

Ana Lúcia Coltro

*Produção e Determinação da Composição
dos Exopolissacarídeos Produzidos por
Bactérias Isoladas da Rizosfera*



[Faint handwritten text, possibly a signature or date]



ANA LÚCIA COLTRO

ANA LÚCIA COLTRO

**PRODUÇÃO E DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
DOS EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR
BACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biológicas, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto - SP, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração de Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Gomes Cruz

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria do Lourdes Corral
Quatão de Silva

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2013



ANA LÚCIA COLTRO

PRODUÇÃO E DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
DOS EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR
BACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA



Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto – SP, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de Concentração de Ciência e Tecnologia de Alimentos)

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Corradi
Custódio da Silva

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

2003



DADOS CURRICULARES

ANA LÚCIA COLTRO

PRODUÇÃO E DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DOS
EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DA RIZOSFERA

Banca Examinadora da dissertação para obtenção do grau de mestre

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

Profa. Dra. Aneli de Melo Barbosa

Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

Prof. Dr. Maurício Boscolo

Prof. Dr. Raul Jorge Hernán Castro Gómez



DADOS CURRICULARES

ANA LÚCIA COLTRO

NASCIMENTO	15/10/1964 – CAMPINAS-SP
FILIAÇÃO	Geraldo Coltro Ana Laurinda de Andrade Coltro
1982-1986	Curso de Graduação - Bacharelado e Licenciatura em Química - Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP-SP
2001-2003	Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, nível Mestrado, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto- SP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pelo "Dom da Vida".

Aos meus filhos Daniel e Rodrigo, que aprenderam a dividir o nosso tempo de convívio com a dedicação a esse trabalho.

Ao meu marido Rogério que sempre me apoiou e incentivou .

Ao professor Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz, pela oportunidade concedida, pela amizade e confiança depositada.

À professora Maria de Lourdes e a técnica Marilza que não mediram esforços para a realização das análises cromatográficas.

As empresas CP KELCO Brasil S. A., Usina Guarani S.A., Bann Química Ltda. e Frango Sertanejo Ltda. pela doação de insumos e informações fundamentais para a realização deste trabalho.

A FUNDUNESP (Fundação para o Desenvolvimento da UNESP) pelo auxílio financeiro para compra de reagentes e materiais utilizados nesta pesquisa.

Aos técnicos de laboratório Jesuíno, Ginaldo, João, Luís, Newton, João Rodrigues (química) e principalmente à Tânia pela ajuda, dedicação e compreensão.

Às colegas do grupo de pesquisa em Biopolímeros, Sílvia, Graziella e Luísa, que me antecederam e souberam dividir seus conhecimentos nessa linha de trabalho.

As "meninas da graduação" Ellen, Manuella, Natálias (loira e morena), Grazielle, Mariana, Érica, pelos bons momentos vividos no laboratório, com companheirismo e alegria.

Às minhas grandes amigas Márcia e Giani pelo apoio nos momentos de maior dificuldade.

Aos meninos Hamilton, Alan, Marcelo, Ulisses e Bruno pela ajuda e a todo o pessoal do departamento pelo convívio e compartilhamento de conhecimento intelectual e pessoal.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões que contribuíram para a correção do trabalho.

À todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho

Muito Obrigada



SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	v
Resumo	1
Abstract	4
1. Introdução	7
2. Objetivos	10
3. Revisão Bibliográfica	11
3.1 Polissacarídeos bacterianos	11
3.2 Síntese dos biopolímeros	17
3.3 Produção dos biopolímeros	19
3.4 Composição dos biopolímeros	26
3.5 Isolamento dos polissacarídeos do meio de cultura	30
3.6 Tratamentos prévios nos polissacarídeos	33
3.7 Hidrólise dos polissacarídeos	34
3.8 Análises dos polissacarídeos hidrolisados	37
3.9 Análises cromatográficas para determinação da composição dos polissacarídeos	38
4. Materiais e Métodos	44
4.1 Isolamento e seleção das bactérias produtoras	44

4.2 Produção dos polissacarídeos	46
4.3 Purificação dos polissacarídeos	51
4.4 Identificação dos polissacarídeos	54
5. Resultados e Discussão	60
5.1 Seleção das bactérias produtoras	60
5.2 Identificação das bactérias selecionadas	62
5.3 Produção dos polissacarídeos	63
5.4 Análise de acetila e piruvato nos polissacarídeos produzidos	68
5.5 Determinação do teor de cinzas	71
5.6 Tratamento prévio dos polissacarídeos por diálise	72
5.7 Determinação de proteínas nos polissacarídeos dialisados	78
5.8 Determinação de açúcares totais nas amostras de polissacarídeos dialisados	79
5.9 Hidrólise dos polissacarídeos com ácido trifluoroacético	80
5.10 Cromatografia líquida de alta eficiência dos monômeros de açúcares	82
6. Conclusões	91
7. Referências Bibliográficas	93



