concentrações de polímero ou de sais, bem como da temperatura (acima de 100°C) (GIAVASIS *et al.*, 2000; MAZEN *et al.*, 1999 apud RINAUDO, 2004; RINAUDO & MILAS, 2000 apud RINAUDO, 2004). Welana e ramsana dão soluções com géis fracos, similares aos formados por gelana, em sua forma ordenada (ROBINSON *et al.*, 1991).

Welana, ramsana e diutana (S-657) não são gelificantes mas suas soluções aquosas exibem alta viscosidade para baixas taxas de cisalhamento e boa termoestabilidade (BANIK *et al.*, 2000). Este comportamento altamente pseudoplástico da diutana e a boa estabilidade térmica, melhor que a xantana, é comprovado através de estudos da utilização destas gomas na recuperação terciária do petróleo (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001).

Ao contrário da gelana, soluções de diutana não formam gel, mas sim soluções muito viscosas em uma ampla faixa de temperatura, pH e concentrações de sais. São mais pseudoplásticas que a goma welana (CRESCENZI *et al.*, 1987 apud DILTZ & ZELLER, 2001; SAKATA *et al.*, 2003) e exibem melhor estabilidade térmica e uma capacidade espessante superior a xantana, welana e escleroglucanas (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001; CRESCENZI *et al.*, 1987 apud DILTZ & ZELLER, 2001). Apresenta também estabilidade térmica em uma faixa de 5-150°C, estabilidade ao cisalhamento e tolerância ao sal (CRESCENZI *et al.*, 1987 apud DILTZ & ZELLER, 2001).

O módulo elástico da diutana apresentou-se maior que o módulo viscoso ($G' > G''$), em medições de dinâmica oscilatória. Uma comparação feita em uma frequência arbitrária de 0,02 Hz, entre os módulos elástico e viscoso de diutana e xantana como uma função da concentração mostraram que a diutana tem um módulo elástico superior ao da xantana para a mesma concentração de polímero. Apresentou maior módulo viscoso que a xantana porém, as diferenças foram pequenas (NAVARRETE *et al.*, 2000, 2001).

O conhecimento de alguns conceitos, tais como viscosidade, viscoelasticidade, comportamento Newtoniano e não-Newtoniano, faz-se importante para o entendimento dos estudos já apresentados (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

Viscosidade é uma propriedade reológica definida como a medida da fricção interna de um fluido, ou seja, sua resistência a fluir. Ela se torna aparente quando uma camada de fluido move-se em relação a outra camada. Assim, à medida que aumenta a viscosidade do fluido, aumentam as forças de atrito e é necessário mais energia para que haja escoamento. Conseqüentemente, fluidos altamente viscosos requerem maior força para se mover do que materiais menos viscosos (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

Matematicamente, a viscosidade pode ser definida como: $\eta = \sigma / \dot{\gamma}$, onde η é a viscosidade, σ é a tensão de cisalhamento e $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento ou deformação. Utilizam-se diferentes sistemas de unidades para expressar viscosidade, tais como o Sistema Internacional (N.s.m^{-2} , Pa.s, $\text{Kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$), o Sistema Britânico (lb-s/pies^2 , slug/ pie-s), o Sistema Imperial (lbf ft^{-2}) e o Sistema CGS (P, dyn.s.cm^{-2}) (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

A viscosidade depende muito da temperatura, sendo portanto, importante controlá-la durante as determinações experimentais, bem como citá-la juntamente com os dados de viscosidade. Os líquidos têm sua viscosidade diminuída com o aumento da temperatura, ao contrário da maioria dos gases, cuja viscosidade aumenta com o aumento da temperatura (LEWIS, 1993).

Os fluidos podem ser classificados como Newtonianos ou não-Newtonianos, conforme seu comportamento. Assim, para fluidos Newtonianos, a viscosidade independe da taxa de cisalhamento na qual é medida. Portanto, a relação entre a tensão de cisalhamento (σ) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) é uma linha reta, e a viscosidade (η) permanece constante para taxas de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) variadas. Na prática, para uma dada temperatura, a viscosidade dos fluidos Newtonianos permanece constante, indiferente de qual modelo de viscosímetro, *spindle* ou velocidade seja usada para medi-la (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

Fluidos não-Newtonianos são definidos como aqueles onde a relação $\sigma/\dot{\gamma}$ não é uma constante, ou seja, quando a taxa de cisalhamento varia, a tensão de cisalhamento não varia na mesma proporção (ou necessariamente na mesma direção). Assim, a viscosidade de tais fluidos mudará conforme varie a taxa de cisalhamento. Os fluidos não-Newtonianos classificam-se em independentes do tempo e dependentes do tempo (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

Dentre os fluidos não-Newtonianos independentes do tempo temos os pseudoplásticos, os dilatantes e os plásticos. Para os pseudoplásticos, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, o que é também chamado de cisalhamento fino ou *shear-thinning*. Exemplos mais comuns de fluidos pseudoplásticos incluem tintas, emulsões

e dispersões de muitos tipos. Já para os dilatantes, a viscosidade aumenta com o aumento da taxa de cisalhamento, sendo referido também como comportamento de fluxo *shear-thickening*. Como exemplos de comportamentos dilatantes temos caramelo e amido de milho em água. Os fluidos plásticos comportam-se como sólidos sob condições estáticas. Eles apresentam forças internas que o impedem de fluir até uma certa tensão de cisalhamento, quando então, começam a fluir. Exemplos desse tipo de fluido incluem chocolate, *catchup* e maionese (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

Os fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo são aqueles em que ocorre mudança de viscosidade com o tempo, assim como com a taxa de cisalhamento e a temperatura. Podem ser divididos em tixotrópicos e reopéxicos ou reopéticos. Nos fluidos tixotrópicos, a viscosidade diminui com o tempo para uma taxa de cisalhamento constante; já para os reopéxicos ocorre o contrário, ou seja, a viscosidade do fluido aumenta com o tempo para uma taxa de cisalhamento constante (LEWIS, 1993; MOTT, 1996).

Os comportamentos tixotrópico e reopéxico podem ocorrer em combinação com qualquer um dos comportamentos de fluxo citados anteriormente, ou somente para certas taxas de cisalhamento. O elemento tempo é extremamente variável; sob condições de cisalhamento constante, alguns fluidos permanecem com seus valores de viscosidade final em poucos segundos enquanto outros podem mantê-los por vários dias. Fluidos reopéxicos são raros, já os tixotrópicos são freqüentemente observados em materiais tais como lubrificantes, tinta de impressão pesada e tintas (BROOKFIELD, 2004).

Viscoelasticidade é uma das propriedades reológicas mais simples de substâncias de comportamento reológico complexo, como são os biopolímeros. Soluções de biopolímeros com interesse de aplicação comercial exibem propriedades viscoelásticas, isto é, a capacidade de formar géis verdadeiros em baixas concentrações, apresentando, portanto, características intermediárias entre sólidos e fluidos. Assim, apresentam propriedades viscosas e elásticas que se manifestam ao mesmo tempo e quando cessa a tensão de cisalhamento, a deformação do material não diminui imediatamente até zero (LEWIS, 1993; SZCZESNIAK, 1983 apud PADILHA, 1997).

Muitos alimentos, tais como massa de pão, queijo e produtos gelatinosos são descritos como viscoelásticos. Porém, o comportamento de muitos destes produtos é extremamente complexo, sendo empregadas, para sua análise, cinco técnicas principais: relações deformação-tempo; relação da tensão para um cisalhamento constante; utilização do efeito Weissenberg; técnicas oscilatórias e métodos empíricos (LEWIS, 1993).

Os métodos oscilatórios, utilizados para a medição da viscoelasticidade de soluções de biopolímeros, implicam submeter a amostra a uma deformação harmônica por cisalhamento e medir a correspondente tensão de cisalhamento que aparece na amostra. O módulo elástico ou de armazenamento (G') é elevado para materiais elásticos, enquanto o módulo viscoso ou de perda (G'') é elevado para materiais viscosos (LEWIS, 1993).

O estudo das características dos produtos à baixa tensão de cisalhamento, relaciona-se ao controle de qualidade da produção, e o estudo das características à alta tensão de cisalhamento, relaciona-se às condições do processamento do produto. Assim, o conhecimento do comportamento reológico dos alimentos é essencial para o seu processamento, para a sua avaliação, para o seu controle de qualidade e para a aceitabilidade do consumidor (LEWIS, 1993; SCAMPARINI, 1993 apud PADILHA, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os procedimentos adotados no desenvolvimento do trabalho. As etapas realizadas estão esquematizadas na Figura 1.

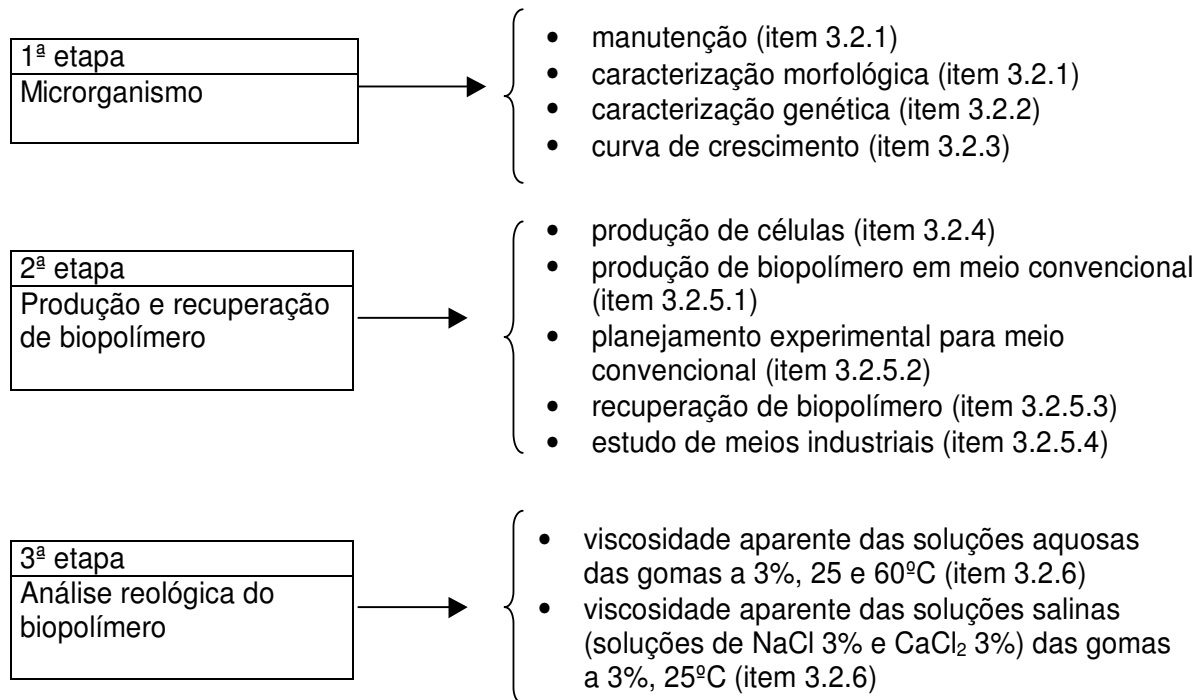


Figura 1- Fluxograma das etapas desenvolvidas

3.1 Microrganismo

Foi utilizada a bactéria *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666, cedida pelo Instituto Biológico, Campinas, SP.

3.2 Metodologia

3.2.1 Manutenção e caracterização morfológica do microrganismo

O microrganismo foi mantido em meio YM (Yeast Malt) contendo (gL⁻¹): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0; ágar 20,0; sendo repicado a cada 30 dias e armazenado a $\pm 4^{\circ}\text{C}$. A fim de verificar algumas características morfológicas das colônias, foram realizados ensaios de coloração de Gram e semeadura em estrias, em ágar YM (CARVALHAL, 2001).

Para preservar a cultura e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento da linhagem em *freezer* -80°C . O procedimento de congelamento constou das seguintes etapas: incubação da cultura em meio YM líquido, $28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até atingir uma absorbância (560 nm) entre 9,5 e 10,5; adição de um agente crioprotetor estéril (glicerol 15% p/v); homogeneização da mistura, sendo a suspensão colocada em *ependorffs* estéreis (1,5 mL), devidamente identificados; e congelamento imediato em *freezer* -80°C . Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica (STANBURY *et al.*, 2000).

3.2.2 Caracterização genética do microrganismo por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

3.2.2.1 Seleção de *primers*

O DNA cromossômico foi extraído de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989), a partir das células crescidas em meio YM líquido, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 24 h. O processo de extração do DNA consistiu basicamente em separar as células por centrifugação (13000 rpm, 5 minutos), sendo acrescentado ao precipitado 600 μL de tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 (10 mM EDTA, 50mM glicose) e 50 μL de enzima lítica (lizozima), para romper a parede celular. Após 10 minutos de repouso, adicionou-se 66 μL SDS 10% e 3 μL de 2-mercaptoetanol, incubou-se a 65°C por 30 minutos, acrescentou-se 190 μL acetato de sódio 3M e levou-se a geladeira por 30 minutos. Foi realizada uma centrifugação, retirando-se o sobrenadante para uso, ao qual foi adicionado 1 volume de isopropanol, misturado e levado ao freezer por 10 minutos. Após nova centrifugação, foi descartando o sobrenadante e deixando secar o precipitado que foi ressuscitado em 200 μL de TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0). Para verificar se ocorreu a extração do DNA foi realizada uma corrida com 10 μL de amostra, em gel de agarose 0,8%, por 1 hora, voltagem constante de 400 V, em tampão TBE (0,089M Trisma, 0,089M ácido bórico e 0,008M EDTA).

Após a extração do DNA foi realizada sua amplificação, em termociclador modelo PTC-100 TM (MJ Research INC., Watertown, MA), utilizando 25 μL de volume total contendo: 40 ng de DNA, 10 pmol de *primer*, 3 mM de MgCl_2 , 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 250 μM de dNTP, 4% Triton, 1,5 unidades de *Taq* polimerase (Amersham – Pharmacia). As condições de amplificação usadas foram: um ciclo de 2 min a 92°C , quarenta e cinco ciclos de 1 min a 92°C , 2 min a 42°C , 2 min a 72°C e um ciclo de 4 min a 72°C .

Foram testados 60 *primers* pertencentes aos kits de *primers* randômicos OPA, OPB, OPF, OPH, OPW e OPY da OPERON Technologies, escolhidos aleatoriamente, sendo apresentados no Quadro 1 os *primers* e respectivas seqüências de bases.

Quadro 1- *Primers* e respectivas seqüências de bases

CÓDIGO	5' PARA 3'	CÓDIGO	5' PARA 3'	CÓDIGO	5' PARA 3'
OPA 02	TGCCGAGCTG	OPB 18	CCACAGCAGT	OPH 04	GGAAGTCGCC
OPA 03	AGTCAGCCAC	OPB 19	ACCCCGAAG	OPH 06	ACGCATCGCA
OPA 05	AGGGGTCTTG	OPB 20	GGACCCTTAC	OPH 13	GACGCCACAC
OPA 07	GAAACGGGTG	OPF 02	GAGGATCCCT	OPH 14	ACCAGGTTGG
OPA 10	GTGATCGCAG	OPF 03	CCTGATCACC	OPH 16	TCTCAGCTGG
OPA 12	TCGGCGATAG	OPF 05	CCGAATTCCC	OPH 17	CACTCTCCTC
OPA 13	CAGCACCCAC	OPF 06	GGAATTCCG	OPH 18	GAATCGGCCA
OPA 14	TCTGTGCTGG	OPF 07	CCGATATCCC	OPH 19	CTGACCAGCC
OPA 16	AGCCAGCGAA	OPF 08	GGGATATCGG	OPW 01	CTCAGTGTCC
OPA 17	GACCGCTTGT	OPF 09	CCAAGCTTCC	OPW 02	ACCCCGCCAA
OPA 18	AGGTGACCGT	OPF 11	TTGGTACCCC	OPW 03	GTCCGGAGTG
OPA 20	GTTGCGATCC	OPF 13	GGCTGCAGAA	OPW 07	CTGGACGTCA
OPB 01	GTTTCGCTCC	OPF 14	TGCTGCAGGT	OPW 11	CTGATGCGTG
OPB 02	TGATCCCTGG	OPF 15	CCAGTACTCC	OPW 15	ACACCGGAAC
OPB 03	CATCCCCCTG	OPF 17	AACCCGGGAA	OPW 19	CAAAGCGCTC
OPB 04	GGA CTGGAGT	OPF 18	TTCCCGGGTT	OPY 03	ACAGCCTGCT
OPB 08	GTCCACACGG	OPF 19	CCTCTAGACC	OPY 06	AAGGCTCACC
OPB 09	TGGGGGACTC	OPF 20	GGTCTAGAGG	OPY 10	CAAACGTGGG
OPB 14	TCCGCTCTGG	OPH 01	GGTCGGAGAA	OPY 17	GACGTGGTGA
OPB 16	TTTGCCCGGA	OPH 02	TCGGACGTGA	OPY 19	TGAGGGTCCC

O produto do RAPD foi separado por eletroforese com gel de agarose 1,4%, em tampão TBE (0,089M Trisma, 0,089M ácido bórico e 0,008M EDTA). A corrida foi efetuada com voltagem constante de 400 V, por 3 h. O gel foi corado com brometo de etídio e os fragmentos visualizados sob luz ultravioleta no Bio-Rad Mini-transilluminator. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) e analisados a fim de selecionar os *primers* que melhor amplificaram o DNA da bactéria, para serem utilizados na análise de RAPD.

A caracterização pela técnica de RAPD necessita que se compare o perfil do DNA da bactéria em estudo com o de outra. Neste trabalho, para fins de comparação, foi utilizada a linhagem de *Xanthomonas campestris* CA 110.

3.2.2.2 Análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

A fim de verificar se não houve alterações genéticas devido a repiques sucessivos, realizou-se a análise de RAPD da linhagem, utilizando-se os 12 *primers* previamente selecionados, um marcador molecular e o DNA da bactéria *Sphingomonas capsulata*

referente aos repiques inicial, intermediário e final, além do DNA da *Xanthomonas campestris* CA 110, que serviu de comparativo.

A extração, a amplificação e a separação do DNA foram realizadas conforme descrito no item 3.2.2.1. Os repiques inicial, intermediário e final foram congelados, conforme descrito em 3.2.1.

Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Os dados obtidos através da determinação da presença ou da ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional NTSYS versão 1.7 (ROHLF, 1992). Os dendrogramas foram construídos pelo algoritmo UPGMA desenvolvido por Sokal e Michener (1958), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os limites de confiança dos agrupamentos formados foram calculados pela randomização de 100 amostragens dos resultados usando o programa Winboot (YAP & NELSON, 1996).