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da goma xantana	15
Figura 2. Estrutura da goma gelana	16
Figura 3. Fluxograma utilizado na produção dos biopolímeros	50
Figura 4. Etapas de purificação dos polissacarídeos bacterianos	53
Figura 5. Configuração do sistema cromatográfico utilizado para a análise dos monômeros dos açúcares dos polissacarídeos (HPAE-PAD)	59
Figura 6. Efeito do teor alcoólico no rendimento da recuperação dos polissacarídeos	67
Figura 7. Relação entre a condutividade e o tempo de diálise para a determinação do tempo ideal do processo usando tripa sintética I e polissacarídeo sintetizado pela bactéria 10D com fontes de carbono glicose ou sacarose	77
Figura 8. Equipamento utilizado para hidrólise ácida dos polissacarídeos a temperatura constante de 100°C	81
Figura 9. Equipamento utilizado para a remoção dos resíduos de TFA após a hidrólise dos polissacarídeos	81
Figura 10. Cromatogramas obtidos por HPAE-PAD usando coluna Carbo Pac 10 equipada com guarda coluna e velocidade de fluxo 1,2 mL/min. sendo os eluentes água deionizada e NaOH 200 mM. A: Cromatograma dos monossacarídeos utilizados como padrão L-fucose, L-ramnose, D-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose e D-glicose (mistura contendo 120 µg/mL de cada). B: Cromatograma da goma xantana grau alimentar hidrolisada nas mesmas condições das amostras de polissacarídeos	85

LISTA DE TABELAS

Figura 11. Cromatogramas obtidos por HPAE-PAD usando coluna Carbo Pac 10 equipada com guarda coluna e velocidade de fluxo 1,2 mL/min. sendo os eluentes água deionizada e NaOH 200 mM. A: Cromatograma dos monossacarídeos obtidos após hidrólise com TFA do polissacarídeo produzido com a bactéria 24A e fonte de carbono glicose. B: Cromatograma dos monossacarídeos obtidos após hidrólise com TFA do polissacarídeo produzido com a bactéria 24A e fonte de carbono sacarose 86

Figura 12. Cromatogramas obtidos por HPAE-PAD usando coluna Carbo Pac 10 equipada com guarda coluna e velocidade de fluxo 1,2 mL/min. sendo os eluentes água deionizada e NaOH 200 mM. A: Cromatograma dos monossacarídeos obtidos após hidrólise com TFA do polissacarídeo produzido com a bactéria 10D e fonte de carbono glicose. B: Cromatograma dos monossacarídeos obtidos após hidrólise com TFA do polissacarídeo produzido com a bactéria 10D e fonte de carbono sacarose 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes químicos normalmente presentes em polissacarídeos de origem bacteriana	29
Tabela 2. Viscosidade do caldo de fermentação para a seleção das bactérias produtoras durante o período de incubação de 48, 72 e 96 h a 200 rpm e 30°C	61
Tabela 3. Produção de polissacarídeos e determinação do peso celular seco das bactérias, após 96 horas de incubação a 200 rpm e 30°C	61
Tabela 4. Produção de polissacarídeos usando as bactérias 10D e 24A e as fontes de carbono glicose e/ou sacarose, variando a escala de produção após 96 h. de incubação a 200 rpm e 30°C	65
Tabela 5. Teor de acetila e piruvato em polissacarídeos bacterianos usando glicose e/ou sacarose como fonte de carbono na concentração de 2% após incubação por 96 horas a 30°C e 200 rpm	70
Tabela 6. Teor de cinzas dos polissacarídeos brutos determinados em 1 g de amostra a 550°C por 4 horas	72
Tabela 7. Resultados e características das membranas utilizadas para diálise de uma solução padrão de goma xantana adicionada de fosfato monoácido de potássio na proporção 3:7 à temperatura de 20°C	74
Tabela 8. Teor de proteína nos polissacarídeos dialisados em membrana alternativa por 72 horas contra água corrente	78
Tabela 9. Teor de açúcares totais nos polissacarídeos purificados por diálise durante 72 horas contra água corrente	79
Tabela 10. Composição glicosídica e proporção entre os monômeros de açúcares dos polissacarídeos bacterianos hidrolisados com TFA 5 M em temperatura de 100°C por 16 horas	89

Resumo

Os polissacarídeos de origem microbiana, também chamados de biopolímeros ou gomas, têm sido amplamente estudados nos últimos anos, em vista de suas vantagens em relação aos hidrocolóides derivados de algas e plantas. Entretanto, a tecnologia de produção dessas gomas é de domínio exclusivo de poucas empresas multinacionais.

Outra preocupação existente é com a determinação da composição química do polissacarídeo, através da qual é possível definir qual é o seu campo de aplicação, quais as suas possíveis funções em determinados produtos e relacioná-las com substâncias de comportamento reológico já conhecidas.

Neste trabalho foram utilizados dois isolados bacterianos produtores de polissacarídeos, procedentes da rizosfera, pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Pseudomonas*, as quais foram denominadas 24A e 10D, respectivamente.

Para a produção dos polissacarídeos foi utilizado um meio de fermentação contendo 2% das fontes de carbono glicose e/ou sacarose, uma fonte de nitrogênio 2,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sais minerais: KH_2PO_4 (5,0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g), Ácido cítrico (2,0 g), H_3BO_3 (0,006 g), ZnO (0,006 g), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0024 g), CaCO_3 (0,002 g) e HCl (0,15 g). Este meio foi



inoculado com cada bactéria previamente crescida em PCA (Plate Count Agar) por 24 horas e incubado em agitador rotatório por 96 horas a 200 rpm e 30°C. Em seguida, foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e dialisado contra água corrente por 72 horas. O polissacarídeo foi recuperado por precipitação com etanol anidro (3:1 v/v) e seco em estufa a vácuo a 50°C até peso constante.

Foi realizada a caracterização dos grupamentos acetila e piruvato na amostra bruta, por técnicas volumétricas e espectrofotométricas com metodologias previamente adaptadas para as condições de trabalho.

O teor de matéria mineral presente nas amostras dos polissacarídeos bruto foi elevado, portanto, tendo em consideração o aspecto econômico, foram feitos diversos testes para a eliminação destes sais minerais por diálise usando materiais alternativos. Foi realizado o acompanhamento do processo de diálise por medição da condutividade iônica da solução de polissacarídeo.

Para a determinação dos monossacarídeos componentes da cadeia glicosídica foi utilizada a técnica de cromatografia líquida com detecção de pulsos amperométricos (HPAE-PAD), sendo necessário realizar primeiro uma hidrólise do polissacarídeo com ácido trifluoroacético (TFA) por 16 horas a 100°C para quebrar as ligações glicosídicas.

No polissacarídeo sintetizado pela bactéria 24A foram identificados os açúcares: glicose, manose e galactose, mesmo quando a bactéria utilizou

glicose ou sacarose como fonte de carbono. O teor de acetila foi 2,2% quando a fonte de carbono foi glicose e 1,2% para sacarose. O grupamento piruvato não foi detectado nas amostras analisadas.

Para o polissacarídeo produzido pela bactéria 10D, a composição glicosídica encontrada também foi glicose, manose e galactose para as duas fontes de carbono avaliadas. O teor de acetila determinado foi 1,3% para o polissacarídeo sintetizado com glicose e 0,6% com sacarose e não foi detectada a presença do grupamento piruvato.

A comparação dos resultados obtidos com a literatura para o polissacarídeo produzido pela bactéria 24A apresentou resultados semelhantes aos polissacarídeos sintetizados por bactérias do gênero *Rhizobium*.



Abstract

The polysaccharides of microbial origin, also called biopolymers or gums, have been generously studied in the last years, due to their advantages in relation to the hydrocolloids derived from algae and plants. However, the technology of production of these gums has exclusive domain of few multinational corporations.

Another concern is the determination of the chemical composition of the polysaccharide, through which it is possible to define which is its field of application, as well as their possible functions in certain products, and to relate them to substances of known rheological behavior.

In this study, two polysaccharide producing bacterial strains, belonging to the genus *Rhizobium* and *Pseudomonas*, isolated from the rhizosphere, were selected and named 24A and 10D respectively.

For the production of the polysaccharides, a fermentation medium was used containing 2% of carbon sources (glucose and/or sucrose), a nitrogen source 2.0 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and mineral salts: KH_2PO_4 (5.0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g), citric acid (2.0 g), H_3BO_3 (0.006 g), ZnO (0.006 g), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.0024 g), CaCO_3 (0.002 g) and HCl (0.15 g). The medium was inoculated with each bacterium, previously grown in PCA (Plate Count Agar) for 24 hours, and incubated in a shaker for 96 hours under 200 rpm and 30°C. Soon

afterwards, it was centrifuged under 6000 rpm for 10 minutes and dialyzed against water for 72 hours. The polysaccharide was recovered by precipitation with anhydrous ethanol (3:1 v/v) and dried in a vacuum oven at 50°C until constant weight.

The characterization of the acetyl and pyruvate groups was accomplished in the crude sample, by means of volumetric and spectrophotometric techniques with methodologies adapted previously to the work conditions.

The percentage of mineral matter present in the samples of the crude polysaccharides was high; therefore, taking into consideration the economical aspect, several tests for the elimination of these mineral salts were conducted, by dialysis using alternative materials. Simultaneously to the dialysis process, the measurement of the ionic conductivity was carried out for the polysaccharide solution.

For the determination of the monosaccharides of the glycosidic chain, the liquid chromatography technique was carried out, with amperometric pulse detection (HPAE-PAD). In order to accomplish this it was necessary to conduct, first, the hydrolysis of the polysaccharide with trifluoroacetic acid (TFA) for 16 hours at 100°C in order to break the glycosidic bonds.

For the polysaccharide synthesized by the bacterium 24A the following carbohydrates have been identified: glucose, mannose and galactose, even when the bacterium used glucose or sucrose as source of carbon. The acetyl



percentage was 2.2% when the source of carbon was glucose and 1.2% for sucrose. The piruvate group was not detected in the analyzed samples.

For the polysaccharide produced by the bacterium 10D, the glycosidic composition found was also glucose, manose and galactose for the two sources of carbon evaluated. The acetyl percentage ranged from 1.3%, for the polysaccharide synthesized from glucose, to 0.6% for the one synthesized from sucrose and the presence of the piruvate group was not detected.

The comparison of the results obtained with the literature for the polysaccharide produced by the bacterium 24A presented results which are similar to the polysaccharide synthesized by the *Rhizobium* bacterium.



1. Introdução

Os polissacarídeos de origem microbiana, geralmente são produtos capazes de formar soluções viscosas e alguns também formam géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações. Uma vez que, não existe outra categoria de substâncias que exiba esse comportamento, os biopolímeros têm sido objeto de intensa pesquisa, tendo em vista o seu alto potencial de aplicação em diferentes setores.

Na indústria de alimentos, os biopolímeros encontram um vasto campo de aplicação como agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes e emulsificantes, e vêm substituindo progressivamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais, como plantas e animais, com a vantagem de apresentarem as propriedades físico-químicas reprodutíveis, além do baixo custo e de suprimento estável.