3.2.3 Curva de crescimento microbiano

A curva foi realizada em triplicata, a partir da transferência asséptica de 1 mL de inóculo inicial ($DO_{560nm} = 7,5$) em 50 mL de meio YM líquido. Este foi incubado em agitador orbital, com agitação de 120 rpm, $28^{\circ} \pm 2^{\circ}C$. Foram retiradas amostras a cada 2 h, de forma asséptica, para verificação do crescimento microbiano.

O crescimento celular foi avaliado através da leitura de absorbância, em comprimento de onda de 560 nm, em espectrofotômetro, contra um branco constituído do meio YM sem inóculo; e do plaqueamento em ágar YM através da técnica do *pour-plate*. As curvas de crescimento microbiano foram construídas a partir dos dados de absorbância e contagem total.

3.2.4 Produção de células

A produção de células foi realizada em duas etapas. Primeiro preparou-se um pré-inóculo, partindo de uma alçada de cultura crescida sobre ágar YM e incubada em estufa por 24-48 h, a $28^{\circ} \pm 2^{\circ}C$. Esta foi inoculada em 50 mL de meio YM líquido, em erlenmeyers de 300 mL, incubado em agitador orbital, 120 rpm, a $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, até atingir uma $DO_{560nm} = 7,5$, o que ocorre entre 17-19 h.

Transcorrido este período, preparou-se o inóculo, através da transferência asséptica de 1mL de pré-inóculo para erlenmeyers de 300 mL, contendo 50mL de meio YM líquido e incubou-se em agitador orbital, 120 rpm, a $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, até $DO_{560nm} = 9,5-10,5$, que

corresponde ao ótimo da fase log de crescimento do microrganismo. Essa faixa de absorbância é atingida em aproximadamente 20-24 h de incubação e corresponde a uma concentração celular em torno de 10^8 UFC/mL.

3.2.5 Produção e recuperação de polímero

A produção de polímero foi realizada em agitador orbital, utilizando meio convencional (sacarose) e meio industrial (melaço bruto e pré-tratado e resíduo de proteína texturizada de soja - PTS).

Na seqüência são descritos os ensaios de produção do polímero para meio convencional, bem como o planejamento experimental para este meio, a recuperação do biopolímero do caldo de fermentação e os estudos com meios industriais.

3.2.5.1 Produção de biopolímero em meio convencional

Inicialmente foram realizados ensaios com o meio convencional, em triplicata, para definir as condições de fermentação (agitação e temperatura) e recuperação do polímero (solvente).

A produção de polímero foi realizada utilizando meio contendo (g L^{-1}): sacarose 50,0; KNO_3 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; K_2HPO_4 0,5; CaSO_4 0,1; NaMoO_4 0,05 (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995b), adicionado ao meio contendo as células e incubado em agitador orbital, com agitação de 180 rpm, a $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 72h. O volume de meio de produção utilizado foi de 100 mL. Posteriormente realizou-se uma produção de polímero alterando a concentração de sacarose para 40 g L^{-1} e as condições da fermentação, que são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1- Condições de fermentação e recuperação do biopolímero

Amostra	Condição de fermentação
1E	28°C / 160 rpm/ 72 h
1NE	28°C / 160 rpm/ 72 h
2E	33°C / 200 rpm/ 72 h
2NE	33°C / 200 rpm/ 72 h

Onde: E= esterilizado NE= não esterilizado
1= 28°C , 160 rpm 2= 33°C , 200 rpm

3.2.5.2 Planejamento experimental para meio convencional

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 , com dois pontos axiais e um ponto central repetido três vezes para cada variável independente, totalizando onze ensaios. Esse planejamento baseou-se nos testes preliminares, sendo as variáveis e os níveis estudados apresentados na tabela 2. Para isso utilizou-se um meio contendo (g L^{-1}): KNO_3 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2; K_2HPO_4 0,5; CaSO_4 0,1; NaMoO_4 0,05, pH inicial $7,2 \pm 0,2$, temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ e tempo de fermentação de 72h (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995b).

Tabela 2- Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental com meio convencional

Níveis	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração de sacarose	1,18%	2,00%	4,00%	6,00%	6,82%
Agitação	152 rpm	160 rpm	180 rpm	200 rpm	208 rpm

A resposta avaliada foi produtividade de biopolímero e os cálculos para verificar o efeito das variáveis na resposta foram feitos com o auxílio do programa Statistica 5.1.

3.2.5.3 Recuperação do biopolímero

A recuperação do biopolímero do caldo fermentado compreendeu uma etapa de esterilização a 121°C , 15 minutos e outra de centrifugação a $4700 \times g$, 40 minutos, 4°C , para a sedimentação das células. As células sedimentadas, resultantes da primeira centrifugação, foram secas em estufa ($50^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ / 24h), pesadas a peso constante, sendo calculado o peso seco de células para o volume total de caldo (GIAVASIS *et al.*, 2003).

Ao sobrenadante, que continha o polissacarídeo foram adicionados diferentes solventes, sendo observada a formação de precipitado de imediato, após 12h de refrigeração e após centrifugação. Transcorrido o tempo de refrigeração, as amostras foram novamente centrifugadas a $4700 \times g$, 40 minutos, 4°C , para a recuperação do polímero precipitado que foi seco ($50^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ / 24h), pesado e armazenado em frasco vedado.

Os solventes testados, nas seguintes proporções sobrenadante: solvente, foram: etanol 96°GL (1:5); acetona P.A. (1:2), mistura etanol 96°GL + acetona P.A. (1:1:2 e 1:2:2), mistura KCl 1% + etanol 96°GL (1:2:3 e 1:1:3), mistura KCl 1% + acetona P.A. (1:2:3 e 1:1:3), álcool isopropílico P.A. (1:3). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para os ensaios descritos na Tabela 1, foram avaliadas além das condições de produção, diferentes condições de recuperação (esterilização ou não antes da separação

das células e precipitação do polímero com álcool isopropílico), sendo que após refrigeração de 12 horas, o polímero foi recuperado por centrifugação (4700 x g, 40 minutos, 4°C), seco (50°C ± 5°C / 24h), pesado e armazenado em frasco vedado.

A recuperação de biopolímero referente aos ensaios do planejamento experimental seguiu as mesmas condições de centrifugação, precipitação com álcool isopropílico e secagem já descritas, porém o polímero seco foi pesado a peso constante, dialisado por 48 h contra água Milli-Q ® estéril, liofilizado e armazenado em frasco vedado para análises posteriores de determinação da estrutura e reologia (PACE, 1991; FIALHO *et al.*, 1999; DILTZ & ZELLER, 2001; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003).

3.2.5.4 Estudo de meios industriais

O estudo de meios industriais teve como objetivo buscar alternativas para reduzir os custos de produção de biopolímero, através da utilização de resíduos agro-industriais, de baixo valor agregado. Foram utilizados os meios: melaço bruto, cedido pela Usina Ester (Cosmópolis, SP), melaço pré-tratado e resíduo de PTS, cedido pela Marsul Proteínas Ltda. (Montenegro, RS).

A produção de polímero foi realizada a 208 rpm, pH inicial $7,2 \pm 0,2$, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e 72h, que representa a condição maximizada para o meio convencional, conforme o planejamento experimental. As variáveis estudadas foram as diferentes fontes de carbono (Tabela 3). Os meios não foram suplementados, considerando-se que, de acordo com sua caracterização (Apêndice A), já possuíam os elementos principais carbono e nitrogênio, para a produção de biopolímero. Os ensaios foram realizados em triplicata e analisados estatisticamente através de Teste de Tukey.

A recuperação de polímero, bem como o cálculo do peso seco de células, foi realizado conforme já comentado para o meio convencional (PACE, 1991; FIALHO *et al.*, 1999; DILTZ & ZELLER, 2001; GIAVASIS *et al.*, 2003; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003).

Análises de açúcares redutores totais (ART) e percentual de nitrogênio (%N) foram realizadas utilizando-se o método do DNS (MILLER, 1959) e o método de kjeldahl (SILVA *et al.*, 1997) respectivamente, para as melhores concentrações de cada um dos meios industriais. Estes resultados, juntamente com a caracterização dos meios são mostrados no Apêndice A.

O pré-tratamento do melaço, que remove parcialmente contaminantes como metais pesados e inibidores específicos (dado não publicado) está esquematizado na Figura 2,

enquanto a forma de obtenção do extrato aquoso de resíduo de PTS apresenta-se esquematizada na Figura 3

Tabela 3 - Meios industriais e concentrações utilizadas

Meio industrial	Concentrações utilizadas
Melaço bruto	4, 6 e 8%
Melaço pré-tratado	4, 6 e 8%
Extrato aquoso de resíduo de PTS	2,66, 4 e 6%

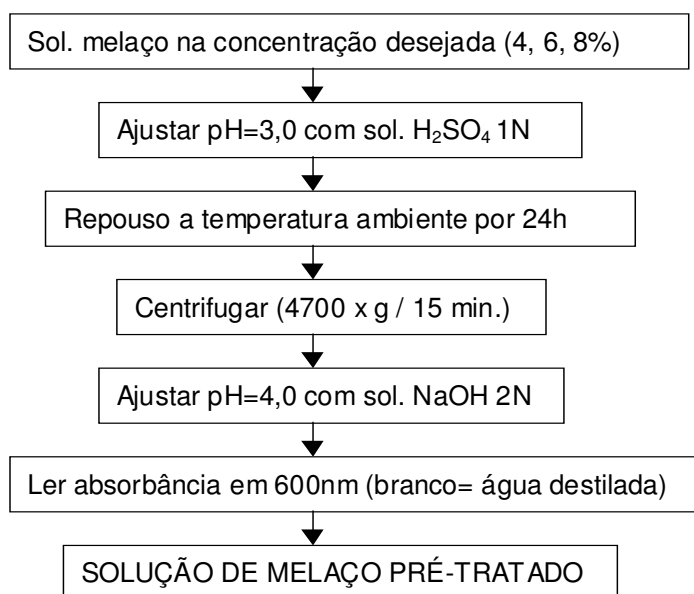


Figura 2- Fluxograma do pré-tratamento do melaço

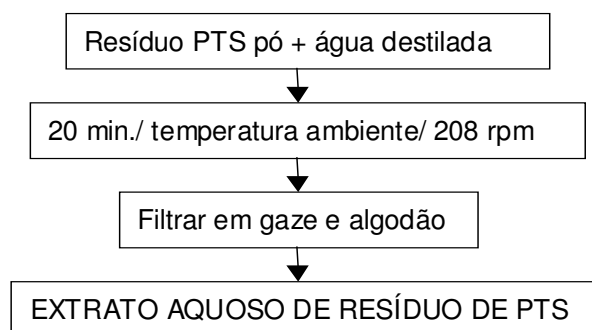


Figura 3- Fluxograma da forma de obtenção do extrato aquoso de resíduo de PTS

3.2.6 Análise reológica do biopolímero

Foram preparadas soluções aquosas das gomas na concentração de 3%, para análise de viscosidade aparente, nas temperaturas de 25 e 60°C. As análises de viscosidade aparente das soluções salinas das gomas (solução de NaCl 3% e solução de CaCl₂ 3%), foram feitas na concentração de 3% e na temperatura de 25°C, para a goma produzida a partir de melaço pré-tratado 8% e extrato aquoso de resíduo de PTS 6% (NAVARRETE *et al.*, 2001).

Para as análises de viscosidade aparente foi utilizado o reômetro digital marca Brookfield, modelo LVDV III+, acoplado a um banho-maria, marca Brookfield, modelo TC-502P; utilizando-se o adaptador para pequenas amostras, *spindle* 18, que, segundo o manual do fabricante, permite variar a taxa de cisalhamento de 0 a 264 s⁻¹ e a viscosidade de 1,3 a 30000 cP. As leituras foram realizadas a intervalos de 10 s, variando-se a taxa de cisalhamento (0-264-0 s⁻¹), conforme a característica de cada uma das amostras.

As unidades de medida utilizadas foram: centipoise (cP) para viscosidade aparente, 1/segundo (s⁻¹) para taxa de cisalhamento e dyna/ centímetro quadrado (D/ cm²) para tensão de cisalhamento.

Diferentes equações são utilizadas para descrever o comportamento do escoamento de alimentos líquidos, tais como o modelo de Newton, o modelo de Ostwald – de Waele e o modelo de Herschel-Bulkley (GRATÃO *et al.*, 2004).

Para confirmação do comportamento pseudoplástico das soluções de gomas, foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald – de Waele ($\sigma = K \dot{\gamma}^n$) aos dados experimentais, a partir de regressão linear, usando o software Excel 2000. Plotou-se $\log \dot{\gamma} \times \log \sigma$, obtendo-se os valores de K (índice de consistência) e n (índice de fluxo) e as equações das retas (ida, quando aumenta-se a taxa de cisalhamento, e volta, quando diminui-se a taxa de cisalhamento), podendo-se então, através de análise gráfica, demonstrar o ajuste do modelo aos dados experimentais.

4 RESULTADOS

4.1 Características morfológicas da colônia

A fim de verificar as características morfológicas das colônias, foram realizados ensaios de coloração de Gram e plaqueamento da cultura em ágar YM. Observou-se que elas apresentam formato de bastonetes, são Gram negativas, e têm coloração amarela, o que está de acordo com a descrição apresentada por HOLT (1994).

A Figura 4 mostra uma fotografia das colônias de *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666.

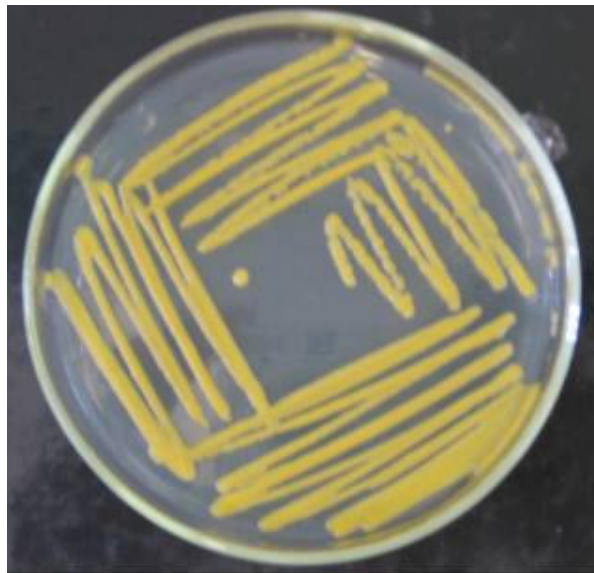


Figura 4- Aspecto das colônias de *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666, crescidas em ágar YM, $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 48 horas

4.2 Caracterização genética do microrganismo

A caracterização genética do DNA de bactérias é de elevada importância especialmente para comprovar a não ocorrência de mutações durante os repiques sucessivos aos quais o microrganismo é submetido ao longo das pesquisas.

Inicialmente foi realizada a seleção de *primers* para posterior análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), onde foram testados 60 *primers* pertencentes aos kits de *primers* randômicos OPA, OPB, OPF, OPH, OPW e OPY da OPERON Technologies,

escolhidos aleatoriamente, juntamente com o DNA da bactéria *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666.

A partir destas análises foram selecionados quinze *primers* que melhor amplificaram o DNA da bactéria. Estes foram: OPA 12, OPA 13, OPA 18, OPA 20, OPF 05, OPF 09, OPH 06, OPH 13, OPH 18, OPH 19, OPW 01, OPW 11, OPW 19, OPY 03, OPY 17.

A seleção dos *primers* foi baseada no número de regiões amplificadas, observando-se as que apresentaram maior número de bandas, com alta reprodutibilidade e intensidade.

Estes quinze *primers* foram testados com o DNA da *Xanthomonas campestris* CA110, que serviu de comparativo, quando da realização do RAPD. Foram então selecionados doze *primers* que melhor amplificaram o DNA de ambas bactérias e que foram: OPA 12, OPA 13, OPA 18, OPA 20, OPF 05, OPF 09, OPH 06, OPH 18, OPW 11, OPW 19, OPY 03, OPY 17.

A Figura 5 apresenta a fotografia de um dos géis obtidos na seleção de *primers* randômicos para a análise de RAPD da *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666.

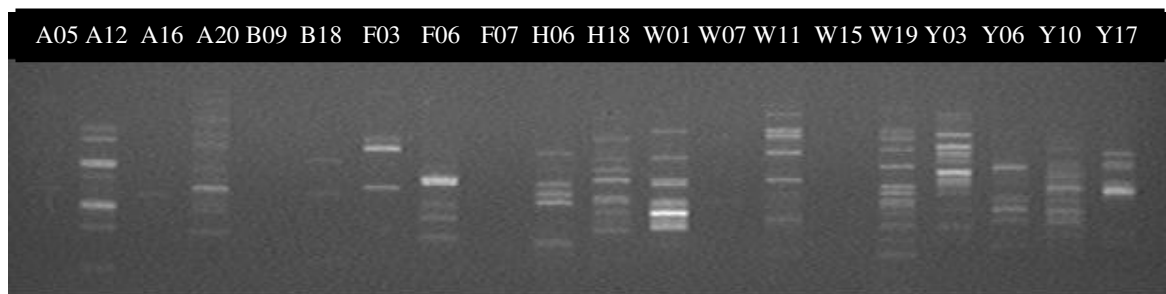


Figura 5- Seleção de *primers* randômicos para análise de RAPD da *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666

Os *primers* selecionados foram utilizados para análise de RAPD da *Sphingomonas capsulata*, comparando-se os repiques inicial, intermediário e final entre si e com a *Xanthomonas campestris* CA 110, com a finalidade de verificar a ocorrência de variabilidade genética entre as linhagens e durante o armazenamento.

A Figura 6 traz uma fotografia demonstrativa dos géis de RAPD e a Figura 7 mostra o dendrograma, baseado no índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre os repiques inicial, intermediário e final da *Sphingomonas capsulata* e a *Xanthomonas campestris* CA 110.