O termo polissacarídeos, gomas ou hidrocolóides, refere-se a uma ampla variedade de compostos no qual podem ser incluídos os de origem vegetal, marinha ou microbiana. Os polissacarídeos de origem vegetal são obtidos de exsudatos de árvores (gomas arábica e karaya), de sementes (gomas guar e locusta) e de frutas cítricas (pectina), enquanto os de origem marinha são retirados de algas (alginato, ágar, carragena). Entre os de origem microbiana, também chamados biopolímeros, encontram-se a



dextrana, xantana, curdlana e gelana cuja utilização está em considerável aumento pelos mais diversos tipos de indústrias.

A obtenção destes polímeros para uso industrial e para consumo humano é uma tarefa mais complexa do que para a utilização em outros produtos, uma vez que, estes devem ser considerados seguros do ponto de vista alimentar e, portanto, satisfazer os severos códigos da legislação em vigor. Uma amostra disso é que, apesar da pesquisa em biopolímeros ter iniciado há mais de três décadas, até agora apenas dois biopolímeros foram aprovados para uso alimentar nos Estados Unidos da América (EUA): xantana e gelana. Portanto, selecionar variedades de microrganismos que produzam polissacarídeos em grande quantidade e economicamente interessantes, e ainda determinar a composição química destes, é um desafio que vem sendo enfrentado por vários grupos de pesquisa em indústrias, principalmente nos países desenvolvidos como Japão, EUA, Canadá e França. Embora essa área de pesquisa tenha avançado muito nos últimos tempos, é fato reconhecido que apenas poucos microrganismos foram estudados completamente dentre a vasta gama de espécies produtoras de biopolímeros, sendo os fungos e bactérias são os mais promissores.

A complexidade dos fatores que interferem na seleção de microrganismos capazes de produzir polissacarídeos é a constatação de que, dos muitos microrganismos que crescem em meio sólido produzindo



colônias gomosas, somente uma fração destes produzem polissacarídeos extracelulares em meios líquidos, e destes, poucos convertem o substrato utilizado para o cultivo em quantidades economicamente interessantes. Ademais, é preciso levar em consideração se o biopolímero é hidrossolúvel e apresenta propriedades funcionais de interesse comercial.

Um aspecto de extrema importância em relação aos biopolímeros produzidos por microrganismos é a necessidade de um rígido controle das condições de fermentação, uma vez que, diferentes parâmetros de produção levam à obtenção de produtos com características distintas. Assim, é fundamental que qualquer estudo dirigido ao desenvolvimento de tecnologias para a fabricação de biopolímeros seja acompanhado pela caracterização do material produzido, e a posterior determinação da estrutura química. Esta última é uma etapa muito complexa que utiliza diversas técnicas analíticas, sendo uma delas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência das amostras hidrolisadas com ácido, que permite determinar as unidades monoméricas constituintes do polissacarídeo.



2. Objetivos

2.1 Produção de polissacarídeos

- Aumentar a escala de produção de 50 mL para 250 mL de meio de cultura
- Testar o efeito da adição de glicose
- Testar o efeito da adição de sacarose

2.2 Caracterização dos polissacarídeos

- Determinar a composição química em função dos grupamentos acetila e piruvato e monômeros dos açúcares constituintes
- Estabelecer a proporção e composição dos monômeros dos açúcares constituintes.
- Comparar os resultados obtidos com os relatados na literatura para caracterizar os polissacarídeos



3. Revisão Bibliográfica

3.1 Polissacarídeos bacterianos

Na indústria de alimentos, os biopolímeros microbianos encontram um vasto campo de aplicação como agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes e emulsificantes. Estes polissacarídeos vem substituindo progressivamente aos obtidos de fontes convencionais como plantas e animais. Essa tendência deve-se, em parte, às incertezas no suprimento do mercado mundial de polissacarídeos de fontes naturais, os quais são vulneráveis aos fenômenos que ocorrem na natureza e a instabilidade política das regiões produtoras, provocando escassez e alta de preços. (SUTHERLAND, 1999).

Portanto, a preferência por biopolímeros microbianos deve-se principalmente à homogeneidade de suas propriedades e características funcionais, somadas às vantagens de uma produção independente das condições climáticas, sob condições controladas e em lotes homogêneos com qualidade assegurada. A razão disso é a especificidade da biossíntese dos microrganismos, os quais permitem adicionalmente modificações genéticas, visando obter polissacarídeos com propriedades características específicas (SUTHERLAND, 1999).



A potencialidade do uso de biopolímeros microbianos na moderna indústria de alimentos é um consenso na literatura existente. Diversos autores, entre eles Sutherland (1999); Stredansky et al. (1999); Vandame et al. (1996), concordam que, devido, às suas propriedades funcionais versáteis, os biopolímeros podem se tornar uma ferramenta poderosa para se criar novas texturas e conseqüentemente, gerar produtos novos e diferenciados. Além de substituírem e imitarem a textura dos polissacarídeos clássicos, em baixas concentrações, estão sendo alvo de um grande avanço nas pesquisas sobre sinergismo, onde polissacarídeos convencionais são associados a biopolímeros visando intensificar as propriedades funcionais (NISHINARI ; DOI, 1993).

Apesar da ampla possibilidade do uso de biopolímeros em alimentos, os mercados de consumo mais importantes para estes polissacarídeos são as indústrias de petróleo, de mineração, têxtil, termoquímica, tintas de impressão, papel, cosmética, farmacêutica e produtos agropecuários, onde além de serem utilizados como formadores de gel, espessantes e agentes de suspensão, são usados também, por suas propriedades floculantes, adesivas, formadoras de filmes, lubrificantes e redutoras de fricção. Observa-se nesses setores uma contínua substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana (SANDFORD; COTTRELL; PETTITT, 1984).