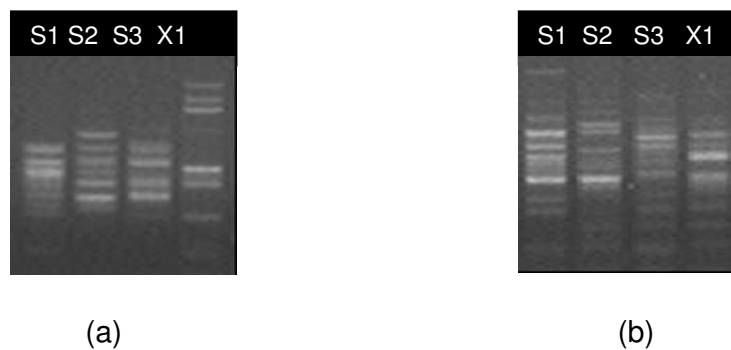
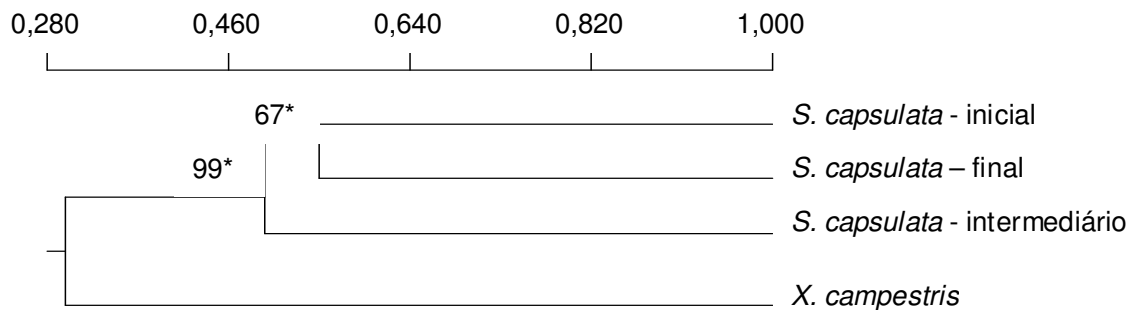


Figura 6- Géis de RAPD do DNA dos diferentes repiques de *Sphingomonas* (S1, S2, S3) e de *Xanthomonas* (X1) amplificado com os *primers* OPF 05 (a) e OPW 11 (b)



* limites de confiança dos agrupamentos, calculados por randomização de 100 amostragens dos resultados, pelo programa Winboot.

Figura 7- Dendrograma baseado no índice de similaridade (coeficiente de Jaccard) entre os repiques inicial, intermediário e final da *Sphingomonas capsulata* e a *Xanthomonas campestris* CA 110.

Através da análise de RAPD verificou-se que a similaridade entre as amostras de DNA dos diferentes repiques de *Sphingomonas capsulata*, analisadas pelo método de agrupamento UPGMA (SOKAL & MICHENER, 1958), com coeficiente de similaridade de Jaccard, variou entre 0,530 e 0,551, com um limite de confiança de 67%, fornecido através da análise destes agrupamentos pelo programa Winboot (YAP & NELSON, 1996), enquanto a similaridade entre as amostras de DNA de *Sphingomonas* e de *Xanthomonas* foram de 0,280, com um limite de confiança de 99% (Figura 7).

Estes resultados mostram uma baixa similaridade entre as amostras de DNA de *Sphingomonas* e de *Xanthomonas*, o que já era esperado, uma vez que as mesmas pertencem a diferentes gêneros. Porém, observa-se baixa similaridade também entre as amostras de DNA de *Sphingomonas*, indicando que podem ter havido alterações a nível genômico. Cabe salientar que foi utilizada uma cultura axênica e que esta é muito mais suscetível a mutações genômicas do que uma cultura pura.

Os resultados de RAPD evidenciam a necessidade de aprofundar-se os estudos na área genômica. Entretanto, quando observadas as características morfológicas das colônias (4.1), teste de Gram (4.1) e curva de crescimento (4.3), não foram verificadas diferenças, demonstrando que o microrganismo conservou suas características, especialmente sua capacidade de produzir biopolímero.

Williams *et al.* (1990), utilizaram a técnica do RAPD para analisar o DNA de bactérias, com o objetivo de determinar se *primers* curtos podem ser usados para amplificar segmentos de DNA de genomas pequenos. Eles observaram que genomas tão pequenos como o da *E. coli* (4×10^3 kbp) suportam amplificação e que a bactéria pode ser distinguida de acordo com os modelos de bandas de seu DNA sobre um gel de agarose.

Zhou e Jiao (2004) investigaram modelos de contaminação de *Listeria monocytogenes* em mercados chineses, e de dois isolados clínicos, através de análise de RAPD. Os autores estabeleceram um método de RAPD simples, rápido, discriminatório e reprodutível para a sub-tipagem molecular de *Listeria monocytogenes*. Mostraram que as fontes primárias de contaminação deste microrganismo em alimentos prontos para o consumo foram os alimentos frescos ou as sujidades nos mercados. Constataram que a infecção de dois pacientes com meningite por *Listeria* pode resultar da ingestão de alimentos prontos para o consumo, contaminados com *Listeria monocytogenes*, e também, que este método pode ser usado para o estudo da variação da virulência entre sub-tipos moleculares diferentes de *Listeria monocytogenes*.

4.3 Curva de crescimento microbiano

As curvas de crescimento microbiano foram realizadas, a fim de obter informações utilizadas nas fermentações como a faixa de absorbância em 560 nm que corresponde ao ótimo da fase log e concentração celular correspondente a esta faixa. Tais informações são importantes para que se trabalhe com o inóculo na mesma faixa de concentração celular, resultando assim em produções mais reprodutíveis.

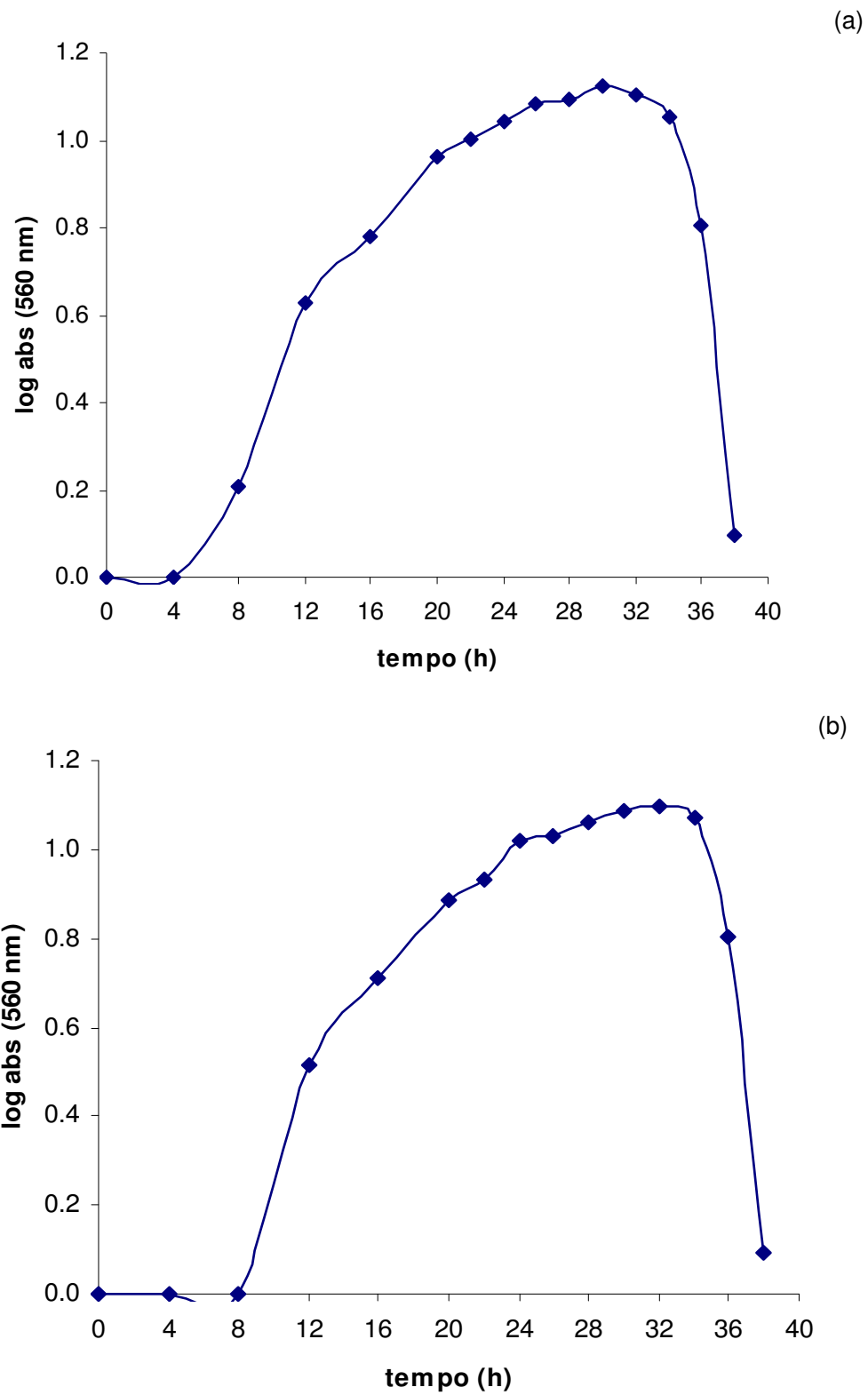


Figura 8- Curvas de crescimento microbiano referentes aos repiques inicial (a) e final (b)

A partir da curva de crescimento microbiano encontrou-se que o ótimo da fase log ocorre entre 20 e 24h de incubação a 28°C, 120 rpm e corresponde a uma concentração celular média de 10^8 UFC/mL. Foram realizadas novas curvas ao final das pesquisas para comparar-se o comportamento do microrganismo a partir dos repiques inicial e final utilizados para as fermentações. A Figura 8 apresenta curvas de crescimento comparativas, demonstrando que o comportamento não se alterou ao longo das pesquisas

Através da regressão linear referente à fase log das curvas de crescimento (repiques inicial e final), plotando-se a média das absorbâncias x log da média das contagens, obteve-se as seguintes equações e respectivos R^2 :

$$Y=0,1887x + 7,6970 \quad R^2=0,9554 \quad (\text{regressão linear fase log repique inicial})$$

$$Y=0,2606x + 7,3584 \quad R^2=0,9978 \quad (\text{regressão linear fase log repique final}).$$

Com estas informações é possível, dentro da fase log, que ocorreu entre 8 e 20 horas, conhecendo-se a absorbância em 560 nm, estabelecer os valores médios de concentração celular (UFC/ mL).

4.4 Ensaios para meio convencional

Estes ensaios foram realizados com a finalidade de definir as condições de fermentação e recuperação do polímero. No primeiro e no segundo ensaios buscou-se selecionar o solvente mais adequado para a recuperação do polímero do caldo fermentado, sendo que no primeiro ensaio não houve produção de biopolímero. Os resultados do segundo ensaio são apresentados no Quadro 2.

O Quadro 2 mostra que, para todas as amostras, ocorreu precipitação de imediato apenas nas recuperadas com álcool isopropílico P.A. (1:3). Após refrigeração e centrifugação observou-se precipitação para aquelas recuperadas com álcool isopropílico P.A. (1:3) e pequena precipitação, em duas das três amostras recuperadas com a mistura etanol 96°GL + acetona P.A. (1:2:2).

O álcool isopropílico P.A. é o solvente usado para recuperação de biopolímeros como gelana e xantana (KANG *et al.*, 1982; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003; LETISSE *et al.*, 2003), sendo o que mais se adequou para a precipitação do biopolímero produzido por *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666, conforme mostraram os resultados. Por este motivo, o álcool isopropílico P.A. foi o solvente escolhido para precipitar o polímero durante todo o período experimental deste trabalho.

Quadro 2- Seleção de solventes para a recuperação do biopolímero

				RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO			
AMOSTRA	pH		MASSA DA GOMA	CONDIÇÃO	RESULTADO		
	INICIAL	FINAL			IMEDIATO	APÓS REFRIGERAÇÃO	APÓS CENTRIFUGAÇÃO
1	7,2	4,5	0,161 g	1ª (1:2)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				2ª (1:2:2)	não precipitou	precipitou	precipitou
				3ª (1:1:3)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				4ª (1:1:3)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				5ª (1:3)	precipitou	precipitou	precipitou
2	7,2	4,5	0,040 g	1ª (1:2)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				2ª (1:2:2)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				3ª (1:1:3)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				4ª (1:1:3)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				5ª (1:3)	precipitou	precipitou	precipitou
3	7,2	4,5	0,197 g	1ª (1:2)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				2ª (1:2:2)	não precipitou	precipitou	precipitou
				3ª (1:1:3)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				4ª (1:1:3)	não precipitou	não precipitou	não precipitou
				5ª (1:3)	precipitou	precipitou	precipitou

Solventes testados na recuperação do biopolímero: (1ª) amostra: acetona P.A. (1:2), (2ª) amostra: etanol 96°GL + acetona P.A.(1:2:2), (3ª) amostra: mistura KCl 1% + etanol 96°GL (1:1:3), (4ª) amostra: mistura KCl 1% + acetona P.A . (1:1:3), (5ª) amostra: álcool isopropílico (1:3).

O terceiro ensaio avaliou diferentes condições de fermentação e recuperação do biopolímero, considerando diferentes temperaturas (28°C e 33°C) e diferentes agitações (160 rpm e 200 rpm) e ainda se a recuperação do biopolímero deveria contemplar uma etapa de esterilização do caldo fermentado antes da centrifugação e precipitação com solvente, ou não. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Avaliação da produção e produtividade média para diferentes condições de fermentação e recuperação de biopolímero

Amostra	Produção média (g ^L ⁻¹)	Produtividade média (g ^L ⁻¹ h ⁻¹)
1E	2,610	0,036
1NE	2,150	0,030
2E	1,890	0,026
2NE	1,650	0,023

Onde: E= esterilizado

NE= não esterilizado

1= 28°C, 160 rpm

2= 33°C, 200 rpm

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que a produtividade da goma foi maior quando se trabalhou a 28°C e 160 rpm (amostras 1E e 1NE) do que quando se trabalhou a 33°C e 200 rpm (amostras 2E e 2NE) e ainda que esta não é afetada

significativamente pela esterilização do caldo fermentado. Porém, a qualidade reológica da goma (viscosidade) mostrou-se prejudicada para as amostras submetidas ao processo de esterilização. Além disso, a esterilização do caldo fermentado antes da recuperação da goma inclui uma etapa a mais no processo de produção, o que encarecerá o processo quando do *scale-up*.

Considerando o exposto, optou-se por trabalhar a 28°C, sem esterilizar o caldo fermentado antes da recuperação do biopolímero e estudar, através de planejamento experimental, diferentes agitações e concentrações de meio.

4.5 Planejamento experimental para meio convencional

Através do planejamento experimental buscou-se maximizar a produção de biopolímero dentro das faixas estudadas. Na Tabela 5 é apresentada a matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com pontos centrais e axiais e a resposta produtividade. Verifica-se, que a maior produtividade ($0,038 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) foi obtida a $28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, agitação de 208rpm, em meio contendo 4% de sacarose e com um tempo de fermentação de 72h, que corresponde ao ensaio 8.

Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental realizado (valores codificados e reais) com respostas de produtividade

Ensaio	Concentração sacarose (%)	Agitação (rpm)	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
1	- 1 (2%)	- 1 (160rpm)	0,003
2	+ 1 (6%)	- 1 (160rpm)	0,004
3	- 1 (2%)	+ 1 (200rpm)	0,004
4	+ 1 (6%)	+ 1 (200rpm)	0,015
5	- 1,41 (1,18%)	0 (180rpm)	0,001
6	+ 1,41 (6,82%)	0 (180rpm)	0,007
7	0 (4%)	- 1,41 (152rpm)	0,005
8	0 (4%)	+ 1,41 (208rpm)	0,038
9	0 (4%)	0 (180rpm)	0,019
10	0 (4%)	0 (180rpm)	0,016
11	0 (4%)	0 (180rpm)	0,015

Os dados obtidos no planejamento experimental, apresentados na Tabela 5, foram tratados estatisticamente. Foram calculados os coeficientes de regressão e os desvios

padrão, mostrados na Tabela 6, onde se observa que os termos concentração de sacarose quadrática e agitação linear foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$).

Os parâmetro não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 7.

Tabela 6 – Coeficientes de regressão para a produtividade de biopolímero

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão
Média	0,017*	0,001
Concentração Sacarose (L)	0,005	0,001
Concentração Sacarose (Q)	- 0,016*	0,002
Agitação (L)	0,015*	0,001
Agitação (Q)	0,002	0,002
Interação 1L x 2L	0,005	0,002

* efeitos significativos a um $p < 0,05$

Tabela 7 – Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo

Causa da variação	SQ	GL	MQ	F _{calc}	F _{tab (0,95, 2, 8)}
Regressão	0,00084	2	0,00042	10,85	4,46
Resíduo	0,00031	8	$3,85 \times 10^{-5}$		
Falta ajuste	0,00030	6			
Erro puro	$7,92 \times 10^{-6}$	2			
Total	0,00114	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

Coeficiente de Correlação: $R = 0,85$

Analizando a Tabela 7, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,85 e o F calculado foi 2,43 vezes maior que o valor tabelado, permitindo a obtenção de um modelo codificado não linear de segunda ordem (Equação 1), que descreve a resposta produtividade em função das variáveis independentes analisadas (agitação e concentração da sacarose), dentro da faixa estudada.

$$P = 0,017 - 0,008 \times (Cs)^2 + 0,007 \times A \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

P= produtividade

Cs= concentração de sacarose

A= agitação

O modelo permitiu a construção da Figura 9. Verifica-se que a concentração de sacarose que resultou uma maior produtividade foi a de 4%, correspondente ao ponto central. Em relação à agitação, verificou-se que níveis maiores acarretam maiores produtividades.