Entre os polímeros de origem bacteriana, a goma xantana tem sido a mais estudada, uma vez que seu uso em alimentos foi permitido pelo Food and Drug Administration (FDA) desde julho de 1969. A goma xantana comercial é produzida pela linhagem de *Xanthomonas campestris* utilizando xarope de glicose como fonte de carbono, derivados de amônia como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento sob condições aeróbias a 28°C e agitação constante. Após fermentação, a goma é recuperada por precipitação com etanol, seca e moída (COTTRELL; KANG; KOVACS, 1980).

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

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



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

A goma xantana é também usada como agente estabilizante em diversos produtos cosméticos e farmacêuticos, por não apresentar efeitos tóxicos, não induzir a reações alérgicas e, ainda, por sua compatibilidade com sais minerais e sua estrutura química está apresentada na Figura 1 (COTTRELL, 1979).

A aplicação em produtos alimentícios é muito vasta, devido às propriedades e características específicas, tais como: produzir alta viscosidade, mesmo quando usada em baixas concentrações; ser estável em relação ao calor, resistindo a altas temperaturas durante o processamento; ter excelente solubilidade e estabilidade em meio ácido; ser estável na presença de sais, principalmente cloreto de sódio; ser eficiente como estabilizador de emulsões, evitando a separação de gordura nos sistemas água/óleo; ser de natureza altamente pseudoplástica, diminuindo o arraste durante o escoamento e nos embutidos de carne reter a umidade e evitar a exsudação da gordura, também chamado de "encapsulamento branco" (WIRTH, 1985).

Outro polissacarídeo importante é a goma gelana, um biopolímero que passou a ser comercializado pela Kelco Co. (EUA) e vem sendo apontado como um dos mais eficientes e multifuncionais hidrocolóides desenvolvidos até o momento. Foi o segundo polissacarídeo de origem microbiana a ser



aprovado para uso em alimentos pelo FDA em 1992. Sua descoberta deu-se em 1977, quando a bactéria produtora *Pseudomonas elodea* foi identificada pela primeira vez durante uma pesquisa sobre microrganismos sintetizadores de gomas isolados do ambiente.

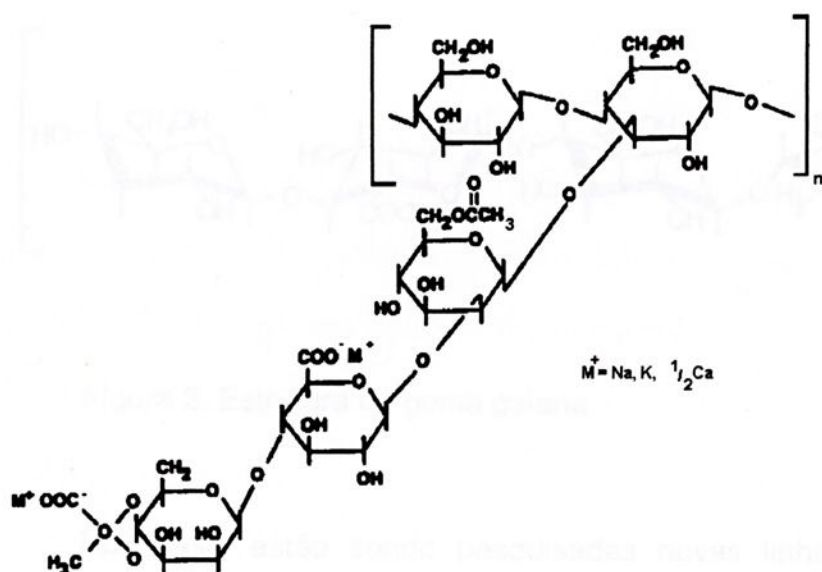


Figura 1. Estrutura da goma xantana.

A gelana pode ser usada como agente gelificante, texturizante, estabilizante e formador de filmes de revestimento, podendo substituir outros hidrocolóides ou ser utilizada em combinação com os mesmos. Suas principais aplicações incluem produtos de panificação e confeitaria, na forma de recheios ou coberturas, produtos lácteos, emulsões, sorvetes, geléias, sobremesas e rações para animais domésticos. A ótima consistência e grande transparência dos géis formados possibilitam a substituição do ágar

em meios de cultura (PSZCZOLA, 1993). A estrutura da molécula da gelana está apresentada na Figura 2.

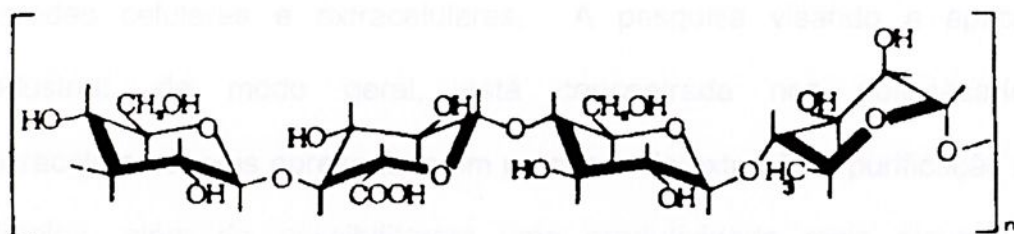


Figura 2. Estrutura da goma gelana.

No Brasil, estão sendo pesquisadas novas linhagens bacterianas capazes de produzir biopolímeros extracelulares com potencial de aplicação industrial. Estas pesquisas envolvem desde estudos relacionados com o isolamento e a caracterização de novas bactérias produtoras extraídas do meio ambiente até o processo de fermentação, comportamento reológico e determinação da estrutura química dos polissacarídeos produzidos por estes processos fermentativos (BUENO, 2001; QUEIROZ, 2001; BUENO e GARCIA-CRUZ, 2001; SCAMPARINI, 1997; MALDONADE, 1996; VENDRUSCOLO, 1995).

3.2 Síntese dos biopolímeros

Os biopolímeros sintetizados por bactérias são divididos segundo sua localização morfológica em três grupos: intracelulares, integrantes das paredes celulares e extracelulares. A pesquisa visando a aplicação industrial, de modo geral, está concentrada nos polissacarídeos extracelulares, pois apresentam um processo de extração e purificação mais simples, além de possibilitarem uma produtividade mais elevada. As bactérias Gram-negativas também têm sido classificadas como as de melhor aptidão para o processo, obviamente que para biopolímeros de uso alimentar, a bactéria deve ser não-patogênica. Felizmente, existem muitos microrganismos não-patogênicos ao homem, que produzem polissacarídeos extracelulares (SANDFORD, 1979).

Os biopolímeros extracelulares estão localizados fora da parede celular, sendo que alguns são encontrados ligados às células, como uma verdadeira cápsula. No entanto, outros são excretados no meio de crescimento. Provavelmente, os polissacarídeos extracelulares têm a função natural de proteger o microrganismo contra vários fatores adversos do meio ambiente. Além de que, a presença da cápsula, serviria como protetor contra ataques de fagócitos (WILKINSON, 1958).



Em geral, os polissacarídeos não têm função de reserva de fonte de energia. A bactéria normalmente não é capaz de catabolizar os próprios polissacarídeos extracelulares (WILKINSON, 1958).

Além da localização morfológica, os polissacarídeos extracelulares podem ser classificados em homo e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos, como por exemplo, a dextrana e levana, são geralmente produzidos por uma só enzima ou por um sistema simples de enzimas. Devido a essa simplicidade do sistema, são facilmente adaptáveis em produções livres de células, ou seja, por síntese enzimática. Em contraste, os heteropolissacarídeos são formados a partir de qualquer fonte de carbono utilizável, embora a eficiência varie consideravelmente, porque o sistema de enzimas é complexo. Para esse tipo de sistema, a síntese por enzimas ainda não está elucidada (WILKINSON, 1958; SANDFORD, 1982).

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

3.3 Produção dos biopolímeros

O efeito das condições ambientais sobre a produção de polissacarídeos extracelulares tem sido estudado para culturas em crescimento e com suspensão de células lavadas. Também têm sido pesquisadas as limitações das fontes de nitrogênio, fosfato ou enxofre em presença de excesso de carboidrato e foi observado que podem conduzir a um aumento na síntese de polissacarídeo, embora a quantidade seja também afetada pelo teor de oxigênio, pH e temperatura, sendo que cada linhagem difere em sua resposta ao efeito das mudanças ambientais e à utilização da fonte de carbono. As condições ideais para o crescimento e a produção de polissacarídeo em culturas descontínuas também são afetadas pela proporção entre o volume de ar e o volume de meio, presença ou ausência de agitação e tamanho do inóculo, além dos nutrientes (FARIA, 2002; FARIA; GARCIA-CRUZ, 2001; BUENO, 2001; QUEIROZ, 2001; SUTHERLAND, 1983).

Como regra geral, deve-se fornecer os nutrientes necessários para o crescimento e produção de biopolímero, e para isto, o meio deve conter algum tipo de carboidrato, sais de amônio ou aminoácidos e vários sais inorgânicos que servem como fonte de íons e que atuam também como cofatores enzimáticos na síntese do polissacarídeo. Os nutrientes



inorgânicos comumente necessários para o crescimento podem ser divididos em macronutrientes, tais como: fósforo (KH_2PO_4); potássio (KCl); magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou MgSO_4); cálcio (CaCl_2); sódio (NaCl ou $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) que podem ser utilizados entre 0,001 a 4,0 gramas por 100 mL e micronutrientes, tais como ferro: ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$); manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); zinco (ZnO ou $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); molibdênio ($\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); iodo (KI) e cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cujo intervalo de utilização está entre 0,5 a 13,0 mg por 100 mL (REED, 1983).

3.3.1 Fatores que influenciam a produção dos biopolímeros

3.3.1.1 Fontes de carbono

Os microrganismos estudados, produtores de exopolissacarídeos (EPS), utilizam monômeros de carboidratos como fonte de carbono e energia, sais de amônio ou aminoácidos como fontes de nitrogênio e carbono, além de sais inorgânicos para fornecer os íons, que podem servir como cofatores e alguns microrganismos necessitam ainda vitaminas e antibióticos (SANDFORD; COTTRELL; PETTITT, 1984; SUTHERLAND, 1983).