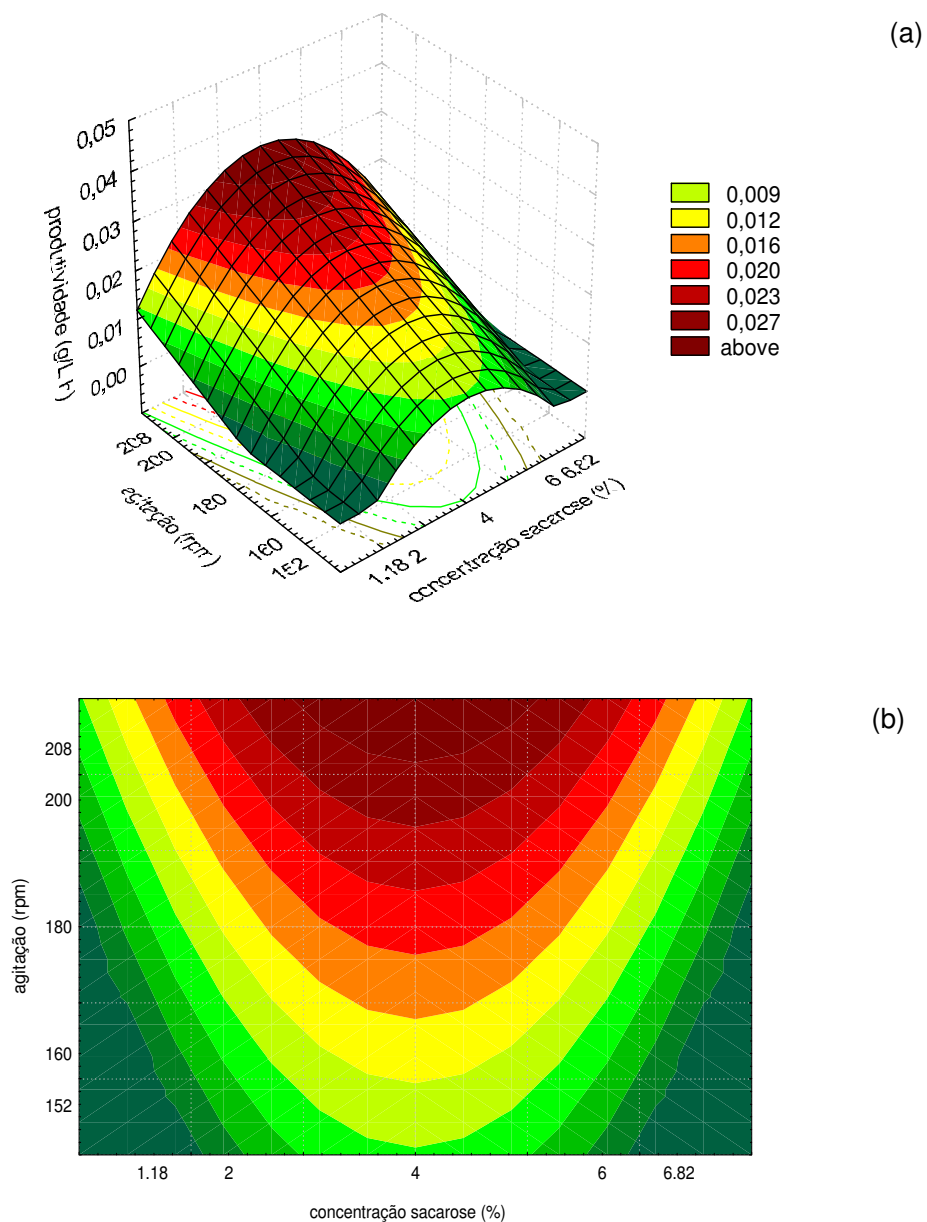


Figura 9- Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) com as produtividades da goma em relação à agitação e concentração de sacarose

Para verificar se a produtividade aumentaria com o aumento da agitação, conforme indicou o tratamento dos dados do planejamento experimental realizado, foram conduzidos

dois ensaios de produção de goma. No primeiro, foi repetida a condição maximizada, correspondente ao ensaio 8 da matriz do planejamento anterior, e um segundo, foi realizado nas mesmas condições, porém aumentando o nível de agitação para 236 rpm, para se verificar o comportamento da produtividade.

A Tabela 8 apresenta a média dos resultados obtidos para a produtividade nas duas condições testadas. Foi aplicado o teste de Tukey para determinar se havia diferença significativa entre as médias. Os resultados apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p < 0,05$), indicando que com agitação superior a 208 rpm ocorre uma diminuição na produtividade, o que mostra que a condição de 4% de sacarose, 208 rpm, 72 horas e 28°C é a condição maximizada para a produção da goma.

Tabela 8 – Ensaio em diferentes condições de produção da goma

Condição	Produtividade média e desvio padrão
208 rpm / 4% / 28°C / 72h	$0,041^* \pm 0,006^a$
236 rpm / 4% / 28°C / 72h	$0,009^* \pm 0,003^b$

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

Cabe salientar ainda que, através da repetição do ensaio 8 do planejamento anterior foi possível verificar que existe reprodutibilidade nos resultados, em relação ao planejamento de experimentos realizado e também em relação ao baixo valor de desvio padrão da média.

A produtividade do biopolímero de $0,038 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, obtida neste trabalho, a $28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, agitação de 208 rpm, em meio contendo 4% de sacarose e com um tempo de fermentação de 72 h, mostrou-se inferior a de outros biopolímeros como gelana ($0,21 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e xantana ($0,74 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (MANNA *et al.*, 1996 apud GIAVASIS *et al.*, 2000; SHU & YANG, 1990 apud GIAVASIS *et al.*, 2000). Porém, tais produtividades representam condições otimizadas de produção e uso de linhagens altamente produtivas, o que não se aplica aos resultados apresentados nesse trabalho.

Meios similares ao meio de produção de células YM, e também ao meio de produção de biopolímero, que contém glicose (mínimo 30 gL^{-1}) acrescido de sais de cálcio, de magnésio, de potássio e de sódio são citados por diversos autores para a produção de gelana e outros biopolímeros produzidos por *Sphingomonas* (KANG *et al.*, 1982; LOBAS *et al.*, 1994; GIAVASIS *et al.*, 2000), com pH variando entre 6,5 e 7,0.

Todos estes meios são caracterizados por uma alta razão C:N. Assim como a concentração total de carbono no meio de fermentação é necessária, pode ser relevante usar meios com um conteúdo de carbono maior para aumentar a produção, particularmente se o produto é um polissacarídeo (GIAVASIS *et al.*, 2000).

A temperatura ótima de crescimento da *Sphingomonas capsulata* é de 26°C, sendo que Lobas *et al.* (1994) e Ashtaputre & Shah (1995 a, 1995 b) usaram temperaturas de 28° a 30°C e tempos de fermentação de 72 a 96 h, quando trabalharam com *Sphingomonas paucimobilis*. Giavasis *et al.* (2000) e Martins e Sá-Correia (1993) citam que, para a produção de gelana, a temperatura ótima de crescimento do microrganismo fica entre 30° e 35°C, enquanto a máxima produção de gelana é obtida a temperatura de 20° a 25°C, o que confirma que as condições ótimas de crescimento e síntese de EPS são geralmente distintas, sendo a temperatura ótima para a síntese do EPS geralmente inferior a temperatura ótima de crescimento do microrganismo.

Neste estudo utilizou-se temperaturas de 28°C e tempos de fermentação de 72 h, sendo que o meio contendo 4% de sacarose foi o que resultou em maior produtividade de biopolímero (0,038 gL⁻¹h⁻¹).

4.6 Estudos com meios industriais

O estudo com meios industriais teve como objetivo buscar alternativas para reduzir os custos de produção de biopolímero, através da utilização de resíduos agroindustriais, de baixo valor agregado. Os meios industriais estudados foram melaço bruto e pré-tratado e resíduo de PTS na forma de extrato aquoso.

A análise estatística dos resultados, através de teste de Tukey, foi realizada individualmente para cada meio, considerando as diferentes concentrações utilizadas e, posteriormente, foi realizado um teste de Tukey comparando as melhores concentrações dos três diferentes meios, ou seja, aquelas concentrações que forneceram as maiores produtividades. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As Tabelas 9, 10 e 11 apresentam a produtividade média e o desvio padrão das fermentações que utilizaram como meio de produção extrato aquoso de resíduo de PTS, melaço bruto e melaço pré-tratado, respectivamente.

Tabela 9 – Produtividades médias obtidas usando diferentes concentrações de extrato aquoso de resíduo de PTS

Concentração de extrato aquoso de resíduo de PTS	Produtividade média e desvio padrão
2,66%	0,080* $\pm$ 0,003 ^a
4%	0,135* $\pm$ 0,005 ^b
6%	0,244* $\pm$ 0,016 ^c

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

Tabela 10 – Produtividades médias obtidas usando diferentes concentrações de melão bruto

Concentração de melão bruto	Produtividade média e desvio padrão
4%	0,105* $\pm$ 0,017 ^a
6%	0,130* $\pm$ 0,021 ^a
8%	0,213* $\pm$ 0,057 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

Tabela 11 – Produtividades médias obtidas usando diferentes concentrações de melão pré-tratado

Concentração de melão pré-tratado	Produtividade média e desvio padrão
4%	0,172* $\pm$ 0,038 ^a
6%	0,155* $\pm$ 0,022 ^a
8%	0,267* $\pm$ 0,049 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

A Tabela 9 mostra que todas as concentrações são significativamente diferentes e que a produtividade de goma aumenta com o aumento da concentração de extrato aquoso de resíduo de PTS no meio. Portanto, a maior produtividade foi obtida para a concentração de 6% de meio. Nas Tabelas 10 e 11 observa-se que as concentrações de 4 e 6% não diferem entre si ($p > 0,05$), mas que a concentração de 8% é significativamente diferente das demais ($p < 0,05$), sendo que a maior produtividade foi obtida com a concentração de melão bruto ou pré-tratado 8%.

Tabela 12 – Produtividades médias obtidas usando as melhores concentrações dos diferentes meios industriais

Condição	Produtividade média e desvio padrão
Extrato aquoso de resíduo de PTS 6%	0,244* $\pm$ 0,016 ^{a, b}
Melaço bruto 8%	0,192* $\pm$ 0,048 ^b
Melaço pré-tratado 8%	0,296* $\pm$ 0,040 ^a

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

Analizando conjuntamente as concentrações que geraram maiores produtividades para os diferentes meios, através do teste de Tukey, observou-se que extrato aquoso de resíduo de PTS 6%, melaço bruto 8% e melaço pré-tratado 8% são iguais ($p < 0,05$), mas melaço bruto 8% e melaço pré-tratado 8% são diferentes, sendo que as fermentações que utilizaram o melaço pré-tratado 8% apresentaram as maiores produtividades (Tabela 12).

Observa-se o desenvolvimento de inúmeros estudos utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biopolímeros, dentre os quais, a produção de xantana a partir de melaço de açúcar de beterraba pré-tratado (KALOGIANNIS *et al.*, 2003), soro de leite (NITSCHKE *et al.*, 2001) e resíduos agroindustriais de café e de mandioca (WOICIECHOWSKI, 2001); a produção de gelana a partir de resíduo da indústria de soja (JIN *et al.*, 2003); a produção de celulose bacteriana a partir de melaço de cana-de-açúcar pré-tratado (BAE & SHODA, 2004) e a produção de pululana utilizando hidrolisado de torta de soja (BOZA *et al.*, 2004).

Os resultados com meios industriais desse estudo mostraram-se bastante satisfatórios, quando comparados aos obtidos por outros pesquisadores. Obteve-se uma produtividade de biopolímero média de $0,24 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ quando utilizado como substrato o extrato aquoso de resíduo de PTS 6%, sendo este fonte de carbono e nitrogênio, sem suplementação adicional do meio com outros sais, enquanto, para a produção de goma gelana utilizando resíduo da indústria de molho de soja, Jin *et al.* (2003) conseguiram uma produção de $7,50 \text{ gL}^{-1}$ de goma (que corresponde a uma produtividade de $0,10 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), em bioreator de 7 L, quando utilizaram um meio contendo 2% (p/v) de glicose e 2% (p/v) de resíduo de soja, sem nitrato de amônio.

Quando se utilizou melaço bruto 8%, a produtividade de goma média foi de $0,19 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e com melaço pré-tratado 8% esta aumentou para $0,29 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Em ambos os casos o melaço foi usado como fonte de carbono e nitrogênio, sem qualquer suplementação do

meio. Kalogiannis *et al.* (2003) obtiveram uma maior produtividade de polímero ($2,21 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) porém, utilizaram praticamente o dobro da concentração de melaço (175 gL^{-1}), além de suplementar o meio com sais.

Possivelmente, se as concentrações de meios industriais fossem maiores, teríamos um aumento na produtividade de biopolímero, pois se observou que a maior concentração de meio correspondia, em geral, a maior produtividade de biopolímero (Tabelas 9, 10 e 11).

Observou-se ainda que as produtividades obtidas com meios industriais foram bem superiores às obtidas com o meio convencional, para a mesma condição de fermentação, ou seja, $28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$, agitação de 208rpm, e 72 h de fermentação. Estes resultados indicam que é possível obter biopolímero a partir dos meios industriais testados, reduzindo os custos de produção, uma vez que os substratos utilizados são subprodutos da agroindústria, de baixo valor agregado.

A continuidade dos estudos com estes meios industriais, visando a otimização do meio de produção, através do melhor ajuste da relação carbono/ nitrogênio (C:N), realizando-se a suplementação dos meios com outras fontes de nitrogênio, tais como a água de maceração de milho, bem como a utilização conjunta de melaço e resíduo de PTS poderá resultar em melhora da produtividade e da qualidade dos biopolímeros obtidos.

As Figuras 10 e 11 apresentam o aspecto do biopolímero liofilizado e precipitado, respectivamente, a partir dos diferentes meios de produção.

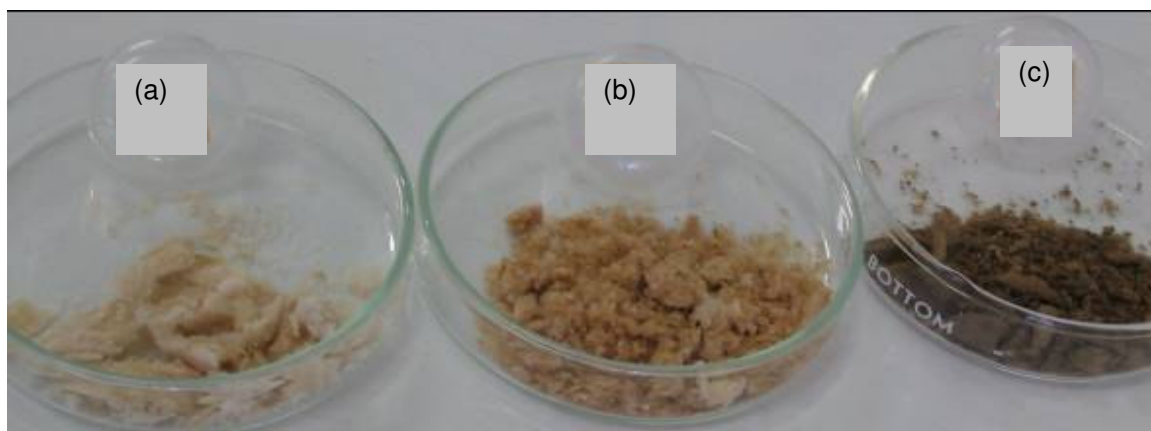


Figura 10- Aspecto do biopolímero liofilizado, sintetizado a partir de sacarose 4% (a), extrato aquoso de resíduo de PTS 6% (b), melaço pré-tratado 8% (c)

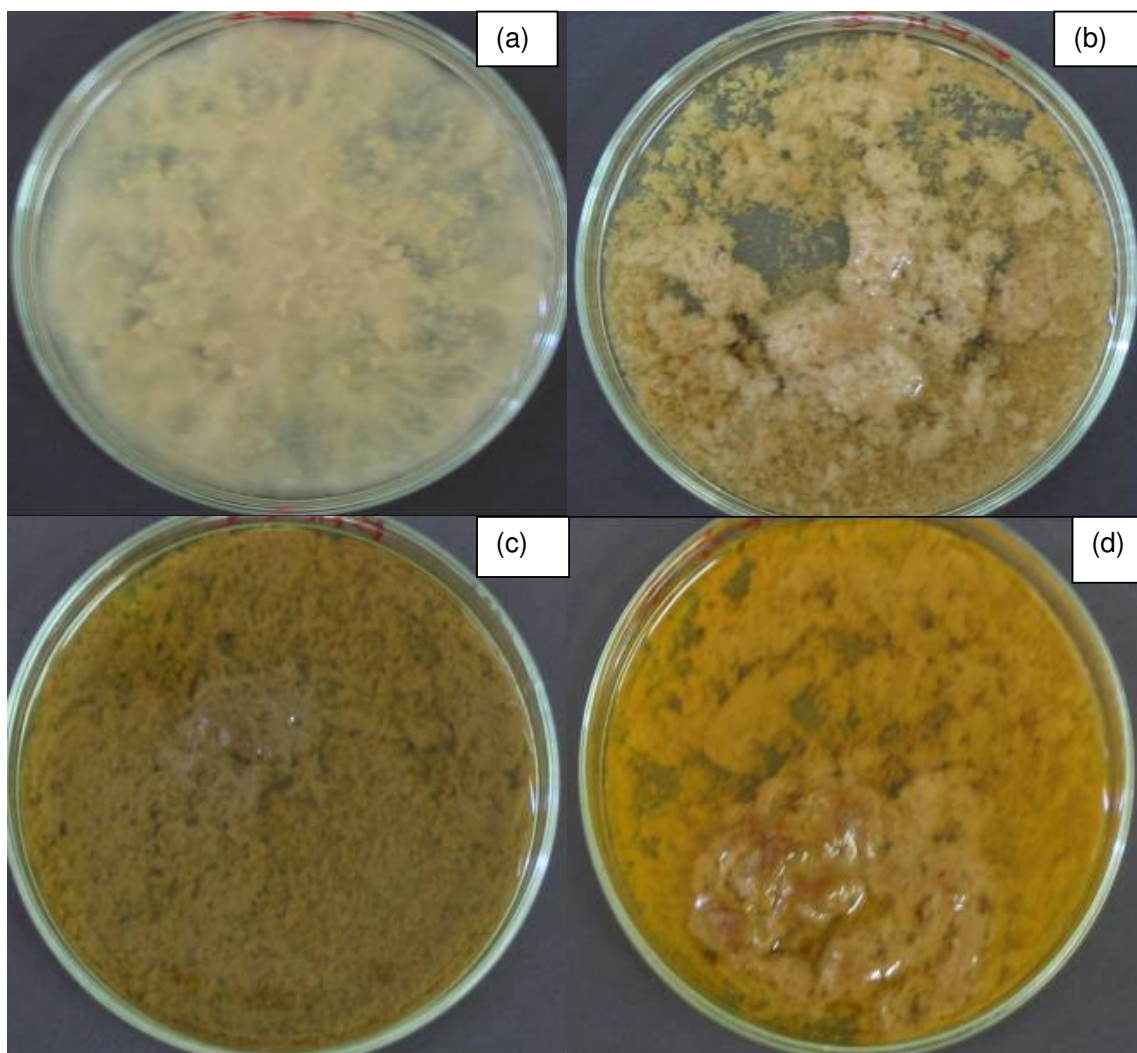


Figura 11- Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir de sacarose 4% (a), extrato aquoso de resíduo de PTS 6% (b), melaço bruto 8% (c), melaço pré-tratado 8% (d)

Observa-se diferença na coloração dos biopolímeros. Aquele produzido a partir de sacarose 4% tem uma coloração creme clara, enquanto aquele produzido a partir de extrato aquoso de resíduo de PTS 6% tem uma coloração mais amarelada e os produzidos a partir de melaço têm coloração bastante escura, sendo o de melaço pré-tratado um pouco mais claro que o de melaço bruto.