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

Sutherland (1982), em uma extensa revisão, com mais de 150 trabalhos, mostrou a influência da composição do meio de cultura, especialmente quanto à fonte de carbono, nitrogênio e íons na produção de EPS. A composição do biopolímero independe da natureza ou do tipo de carboidrato utilizado como fonte de carbono (SUTHERLAND, 1983; MANRESA; ESPUNY; GIUNEA, 1987). No entanto, a composição global do meio e a concentração de cada um de seus constituintes podem influenciar o rendimento da produção do exopolissacarídeo (EPS). A maioria dos meios de produção são baseados na alta relação entre carbono e nitrogênio, a qual favorece a produção. Segundo Sutherland, (1983), foi observado que, em culturas contínuas, o polissacarídeo difere nas propriedades reológicas e no grau de acilação, conforme o nutriente limitante utilizado.



García-Ochoa et al. (2000), em estudos utilizando meio sintético na produção de xantana, concluíram que baixos teores de nitrogênio (0,1%) e ar (0,25 L/min) favorecem a formação de xantana com baixo teor de piruvato, enquanto que o aumento de nitrogênio (1,5%) e fluxo de ar (1,5 L/min), juntamente com a adição de K_2HPO_4 , favoreceu a formação da xantana com alto teor de piruvato.

As fontes mais utilizadas na produção de biopolímero são a glicose e a sacarose, por exemplo, na produção de goma xantana foram utilizadas concentrações de 2 a 7% (JEANES et al., 1976; SOUW ; DEMAIN, 1979) e na produção de biopolímeros por *Pseudomonas* foram usadas de 1 a 5% (KANEKO ; KANG, 1977; CHRISTENSEN; KJOSBAKKEN; SMIDSRØD, 1995).

3.3.1.2 Influência do pH

Para a maioria das bactérias, o pH ótimo de crescimento localiza-se entre 6,5 e 7,5. Quando as bactérias são cultivadas num meio originalmente ajustado a um pH determinado (7 por exemplo) é provável que este se altere, como resultado das substâncias excretadas pelo microrganismo, que tanto podem ser ácidas quanto básicas. O desvio do pH pode ser tão grande que venha a limitar o crescimento do microrganismo. Para evitar essas mudanças bruscas de pH deve-se fazer uso de soluções tampão que são incorporadas



ao meio de cultura. A combinação de KH_2PO_4 e K_2HPO_4 é largamente empregada como solução tampão, nos meios bacteriológicos (PELCZAR; REID; CHAIN, 1996).

Kang, Veeder e Cottrell (1983) estudaram a produção do biopolímero produzido por *Pseudomonas elodea* em meio quimicamente definido e pH ajustado em 6,5; o ajuste foi feito usando KOH 4,45 M ou NaOH 6,25 M.

Estudos da produção de goma xantana realizados por Souw ; Demain (1979) concluíram que o meio e as condições utilizadas dependem do pH e da taxa de diluição, sendo a melhor faixa entre 7,1 e 7,5. Estes mesmos autores estudaram o efeito da concentração do citrato na produção de xantana por *Xanthomonas campestris* e concluíram que o mesmo, nas concentrações de 4,7 a 9,4 mM, estimulou a produção; porém, essa melhora só foi observada quando o pH não foi controlado, uma vez que o controle de elimina esse efeito benéfico (SOUW ; DEMAINE, 1980).

Castro (1993) considera que o crescimento total do microrganismo depende da natureza dos fatores limitantes e que o pH é um dos fatores mais comuns, juntamente com a exaustão dos nutrientes e do acúmulo de produtos tóxicos. O pH dentro de certos limites (6,5 a 8,0) tem pouca influência na taxa de crescimento, mas pode influenciar no número total de bactérias. No entanto, valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5) podem levar o microrganismo rapidamente à morte.



3.3.1.3 Influência da temperatura

A temperatura ótima de crescimento pode não ser a temperatura ótima para outras atividades celulares, como por exemplo, a produção de biopolímeros. O limite térmico para as bactérias mesófilas é de 15 a 45°C (PELCZAR; REID; CHAIN, 1996). Com relação ao tempo de geração, os mesmos autores afirmam que variações de temperatura podem também influenciar os processos metabólicos e a morfologia celular. Castro (1993) também afirma que este mesmo é altamente influenciado pela temperatura de incubação, podendo duplicar na faixa ótima, para uma diferença de 10°C e quintuplicar para 10°C acima ou abaixo da faixa ótima de temperatura.

Um aspecto importante a ser considerado no estudo das fermentações reside no fato de que a concentração das enzimas não se mantém constante com o tempo. Em alguns casos, uma decomposição relativamente rápida desses catalisadores pode ocorrer devido a condições ambientais pouco favoráveis, particularmente a temperatura. O agente responsável em um processo fermentativo é a célula viva, que assimila diversos materiais, se reproduz e elabora outras substâncias, alterando profundamente o meio em que vive. Para cada bactéria, há uma temperatura ótima de crescimento que pode variar da temperatura ótima de produção, mesmo quando a bactéria se

encontra em um meio adequado de nutrientes (CONGREGADO et al., 1985; MANRESA; ESPUNY; GIUNEA, 1987).

3.3.1.4 Influência da aeração

A agitação adequada satisfaz uma necessidade básica das fermentações, que é a homogeneidade do cultivo, impedindo a ocorrência de diferentes concentrações de nutrientes, pH e temperatura, além de dispersar as bolhas de ar na massa líquida, permitindo, assim, que o ar chegue ao microrganismo (PELCZAR; REID; CHAIN, 1996).