Cabe ressaltar que a coloração do biopolímero obtido a partir dos diferentes meios poderá limitar sua aplicação para alguns produtos. Porém, considerando-se que o percentual de uso necessário para conferir ao produto final características espessantes é baixo ($\pm 3\%$), o problema da cor poderá desaparecer.

4.7 Produção de biopolímero em diferentes tempos de fermentação

A fim de verificar o comportamento da produtividade e posterior qualidade da goma, comparado-se tempos de fermentação de 48 h e 72 h, conduziu-se uma fermentação a 28°C, 208 rpm e 48 h, em quadruplicata, com meio convencional (sacarose 4%) e com melaço pré-tratado 8%. Os dados foram tratados estatisticamente através de Teste de Tukey, e são apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13 – Produtividades das fermentações de 48 e 72h para sacarose 4%

Condição	Produtividade média e desvio padrão
48 horas de fermentação	0,075* $\pm$ 0,012 ^a
72 horas de fermentação	0,041* $\pm$ 0,006 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

Tabela 14 – Produtividades das fermentações de 48 e 72h para melaço pré-tratado 8%

Condição	Produtividade média e desvio padrão
48 horas de fermentação	0,355* $\pm$ 0,085 ^a
72 horas de fermentação	0,290* $\pm$ 0,050 ^a

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

Observa-se, na Tabela 13, que as produtividades médias foram superiores em 48 h, porém, para o melaço pré-tratado 8% (Tabela 14) o teste de Tukey mostrou que elas não diferem entre si ($p < 0,05$). Outra consideração importante a fazer é que a qualidade reológica das gomas de 48 h foi bastante inferior à de 72 h, conforme mostrado através dos resultados de viscosidade aparente (Figuras 15 e 16).

Estas informações permitem concluir que, apesar de, em 48 h de fermentação obter-se maior produtividade, possivelmente não tenha havido o completo arranjo das cadeias (baixos valores de viscosidade aparente), necessitando de maior tempo de fermentação para que isso ocorra.

4.8 Reologia do biopolímero

As propriedades reológicas foram avaliadas através da análise de viscosidade aparente, para verificar a qualidade das gomas produzidas, demonstrando o comportamento

das soluções aquosas e salinas do polímero nas temperaturas de 25 e 60°C, conforme apresentado nas Figuras 12 a 16.

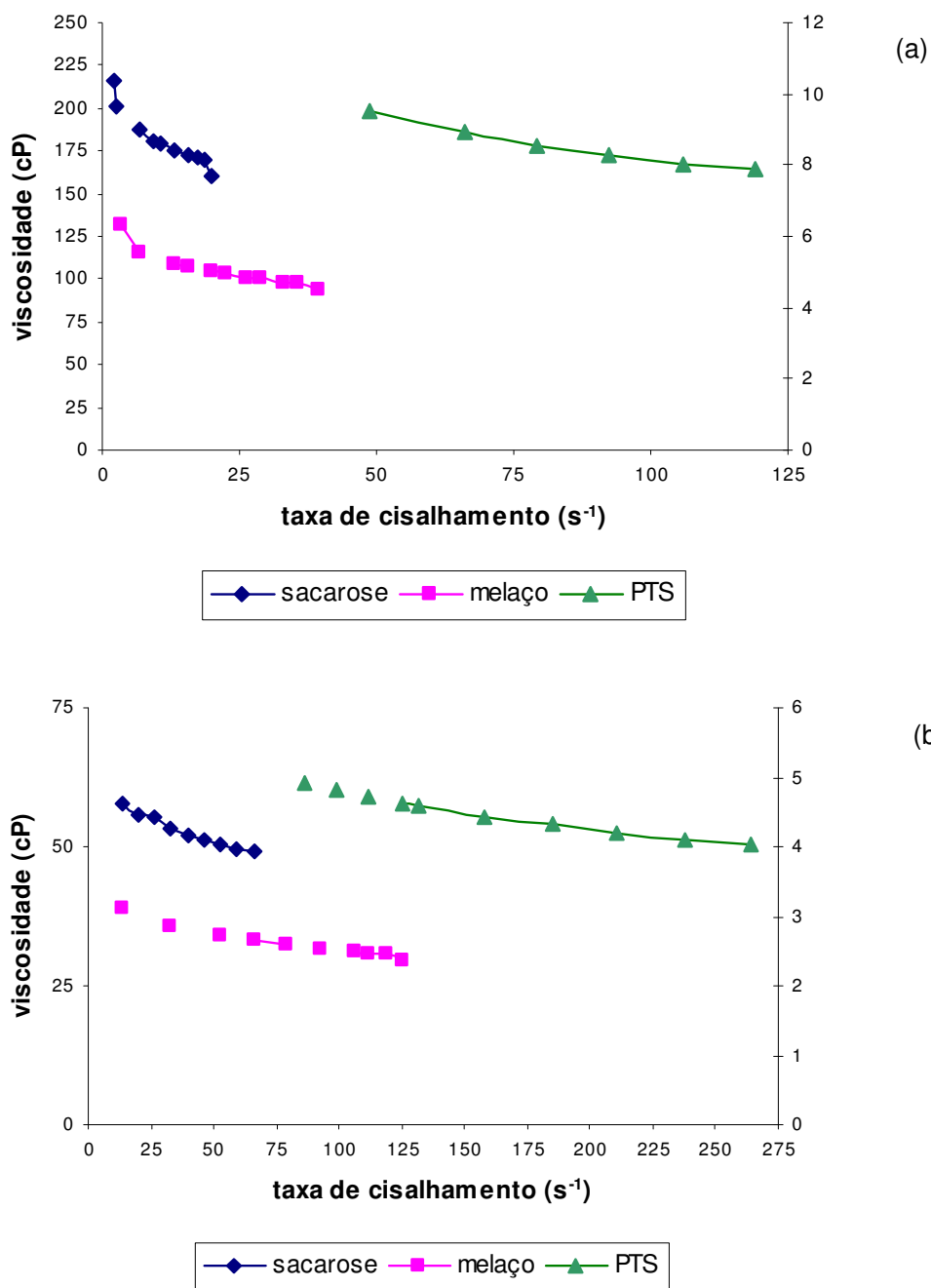


Figura 12- Viscosidade aparente de soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas a partir de sacarose 4%, melão pré-tratado 8% (eixo da esquerda) e extrato aquoso de resíduo de PTS 6% (eixo da direita), 72h fermentação, 25°C (a) e 60°C (b)

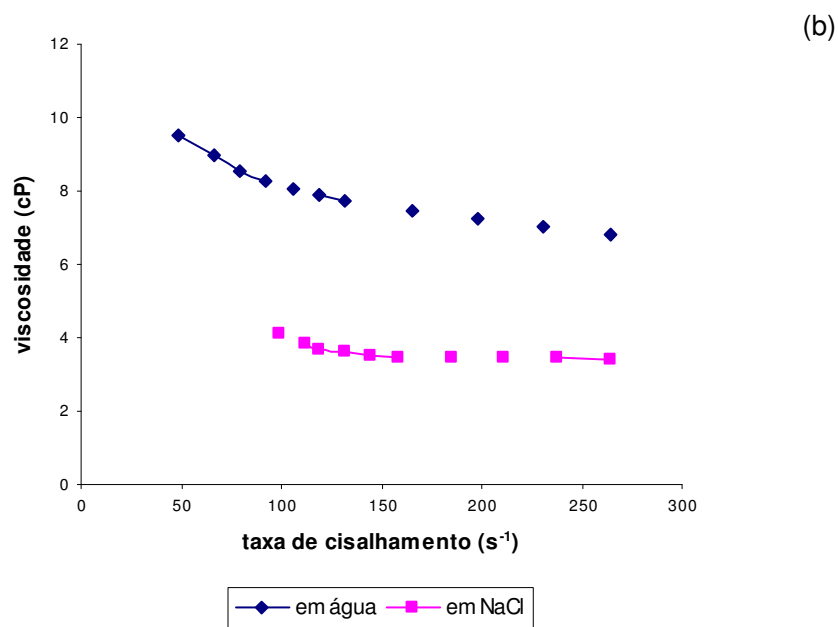
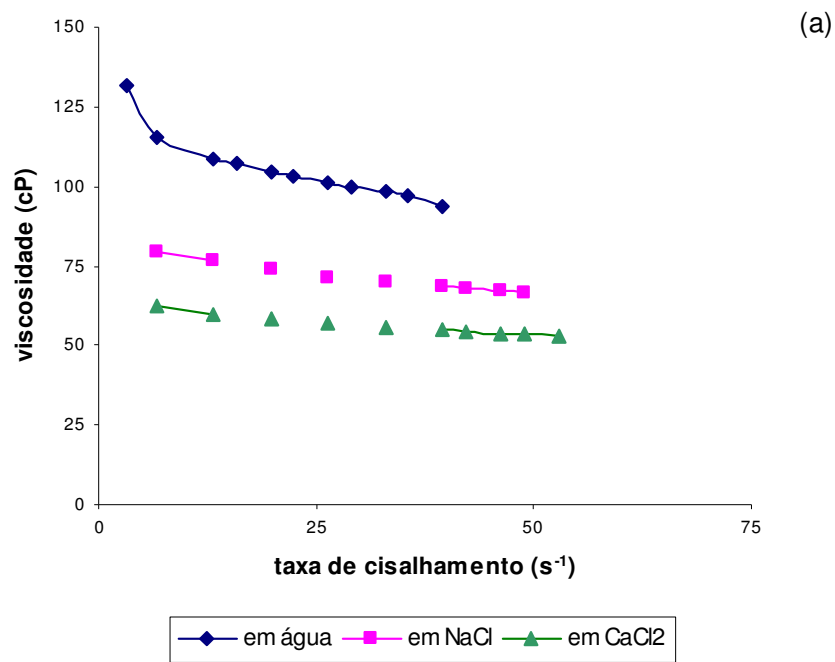


Figura 13- Viscosidade aparente de soluções aquosas e salinas a 3% das gomas sintetizadas a partir de melaço pré-tratado 8% (a) e extrato aquoso de resíduo de PTS 6% (b), 72h fermentação, 25°C

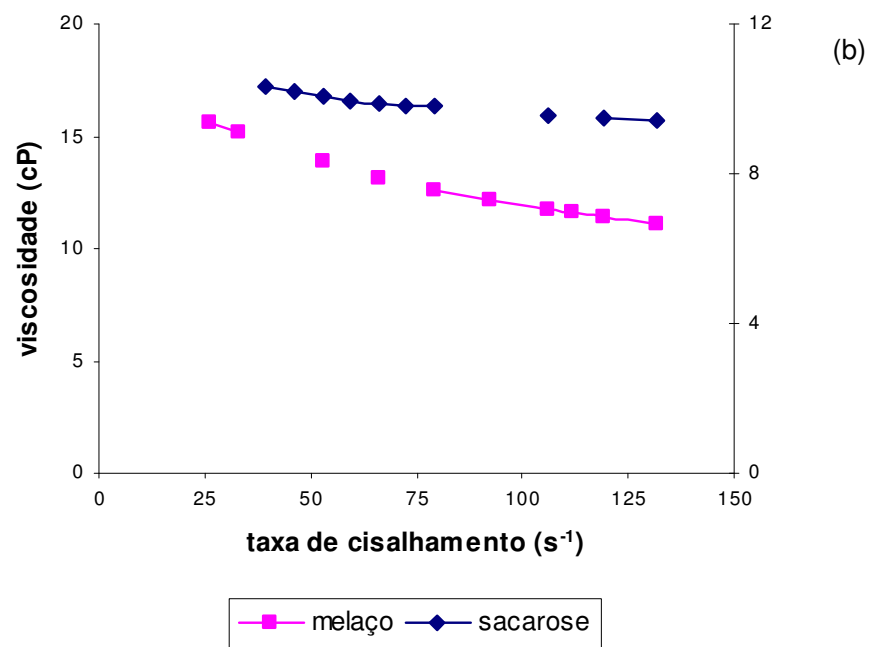
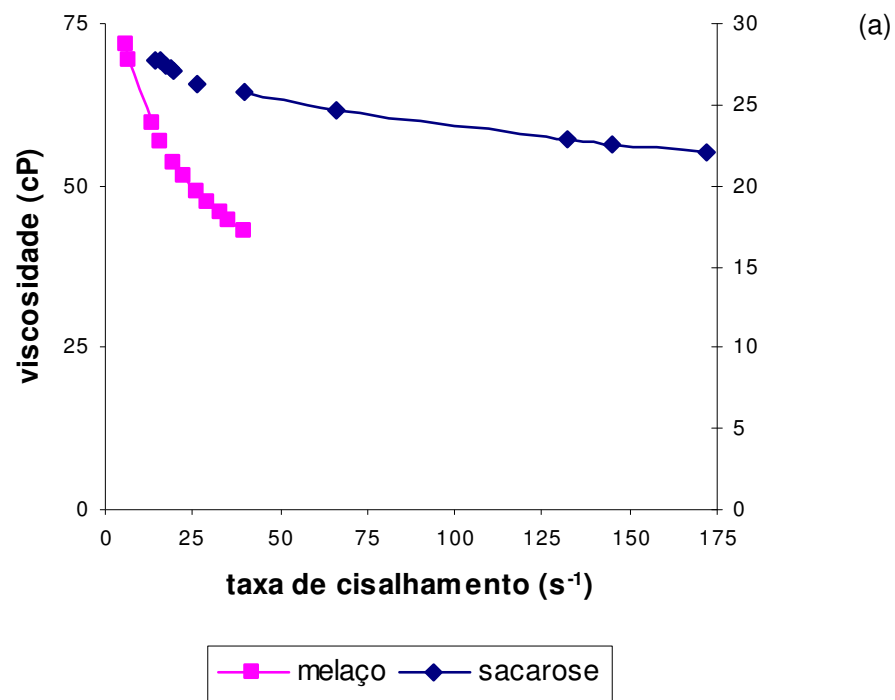
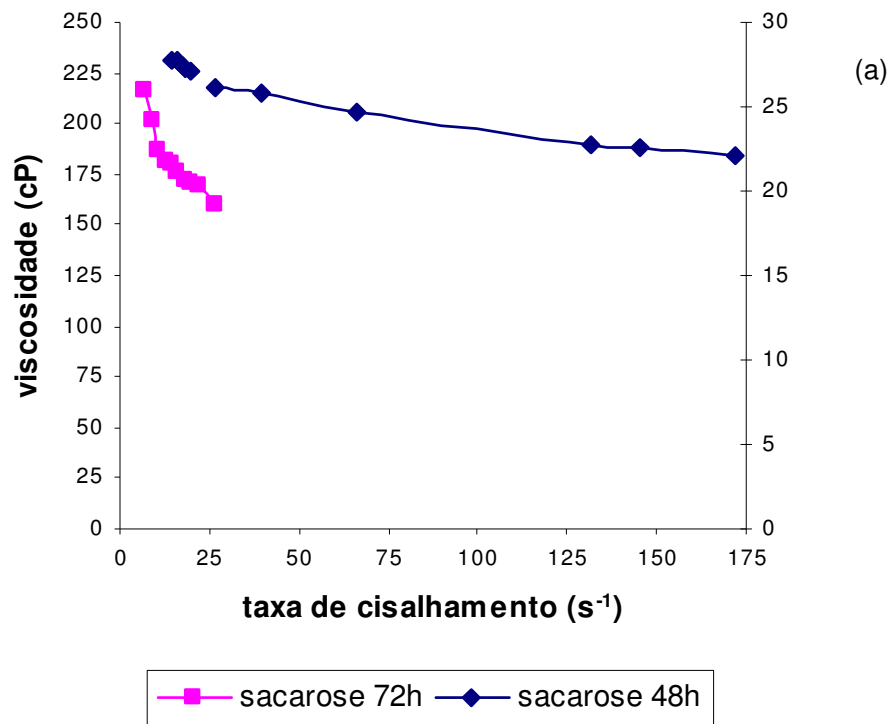


Figura 14- Viscosidade aparente de soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas a partir de sacarose 4% (eixo da direita) e melaço pré-tratado 8% (eixo da esquerda), 48h fermentação, 25°C (a) e 60°C (b)

(a)



(b)

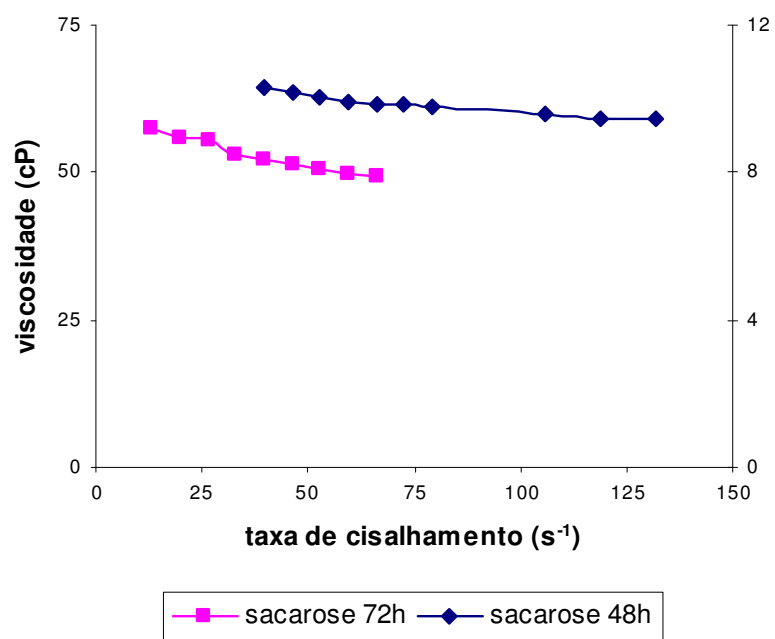


Figura 15- Viscosidade aparente de soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas a partir de sacarose 4%, 48h (eixo da direita) e 72h (eixo da esquerda) fermentação, 25°C (a) e 60°C (b)

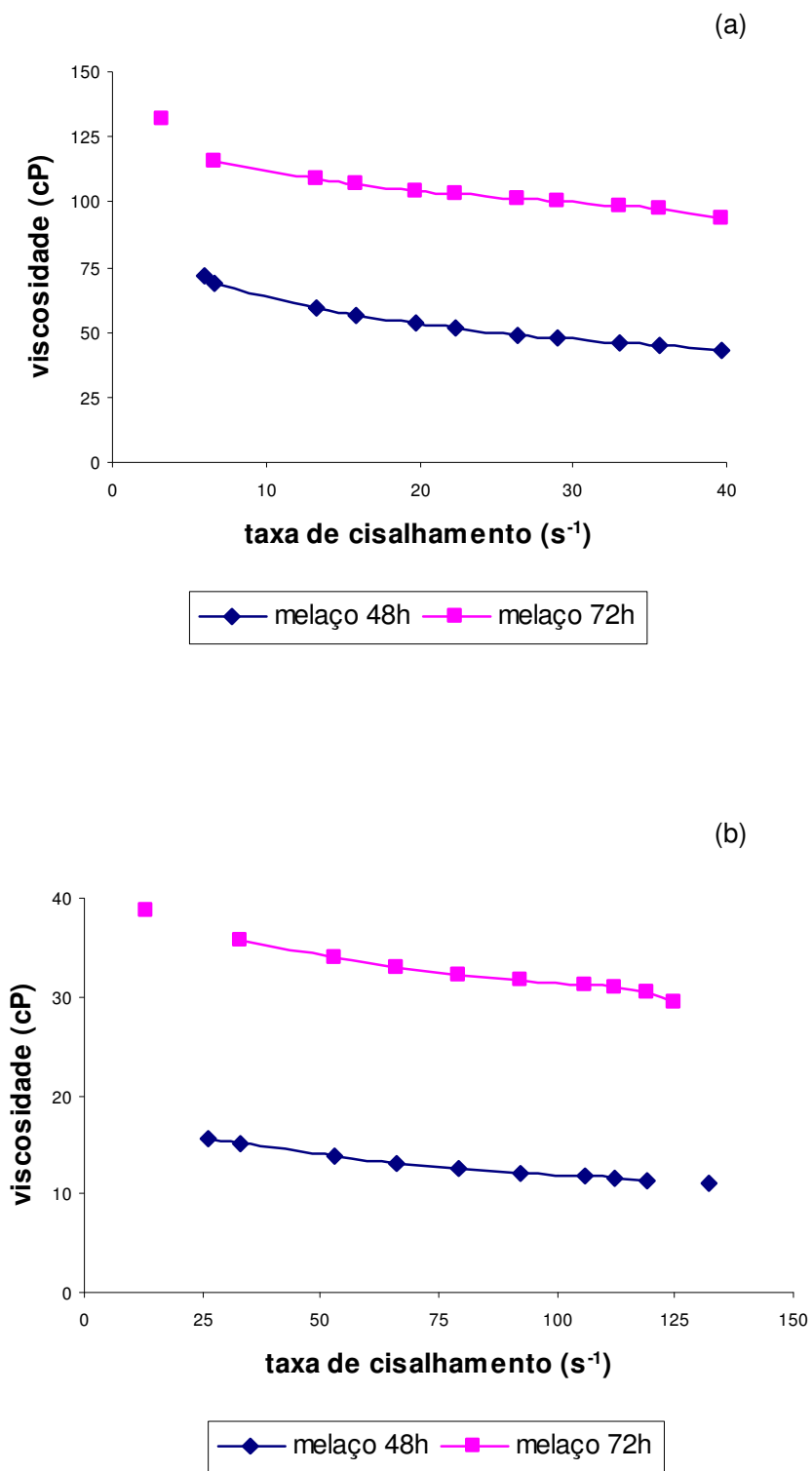


Figura 16- Viscosidade aparente de soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas a partir de melaço pré-tratado 8%, 48h e 72h fermentação, 25°C (a) e 60°C (b)

As Figuras 12 a 16 mostram o comportamento pseudoplástico das soluções, isto é, a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Esse comportamento é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (AMANULLAH *et al.*, 1996; CACIK *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 2003; PADILHA, 2004).

Verifica-se ainda que os valores de viscosidade aparente das soluções aquosas e salinas das três gomas são menores para as leituras a 60°C, demonstrando que a viscosidade diminui com o aumento da temperatura (Figuras 12, 14, 15 e 16).

García-Ochoa *et al.* (2000) mostram que a viscosidade das soluções de xantana dependem da temperatura na qual a viscosidade é medida, sendo que esta diminui com o aumento da temperatura.

Para soluções aquosas de gomas de 72 h de fermentação, em ambas temperaturas, a goma produzida com sacarose 4% apresentou qualidade reológica superior àquela produzida com melaço pré-tratado 8% (Tabelas 19 e 20) e ambas foram reologicamente superiores a goma produzida com extrato aquoso de resíduo de PTS 6% (Figura 12). Já as soluções salinas apresentaram viscosidades aparentes menores do que as soluções aquosas (Figura 13).

A literatura apresenta algumas explicações para esse comportamento. Para baixas concentrações de polímero, a viscosidade da xantana diminui quando uma pequena quantidade de sais é adicionada na solução, efeito atribuído a redução nas dimensões moleculares, resultante de forças eletrostáticas intermoleculares diminuídas. A viscosidade aumenta para altas concentrações de xantana ou quando uma grande quantidade de sais é adicionada. Esse efeito é devido, provavelmente, ao aumento da interação entre as moléculas de polímero (SMITH & PACE, 1982 apud GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MILAS *et al.*, 1985 apud GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Lee *et al.* (2003) mostraram o efeito da concentração de NaCl sobre a tensão de cisalhamento de soluções de mistura gelana/ gelatina. A tensão de cisalhamento diminui com o aumento do nível de NaCl e, portanto, a viscosidade aparente das soluções diminui com o aumento do nível de íons sódio. Uma possível explicação é que a presença excessiva de íons por adição de sais pode aumentar a repulsão eletrostática, resultando em interações fracas entre as moléculas. Mudanças substanciais positivas na solução são vistas como a causa da redução da viscosidade aparente.

López *et al.* (2004) observaram uma diminuição na viscosidade de soluções padrão de xantana quando aumentaram a concentração de sais, sendo esta variação mais

acentuada na presença de cátions divalentes (MgCl_2). Ao contrário de Padilha (2003), que obteve aumento da viscosidade aparente de soluções de xantana em presença de íons cálcio.

Através das Figuras 15 e 16 e das Tabelas 21 e 22, observa-se que, tanto na temperatura de 25°C quanto na de 60°C, a qualidade reológica das soluções de gomas de 48 h de fermentação, produzidas com melaço pré-tratado 8% é melhor do que a produzida com sacarose 4%, ao contrário do que ocorreu com as gomas produzidas com 72 h de fermentação (Tabelas 15 a 18).

Esse comportamento foi comprovado estatisticamente através de Teste de Tukey, onde comparou-se leituras de viscosidade aparente a 25°C, taxa de cisalhamento de 13,2 s^{-1} , para gomas produzidas a partir de sacarose 4% e melaço pré-tratado 8%, com 48h e 72h de fermentação e a 60°C, taxa de cisalhamento de 52,8 s^{-1} , para gomas produzidas a partir de sacarose 4% e melaço pré-tratado 8%, com 48h e 72 h de fermentação. As Tabelas 15, 16, 17 e 18 mostram as viscosidades aparentes médias e desvios padrão para estas leituras.

Tabela 15 – Viscosidades aparentes a 25°C, 13,2 s^{-1} , para gomas sintetizadas a partir de sacarose 4%, com 48h e 72h de fermentação

Tempo de fermentação	Viscosidade aparente média e desvio padrão
48 horas	27,717* $\pm$ 0,284 ^a
72 horas	167,160* $\pm$ 4,594 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

Tabela 16 – Viscosidades aparentes a 25°C, 13,2 s^{-1} , para gomas sintetizadas a partir de melaço pré-tratado 8%, com 48h e 72h de fermentação

Tempo de fermentação	Viscosidade aparente média e desvio padrão
48 horas	59,650* $\pm$ 0,173 ^a
72 horas	108,863* $\pm$ 7,746 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey

Tabela 17 – Viscosidades aparentes a 60°C, 52,8 s⁻¹, para gomas sintetizadas a partir de sacarose 4%, com 48h e 72h de fermentação

Tempo de fermentação	Viscosidade aparente média e desvio padrão
48 horas	10,043* ± 0,152 ^a
72 horas	50,460* ± 6,525 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey

Tabela 18 – Viscosidades aparentes a 60°C, 52,8 s⁻¹, para gomas sintetizadas a partir de melaço pré-tratado 8%, com 48h e 72h de fermentação

Tempo de fermentação	Viscosidade aparente média e desvio padrão
48 horas	13,833* ± 0,202 ^a
72 horas	34,017* ± 2,608 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey

A fim de comprovar estatisticamente os comportamentos apresentados pelas soluções das gomas, foram realizados Testes de Tukey para diferentes condições de leitura, tempo de fermentação e tipo de solução (aquosa ou salina). As Tabelas 19, 20, 21 e 22 mostram os resultados desses testes.

Tabela 19 – Viscosidades aparentes a 25°C, 13,2 s⁻¹, para gomas sintetizadas a partir de sacarose 4% e melaço pré-tratado 8%, com 72h de fermentação

Tipo de goma	Viscosidade aparente média e desvio padrão
Sintetizada a partir de sacarose 4%	167,160* ± 4,594 ^a
Sintetizada a partir de melaço pré-tratado 8%	108,863* ± 7,746 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey

Tabela 20 – Viscosidades aparentes a 60°C, 13,2 s⁻¹, para gomas sintetizadas a partir de sacarose 4% e melaço pré-tratado 8%, com 72h de fermentação

Tipo de goma	Viscosidade aparente média e desvio padrão
Sintetizada a partir de sacarose 4%	57,630* ± 9,166 ^a
Sintetizada a partir de melaço pré-tratado 8%	38,850* ± 3,150 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey

Tabela 21 – Viscosidades aparentes a 25°C, 13,2 s⁻¹, para gomas sintetizadas a partir de sacarose 4% e melaço pré-tratado 8%, com 48h de fermentação

Tipo de goma	Viscosidade aparente média e desvio padrão
Sintetizada a partir de sacarose 4%	27,717* ± 0,284 ^a
Sintetizada a partir de melaço pré-tratado 8%	59,650* ± 0,173 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey

Tabela 22 – Viscosidades aparentes a 60°C, 52,8 s⁻¹, para gomas sintetizadas a partir de sacarose 4% e melaço pré-tratado 8%, com 48h de fermentação

Tipo de goma	Viscosidade aparente média e desvio padrão
Sintetizada a partir de sacarose 4%	10,043* ± 0,152 ^a
Sintetizada a partir de melaço pré-tratado 8%	13,833* ± 0,202 ^b

*Letras minúsculas diferentes representam diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey

Para confirmação do comportamento pseudoplástico das soluções das gomas produzidas a partir de 72 h de fermentação, com os diferentes substratos, foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald – de Waele aos dados experimentais, a partir da regressão linear. Foi obtida a viscosidade calculada ($\log \gamma \times \log \sigma$) que foi comparada com a viscosidade experimental. Estes resultados são apresentados nas Figuras 17 a 25. Junto às legendas de cada uma das figuras são apresentado os R² e os valores de K e n.

As Figuras 17 a 25 mostram um bom ajuste do modelo aos dados experimentais, com um comportamento pseudoplástico característico, sendo este comportamento discreto para as soluções aquosas a 60°C e salinas a 25°C das gomas sintetizadas a partir de extrato aquoso de resíduo de PTS 6% (Figuras 24 e 25). Observa-se um discreto tixotropismo para as taxas de cisalhamento menores para as soluções aquosas de gomas sintetizadas a partir de sacarose 4% e melaço pré-tratado 8%, para leituras de viscosidade aparente a 60°C e para soluções aquosas de gomas sintetizadas a partir de extrato aquoso de resíduo de PTS 6%, para leituras a 25°C e também para soluções salinas (CaCl₂) de gomas sintetizadas a partir de melaço pré-tratado 8% a 25°C (Figuras 18 b, 20 b, 22 b e 23 b). Ao contrário das demais soluções aquosas lidas a 60°C, as de gomas sintetizadas a partir de extrato aquoso de resíduo de PTS 6% parecem demonstrar leve reopexia para as menores taxas de cisalhamento (Figura 24 b).

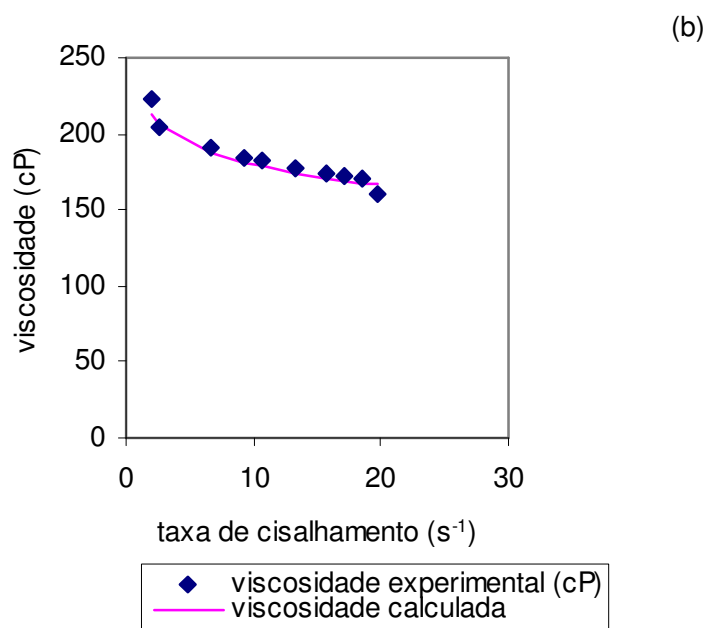
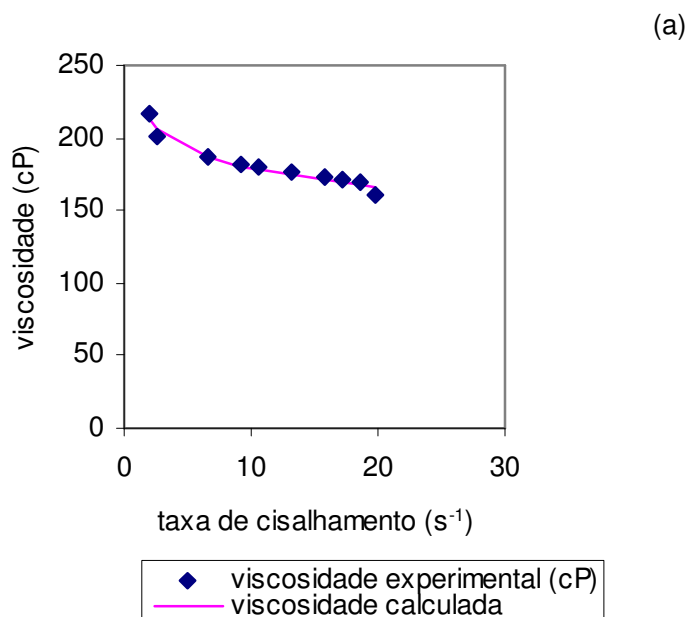


Figura 17- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas 3% das gomas sintetizadas a partir de sacarose 4%, 72h fermentação, leituras a 25°C, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 0,9995$, $K = 2,2898$, $n = 0,8940$) e volta ($R^2 = 0,9992$, $K = 2,3538$, $n = 0,8867$)

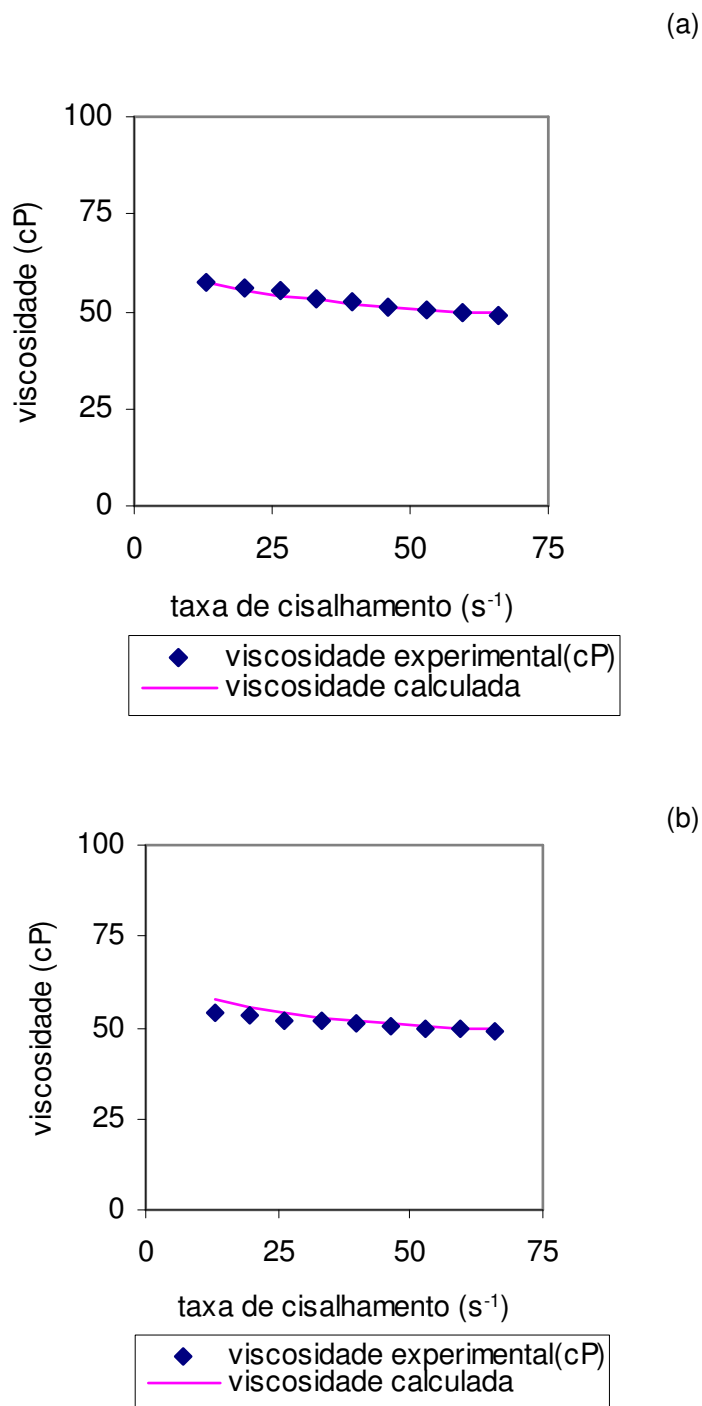


Figura 18- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas 3% das gomas sintetizadas a partir de sacarose 4%, 72h fermentação, leituras a 60°C, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 0,9999$, $K = 0,7436$, $n = 0,9023$) e volta ($R^2 = 1$, $K = 0,6382$, $n = 0,9381$)

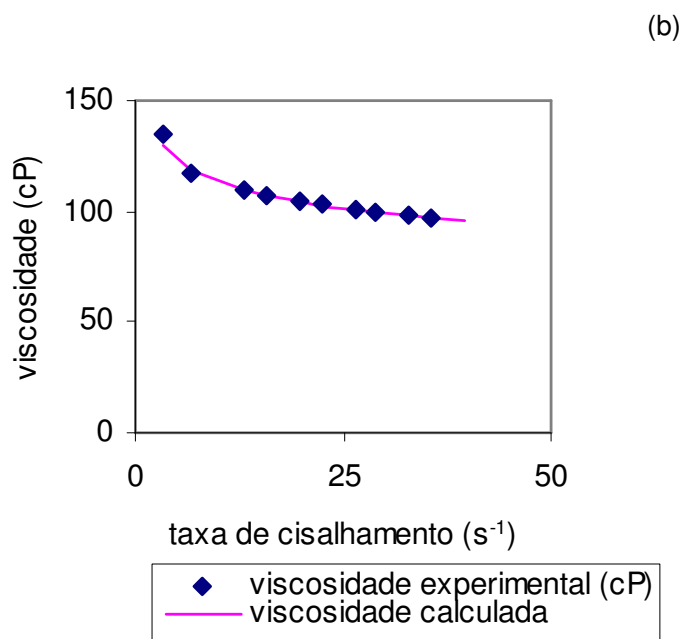
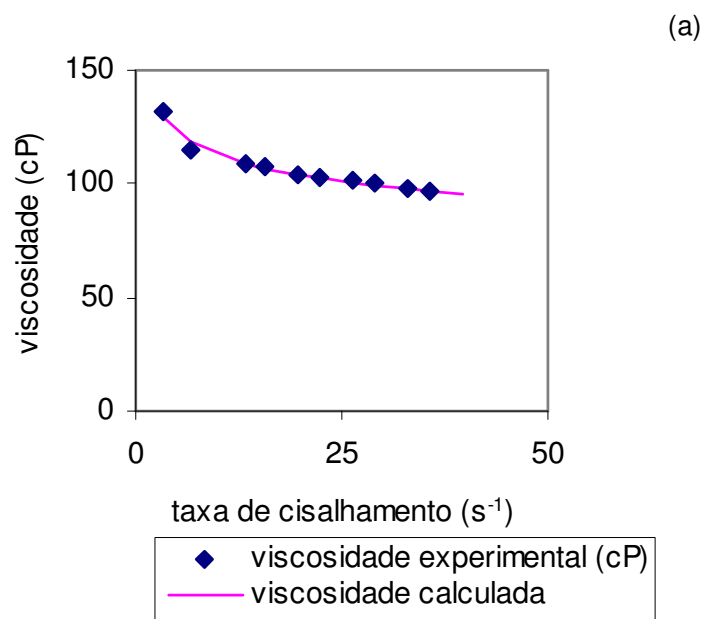


Figura 19- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas 3% das gomas sintetizadas a partir de melão pré-tratado 8%, 72h fermentação, leituras a 25°C, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 0,9996$, $K = 1,4973$, $n = 0,8781$) e volta ($R^2 = 0,9996$, $K = 1,5410$, $n = 0,8701$)

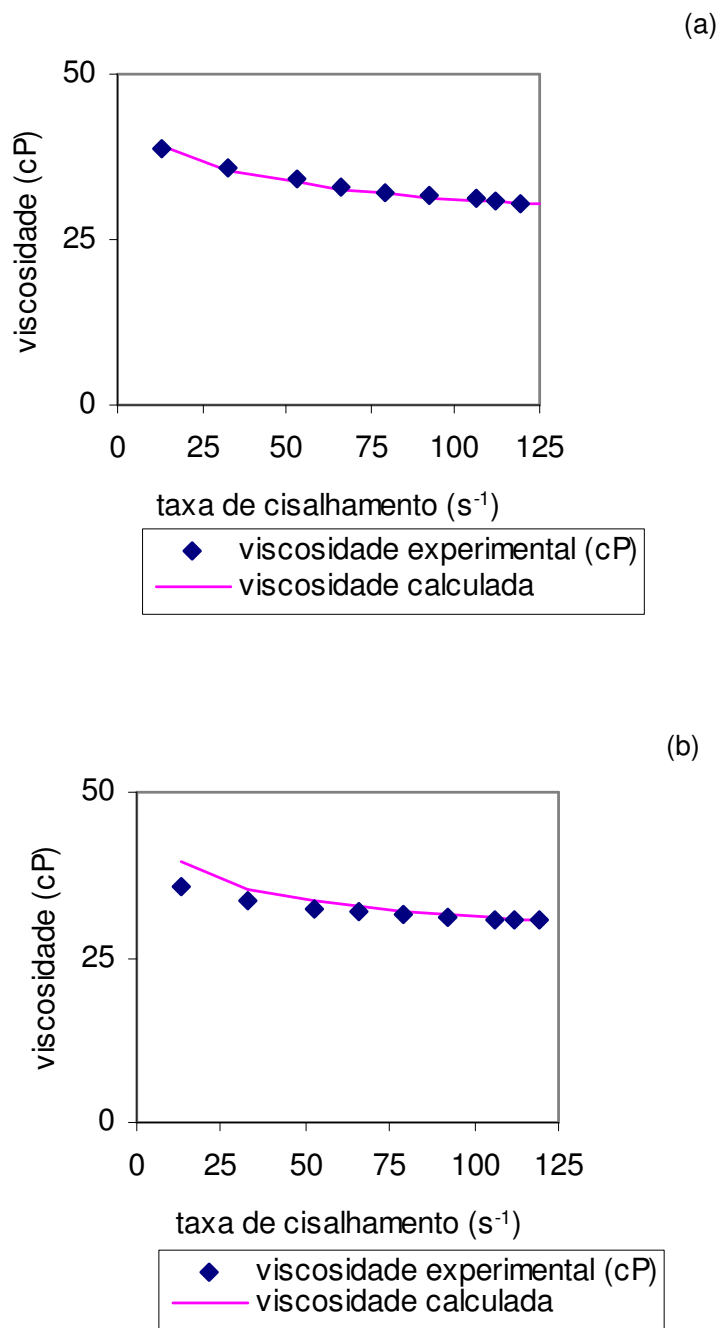


Figura 20- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas 3% das gomas sintetizadas a partir de melaço pré-tratado 8%, 72h fermentação, leituras a 60°C, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 0,9999$, $K = 0,5299$, $n = 0,8848$) e volta ($R^2 = 1$, $K = 0,4388$, $n = 0,9232$)

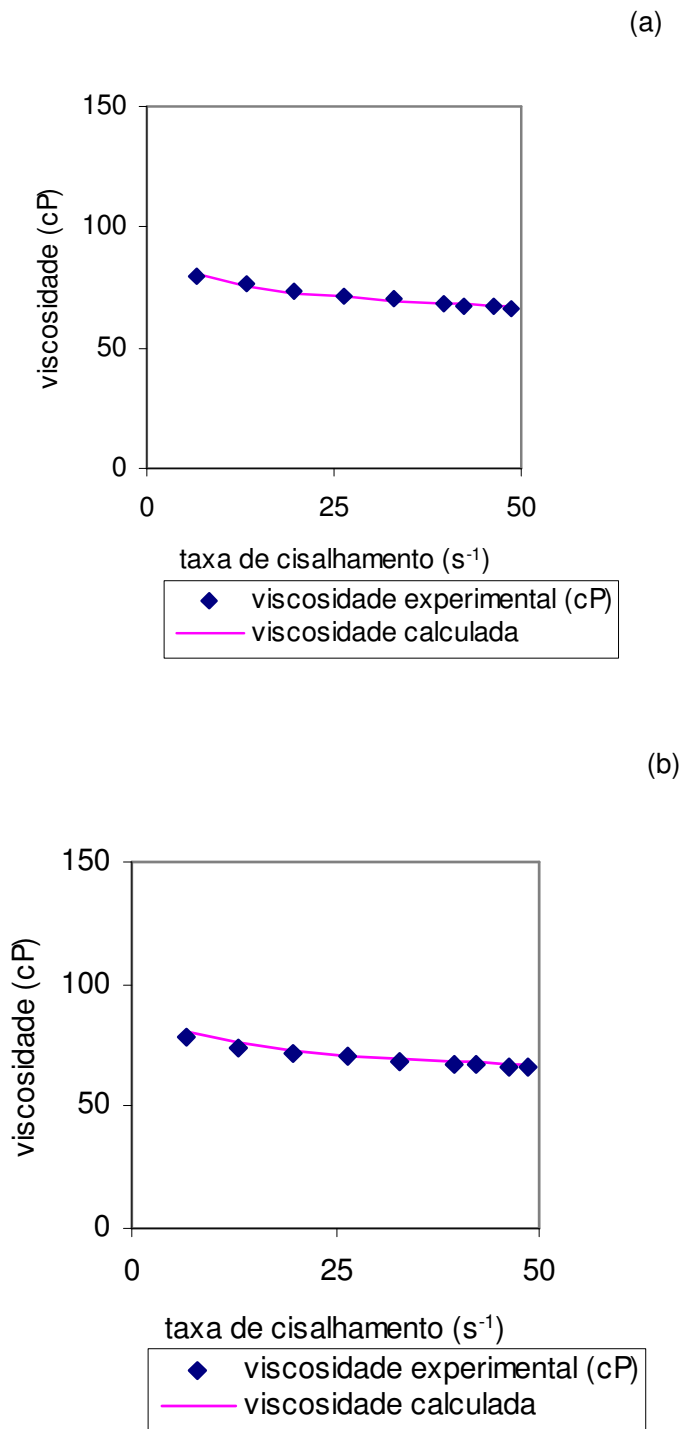
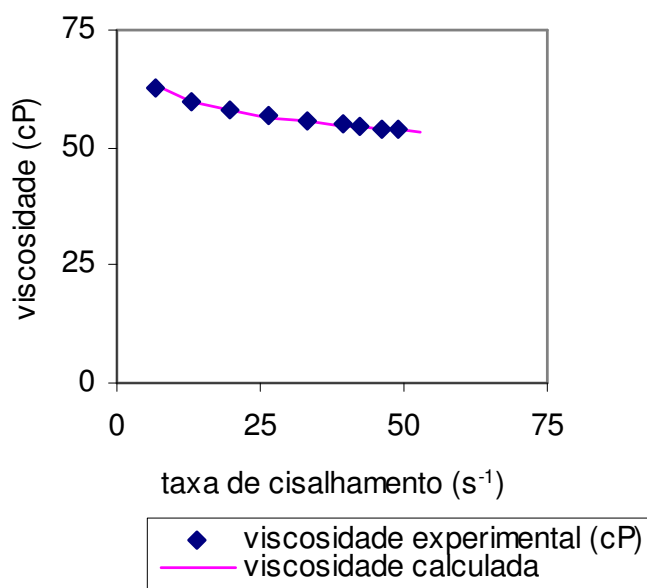


Figura 21- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções salinas (NaCl) 3% das gomas sintetizadas a partir de melão pré-tratado 8%, 72h fermentação, leituras a 25°C, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 0,9998$, $K = 0,9614$, $n = 0,9072$) e volta ($R^2 = 1$, $K = 0,9255$, $n = 0,9141$)

(a)



(b)

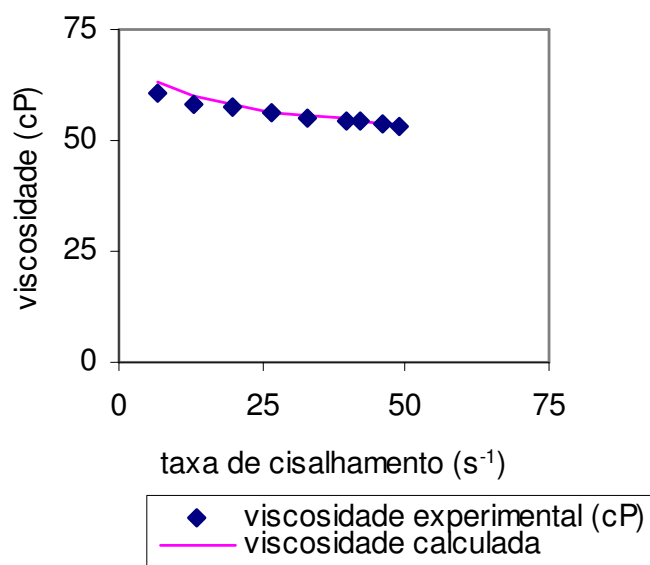
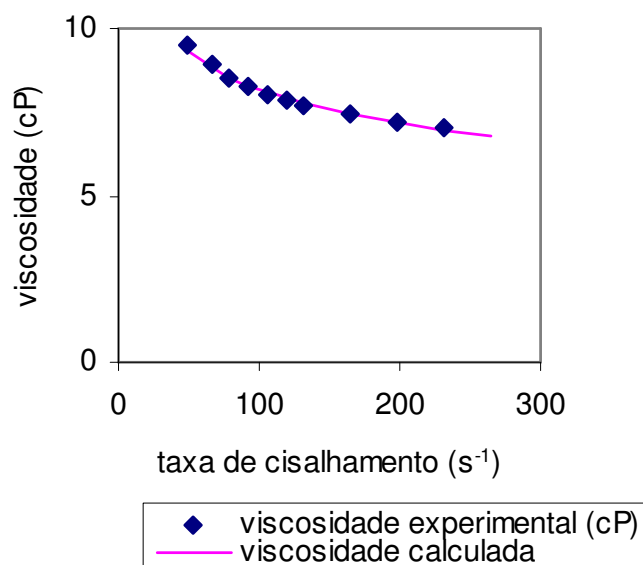


Figura 22- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções salinas ($CaCl_2$) 3% das gomas sintetizadas a partir de melaço pré-tratado 8%, 72h fermentação, leituras a $25^{\circ}C$, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 1$, $K = 0,7342$, $n = 0,9200$) e volta ($R^2 = 1$, $K = 0,6950$, $n = 0,9332$)

(a)



(b)

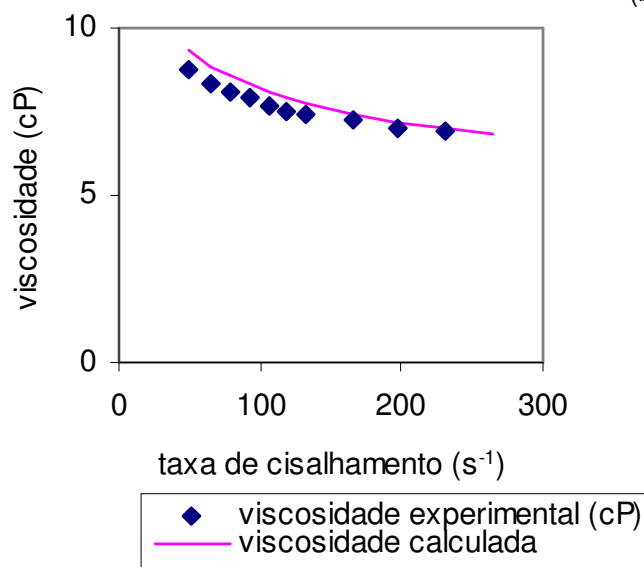
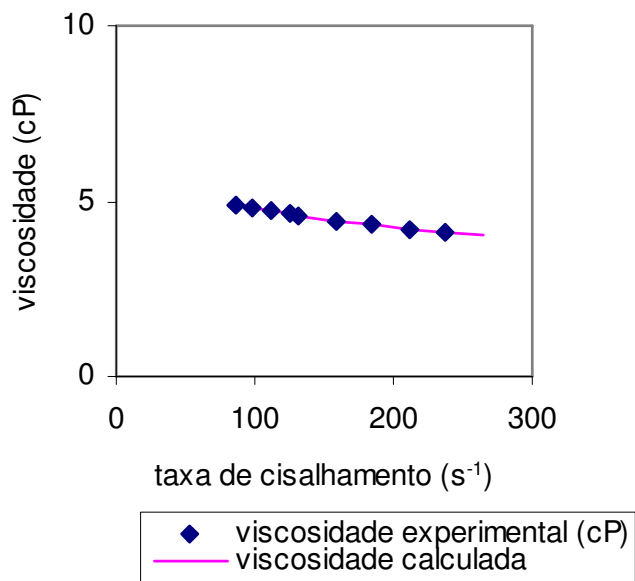


Figura 23- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas 3% das gomas sintetizadas a partir de extrato aquoso de resíduo de PTS 6%, 72h fermentação, leituras a 25°C, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 0,9996$, $K = 0,1955$, $n = 0,8109$) e volta ($R^2 = 0,9996$, $K = 0,1548$, $n = 0,8510$)

(a)



(b)

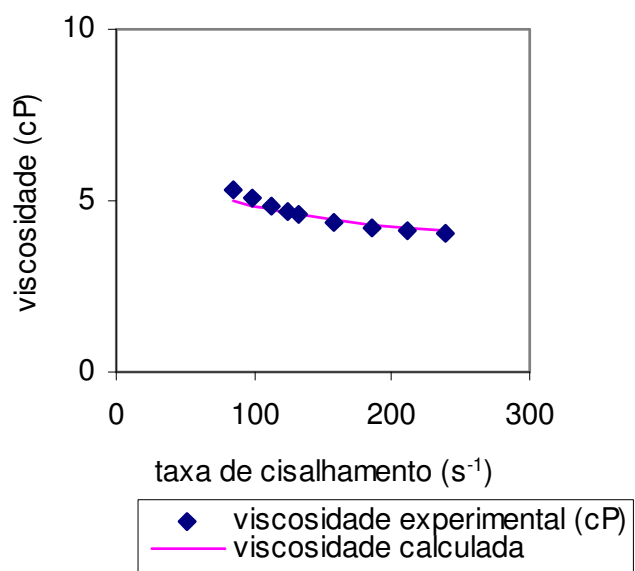
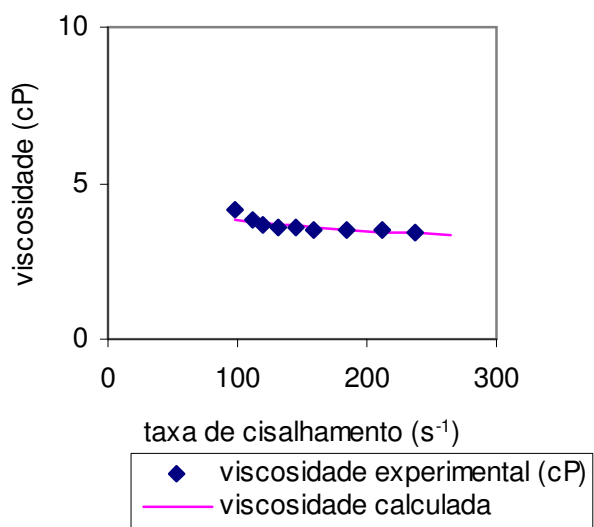


Figura 24- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas 3% das gomas sintetizadas a partir de extrato aquoso de resíduo de PTS 6%, 72h fermentação, leituras a 60°C, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 0,9999$, $K = 0,1148$, $n = 0,8121$) e volta ($R^2 = 0,9916$, $K = 0,1524$, $n = 0,7562$)

(a)



(b)

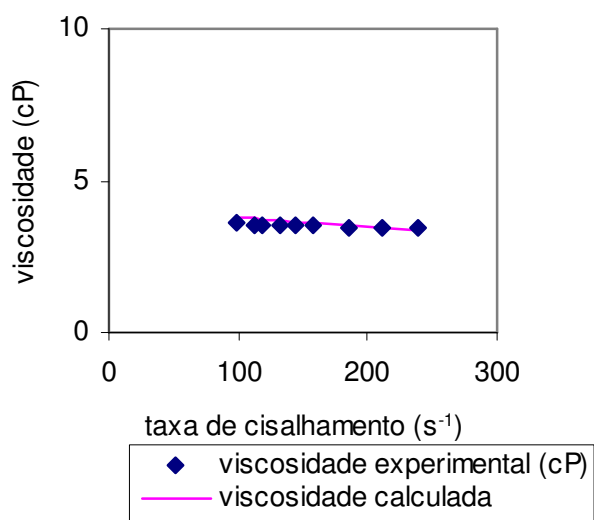


Figura 25- Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções salinas (NaCl) 3% das gomas sintetizadas a partir de extrato aquoso de resíduo de PTS 6%, 72h fermentação, leituras a 25°C, ida (a) e volta (b). Ida ($R^2 = 0,9889$, $K = 0,0709$, $n = 0,8655$) e volta ($R^2 = 0,9999$, $K = 0,0432$, $n = 0,9586$)

Comparando-se os valores de viscosidade aparente obtidos neste trabalho com os de outros pesquisadores para soluções aquosas de diferente biopolímeros observa-se resultados similares. Porém, deve-se considerar que a concentração de biopolímero em solução utilizada foi superior. Por exemplo, para uma taxa de cisalhamento de aproximadamente 10 s^{-1} , Navarrete e Shah (2001) obtiveram uma viscosidade aparente de aproximadamente 100 cP, para soluções $1,4 \times 10^{-4}\%$ de diutana, a 24°C e Ashtaputre e Shah (1995 b) obtiveram uma viscosidade aparente de aproximadamente 200 cP, para soluções 0,5% de biopolímero, a 30°C . Os resultados obtidos mostraram uma viscosidade aparente média de 176 cP, para soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de sacarose 4%, a 25°C e de 109 cP para soluções aquosas a 3% de goma sintetizada a partir de melão pré-tratado 8%, a 25°C .

Pode-se concluir, portanto que, apesar das soluções de biopolímeros sintetizados por *Sphingomonas capsulata*, a partir dos diferentes meios estudados apresentarem viscosidades inferiores às citadas na literatura, uma vez que trabalhou-se com concentrações maiores de polímero em solução, os mesmos podem encontrar aplicação em produtos que requeiram uma capacidade espessante menor.

Outra consideração importante aponta para o estudo da interação destes biopolímeros com outras gomas, com o objetivo de promover um aumento sinérgico da viscosidade, assim como ocorre entre xantana e galactomananas.

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- É possível produzir biopolímero a partir de *Sphingomonas capsulata*, utilizando-se meio convencional e meios industriais.
- A condição maximizada para a produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata*, a partir de meio convencional, dentro das faixas estudadas foi 28°C, 208 rpm, 72 h de fermentação, em meio contendo 4% de sacarose. A produtividade obtida nessa condição foi 0,038 gL⁻¹ h⁻¹.
- Melaço (bruto e pré-tratado) e resíduo de PTS são substratos possíveis para a produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata*, apresentando produtividades superiores (0,190, 0,290 e 0,240 gL⁻¹h⁻¹, respectivamente) às obtidas com o meio convencional, na condição maximizada de fermentação.
- Os biopolímeros produzidos por *Sphingomonas capsulata* apresentaram comportamento reológico característico de soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos, mostrando valores de viscosidade aparente de 167,16 e 108,86, para soluções aquosas de goma 3% sintetizadas a partir de sacarose 4% e melaço pré-tratado 8%, respectivamente, medidos a 25°C, para uma taxa de cisalhamento de 13,2 s⁻¹.

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar geneticamente o microrganismo *Sphingomonas capsulata*, utilizando técnicas de ribotipagem e outras técnicas de biologia molecular.
- Comparar o perfil genético dos diferentes repiques da *Sphingomonas capsulata* e da *Xanthomonas campestris* CA 110, através da técnica de RAPD.
- Realizar a cinética do processo fermentativo para a condição maximizada de produção de biopolímero, com o meio convencional e com os meios industriais.
- Otimizar a produção de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata*, através de planejamento experimental, para os meios convencional e industriais, em fermentador.
- Caracterizar a estrutura dos polissacarídeos através de técnicas cromatográficas e RMN.
- Analisar a viscoelasticidade das soluções aquosas dos biopolímeros.

REFERÊNCIAS

- AMANULLAH, A.; SERRANO, L. C.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, 12, 466-473, 1996
- ASHTAPUTRE, A. A. & SHAH, A. K. Studies on the exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*-GS1: Nutritional requirements and precursor-forming enzymes. **Current Microbiology**, 31, 234-238, 1995a
- ASHTAPUTRE, A. A. & SHAH, A. K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. **Applied and Environmental Microbiology**, 61:3, 1159-1162, 1995b
- ASHTAPUTRE, A. A. & SHAH, A. K. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 11, 219-222, 1995c
- BAE, S. & SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, 20, 1366-1371, 2004
- BANIK, R. M.; KANARI, B. & UPADHYAY, S. N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 16, 407-414, 2000
- BLACK, G. E. & FOX, A. Recent progress in the analysis of sugar monomers from complex matrices using chromatography in conjunction with mass spectrometry or atand-alone tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 720, 51-60, 1996
- BOBBIO, F. O. & BOBBIO, P. A. **Introdução a Química de Alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 1992
- BOUFFAR-ROUPE, C. & HEYRAUD, A. Determination of the relative proportion of D-mannuronic and L-glucuronic acids in alginic acid by HPLC. **Food Hydrocolloids**, 5:6, 559-561, 1987

- BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures. **Process Biochemistry**, 39, 1201-1209, 2004
- BRESOLIN, T. M. B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J. L. M. S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **Biological Macromolecules**, 23, 263-275, 1998
- BROOKFIELD ENGINEERING LABS., INC. **More solutions to sticky problems – a guide to getting more from your Brookfield viscometer**, 2004
- CACIK, F.; DONDO, R. G.; MARQUES, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computers and Chemical Engineering**, 25, 409-418, 2001
- CAMPBELL, B. S.; McDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Why do exopolysaccharide yields from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation?. **Enzyme and Microbial Technology**, 33, 104-112, 2003
- CARVALHAL, M. L. C. Técnicas básicas em microbiologia. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Fundamentos**, v.1, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001
- CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCIA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, 282-291, 2000
- CHI, Z. & ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, 33, 206-211, 2003
- DILTZ, S. & ZELLER, S. G. Location of O-acetyl groups in S-657 using the reductive cleavage method. **Carbohydrate Research**, 331, 265-270, 2001
- DREVETON, E.; MONOT, F.; BALLERINI, D.; LECOURTIER, J.; CHOPLIN, L. Influence of fermentation hydrodynamics on gellan gum physicochemical

- characteristics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 82, 272-276, 1996
- DRUZIAN, J. I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.)**, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 2000
- FIALHO, A. M.; MARTINS, L. O.; DONVAL, M. L.; LEITÃO, J. H.; RIDOUT, M. J.; JAY, A. J.; MORRIS, V. J.; SÁ-CORREIA, I. Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. **Applied and Environmental Microbiology**, 65:6, 2485-2491, 1999
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, 18, 549-579, 2000
- GIAVASIS, I.; ROBERTSON, I.; McNEIL, B.; HARVEY, L. M. Simultaneous and rapid monitoring of biomass and biopolymer production by *Sphingomonas paucimobilis* using Fourier transform-near infrared spectroscopy. **Biotechnology Letters**, 25, 975-979, 2003
- GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. Gellan gum. **Critical Reviews Biotechnology**, 20:3, 177-211, 2000
- GRATÃO, A. C. A.; BERTO, M. I.; SILVEIRA JÚNIOR, V. Reologia do açúcar líquido invertido: influência da temperatura na viscosidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24: 4, 652-656, 2004
- HA, Y. W. & THOMAS, R. L. Simultaneous determination of neutral sugars and uronic acids in hydrocolloids. **Journal of Food Science**, 53:2, 574-577, 1988

- HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**, v.2, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Editora Williams & Wilkins, 1994
- JIN, H.; LEE, N-K.; SHIN, M-K.; KIM, S-K.; KAPLAN, D. L.; LEE, J-W. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace. **Biochemical Engineering Journal**, 16, 357-360, 2003
- KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, 39, 249-256, 2003
- KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKO, T. & COTTRELL, I. W. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, 43:5, 1086-1091, 1982
- KAWAHARA, K.; SEYDEL, U.; MATSUURA, M.; DANBARA, H.; RIETSCHEL, E. Th. & ZÄHRINGER, U. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. **Federation of European Biochemical Societies**, 292:1,2, 107-110, 1991
- LEE, K. Y.; SHIM, J.; BAE, I. Y.; CHA, J.; PARK, C. S.; LEE, H. G. Characterization of gellan/gelatin mixed solutions and gels. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, 36, 795-802, 2003
- LETISSE, F.; LINDLEY, N. D. & ROUX, G. Development of modeling approach for prediction of growth and xanthan gum production using *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Progress**, 19, 822-827, 2003

- LEWIS, M. J. **Propiedades Físicas de los Alimentos y los Sistemas de Processado**. Zaragoza: Editorial Acribia S. A., 1993
- LOBAS, D.; NIMTZ, M.; WRAY, V.; SCHUMPE, S.; PROPPE, C. & DECKWER, W. D. Structure and physical properties of the extracellular polysaccharide PS-P4 produced by *Sphingomonas paucimobilis* P4 (DSM 6418). **Carbohydrate Research**, 251, 303-313, 1994
- LOBAS, D.; SCHUMPE, S.; DECKWER, W. D. The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314). **Applied Microbiology and Biotechnology**, 37, 411-415, 1992
- LÓPEZ, M. J.; VARGAS-GARCÍA, M. C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. **Journal of Food Engineering**, 63, 111-115, 2004
- MANNA, B.; GAMBHIR, A. & GHOSH, P. Production and rheological characteristics of the microbial polysaccharide gellan. **Lett. Appl. Microbiol.**, 23, 141-145, 1996
- MARSUL PROTEÍNAS LTDA. **Ficha Técnica da Proteína Texturizada de Soja**, 2004.
- MARTINS, L. O.; SÁ-COOREIA, I. Temperatura profiles of gellan gum synthesis and activities of biosynthetic enzymes. **Biotechnology Applied Biochemistry**, 20, 385-395, 1993
- MAUGERI, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., v. 3, 2001
- MILLER, G. L. DNS. **Analytical Chemistry**, 31:3, 426-428, 1959
- MORADI-ARAGHI, A. A review of thermally stable gels for fluid division in petroleum production. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 26, 1-10, 2000

- MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23:2, 300-305, 2003
- MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação do biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***, Tese de Doutorado – Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, 2002
- MOTT, R. L. **Mecânica de Fluidos Aplicada**. México: Prentice-Hall Hispanoamericana S.A., 1996
- NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C. & PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, 38, 1513-1519, 2003
- NAVARRETE, R. C.; SEHEULT, J. M.; COFFEY, M. D. New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer fluids and coiled tubing applications. **Asia Pacific Drilling Technology, Kuala Lumpur, Malaysia SPE 62790**, 1-17, 2000
- NAVARRETE, R. C.; SEHEULT, J. M.; COFFEY, M. D. New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II. **International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982, Houston, TX**, 1-15, 2001
- NAVARRETE, R. C. & SHAH, S. N. New Biopolymer for coiled tubing applications. **Society of Petroleum Engineers 68487, Richardson, TX, USA**, 1-10, 2001
- NAVARINI, L.; GESARO, A.; ROSS-MURPHY, S. Exopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* YE-2 grown under different osmolarity conditions: viscoelastic properties. **Carbohydrate Research**, 223, 227-234, 1992
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C₇L. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, 21:1, 82-85, 2001

- PACE, G. W. Polímeros Microbianos. In: BU'LOCK, J. & KRISTIANSEN, B. **Biotecnología Básica**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1991
- PADILHA, F. F. **Síntese e caracterização de biopolímeros por *Beijerinckia sp* 7070**, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, 1997
- PADILHA, F. F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microorganismos**, Tese de Doutorado – Departamento de Ciência de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2003
- PARADOSSI, G.; CHIESSI, E.; BARBIROLI, A.; FESSAS, D. Xanthan and glucomannan mixtures: synergistic interactions and gelation. **Biomacromolecules**, 3, 498-504, 2002
- RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIISKUMAR, G. K. Free radical aspects of Xanthomonas campestris cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, 38, 1301-1310, 2003
- RINAUDO, M. Role of substituents on the properties of some polysaccharides. **Biomacromolecules**, 5, 1155-1165, 2004
- RHOLF, F. J. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. **Exeter Software**: New York, 1992
- ROBINSON, G.; MANNING, C. E. & MORRIS, E. R. Conformation and physical properties of the bacterial polysaccharides gellan, welan and rhamnan. In: ERIC DICKINSON (ed.) **Food, Polymers, Gels and Colloids**, 22-33, 1991
- ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, 33:8, 805-810, 1998
- RUITER, G. A.; SCHOLS, H. A.; VORAGEN, G. J. ROMBOUTS, F. M. Carbohydrate analysis of water-soluble uronic acid containing polysaccharides with high performance anion exchange chromatography using methanolysis combined

- with TFA hydrolysis is superior to four other methods. **Analytical Biochemistry**, 207, 176-185, 1992
- SÁ-CORREIA, I.; FIALHO, A. M.; VIDEIRA, P.; MOREIRA, L. M.; MARQUES, A. R. & ALBANO, H. Extracellular polysaccharides review – Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolisaccharide production engineering. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 29, 170-176, 2002
- SAKATA, N.; YANAI, S.; YOKOZEKI, K. & MARUYAMA, K. Study on new viscosity agent for combination use type of self-compacting concrete. **Journal of Advanced Concrete Technology**, 1:1, 37-41, 2003
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- SCAMPARINI, A. R. P.; DRUZIAN, J.I. ; MALDONADE, I.; MARIUZZO, D; New biopolymers produced by nitrogen fixing microorganisms for use in foods. In: **Hydrocolloids. Part1: Physical Chemistry and Industrial Application of Gels, Polysaccharides and Proteins**. Osaka: ed. K. Nishinari, Elsevier Science B.V., 169-178, 2000
- SGUAREZI, C. M.; CENI, G.; TREICHEL, H. Estudo de pré-tratamento ácido de água de maceração de milho para viabilização de uso na produção de bioprodutos. **IX Encontro Regional de Engenharia de Alimentos**. Erechim, RS, 2004.
- SILVA, P. H. F; PEREIRA, D. B. C.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G. **Físico-química do Leite e Derivados – Métodos Analíticos**. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica, 1997
- SILVEIRA, I. A.; OLIVEIRA, R. M.; CARVALHO, E. P.; CARVALHO, D.; PILON, L. Aspectos gerais, positivos e negativos da utilização de marcadores PCR-RAPD na identificação de microrganismos. **Boletim SBCTA**, 34:2, 77-83, 2000

- SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Sci. Bull.* , 38, 1409-1438, 1958
- SOY PROTEIN COUNCIL. Soy protein products – characteristics, nutritional aspects and utilization, 1987
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**, 2. ed., Butterworth Heinemann, 2000
- SUTHERLAND, I. A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, 29, 70-71, 2002
- SUTHERLAND, I. W. & TAIT, M. I. Biopolymers. **Encyclopedia of Microbiology**, v.1, 1992
- TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**, Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2004.
- WANG, F.; WANG, Y. J.; SUN, Z. Conformational role of xanthan in its interaction with locust bean gum. **Journal of Food Science**, 67:7, 2609-2614, 2002a
- WANG, F.; WANG, Y.-J.; SUN, Z. Conformational role of xanthan in its interaction with guar gum. **Journal of Food Science**, 67:9, 3289-3294, 2002b
- WEI, Y. & FANG, J. Studies on the chromatography behavior of some uronic acids and neutral sugars on an amino-bonded phase column. **Journal of Chromatography**, 513, 227-235, 1990
- WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Methods in Enzimology**, 218, 704-740, 1993

- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:22, 6531-6535, 1990
- WINSTON, *et al.* Diutan gum. **United States Patent** 6,620,775. September 16, 2003
- WOICIECHOWSKY, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca**, Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001
- YAP, L. & NELSON, R. J. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendograms. **International Rice Research Institute**. Manila, Philippines. Discussion Paper Series nº 14, 1996
- ZHOU, X. & JIAO, X. Investigation of *Listeria monocytogenes* contamination pattern in local Chinese food market and the tracing of two clinical isolates by RAPD analysis. **Food Microbiology**, 21, 695-702, 2004

APÊNDICE A – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MEIOS INDUSTRIAIS

Tabela A1– Informações retiradas das fichas técnicas dos produtos

parâmetros	Melaço de cana	Proteína texturizada de soja
Açúcar total invertido	5,600 %	-
Nitrogênio total	0,700 %	-
umidade	19,000 %	Máx. 8,000 %
proteína	-	Min. 50,000 %
gordura	-	Max. 2,000 %
carboidratos	-	Max. 37,500 %

Tabela A2- Caracterização dos meios industriais

Parâmetros/ meios	Melaço bruto 8%	Melaço pré-tratado 8%	Extrato aquoso de resíduo de PTS 6%
Açúcar redutor total	13,870 %	9,580 %	1,560 %
Nitrogênio total	0,047 %	0,036 %	0,126 %