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

Agitação e aeração são fatores importantes a serem considerados nas fermentações que utilizam microrganismos aeróbicos, principalmente em processos contínuos; mas observa-se que em produções descontínuas, a agitação e o volume de ar também são importantes, pois os processos de reprodução de microrganismos ocorrem em presença de oxigênio, e em

determinadas fermentações a necessidade de oxigênio não é só para produzir células, mas também para aumentar o rendimento dos produtos destas fermentações (BRUNELLO ; CONCONE, 1986). Por exemplo, em 1983, Kang; Veeder e Cottrell (1983), visando produzir gelatina em fermentadores com capacidade de 30 litros, utilizaram uma agitação de 400 a 800 rpm/min. e uma taxa de aeração de 2 (meio/ar, v/v/m). A eficiência da conversão em relação à fonte de carbono inicial, para uma fermentação de 50 horas, foi 50%.

3.4 Composição dos biopolímeros

A composição dos biopolímeros está limitada a um número pequeno de monossacarídeos e outros componentes que não carboidratos, principalmente, os grupamentos acetila e piruvato que são responsáveis pela viscosidade das soluções aquosas destes polímeros. Porém, tais soluções apresentam diversidade nas propriedades físicas. Alguns desses polissacarídeos produzem soluções altamente viscosas e outros podem formar géis semelhantes ao ágar pela adição de sais.

Congregado et al. (1985) testaram diferentes fontes de carbono para a obtenção do polissacarídeo por *Pseudomonas sp* EPS-5028 e concluíram



que a composição do polímero não foi afetada pela natureza da fonte de carbono.

As bactérias *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* produzem, através da fermentação da glicose ou outra fonte de carbono, a xantana, que é um polissacarídeo aniônico de alto peso molecular (COTTRELL; KANG; KOVACS, 1980). Quimicamente este polissacarídeo é constituído por D-glicose, D-manose, ácido D-glicurônico, grupamento acetila e grupamento piruvato nos teores 2,80:3,00:2,00:1,70:0,51-0,63 respectivamente (JEANES et al., 1976).

A gelana é também um polissacarídeo de alto peso molecular, sintetizado por *Pseudomonas elodea* ATCC 31461 em fermentação controlada, com glicose ou sacarose como fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e um número variado de sais inorgânicos (KANG et al., 1982). Os monossacarídeos constituintes da unidade formadora da gelana são: glicose, ácido glicurônico e ramnose na proporção 2:1:1 respectivamente (SANDERSON, 1990).

Christensen; Kjosbakken e Smidsrod (1985) pesquisaram o polissacarídeo extracelular produzido pela *Pseudomonas marinha* NCMB 2021, detectando a produção de dois tipos de polissacarídeos, o primeiro produzido apenas na fase exponencial de crescimento, constituído por glicose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico nas seguintes proporções molares 1,00: 0,81:0,42:0,32. De acordo com os autores, este



polímero produziu soluções de alta viscosidade e formou gel a altas concentrações com adição de cátions multivalentes. O segundo foi produzido no fim da fase exponencial e na fase estacionária, sendo composto por N-acetilglucosamina, ácido 2-ceto3-desoxioctulosônico, 6-desoxihexose e também grupos acetil. Este polímero formou soluções com baixa viscosidade.

O polissacarídeo extracelular, produzido por cepas de *Lactobacillus bulgaris*, que crescem em leite desnatado, apresentou a seguinte composição: galactose, glicose e ramnose na proporção molar de 4: 1: 1, sendo que o peso molecular é de aproximadamente 500.000 Daltons (CERNING; DESMAZEAUD; BOUILLANNE, 1986).

A levana é um polissacarídeo produzido em meio contendo sacarose pela bactéria *Bacillus polymyxa* e está constituído inteiramente de frutose e resíduos de frutofuranosídeos ligados em β (2-6).

A Tabela 1 apresenta os componentes químicos mais comumente encontrados nos biopolímeros produzidos por bactérias (VENDRUSCOLO, 1995).



Tabela 1. Componentes químicos normalmente presentes em polissacarídeos de origem bacteriana.

Heteropolissacarídeo	Constituintes	Referência
Xantana (<i>Xanthomonas campestris</i>)	Glicose, manose, ácido glicurônico, ácido pirúvico, grupos acetila	SANDFORD et al., 1977
Gelana (<i>Pseudomonas elodea</i>)	Glicose, ramnose, ácido urônico, grupos acetila	KANG; VEEDER; COTTRELL, 1983
GPS- 910 (<i>Pseudomonas sp</i>)	Glicose, galactose, ácido glicurônico, grupos acetila	MANRESA; ESPUNY; GIUNEA, 1987
Zanflo (<i>Erwinia tahitica</i>)	Glicose, galactose, frutose, ácido glicurônico, grupos acetila	SANDFORD, 1982
<i>Beijerinckia indica</i>	Glicose, manose, galactose, ácido glicurônico, ácido galacturônico	LOPEZ ; BACKING, 1968
<i>Beijerinckia indica</i> (<i>Azotobacter indicus</i>) PS-7	Glicose, ramnose, ácido glicurônico, grupos acetila	KANG ; McNEELY, 1977
EPS- 5028 (<i>Pseudomonas sp</i>)	Glicose, galactose, ácido glicurônico, ácido galacturônico	MARQUES et al., 1986
NCMB-2021 (<i>Pseudomonas sp</i>)	Glicose, galactose, frutose, ácido glicurônico	CHRISTENSEN; KJOSBAKKEN; SMIDSROD, 1985

3.5 Isolamento dos polissacarídeos do meio de cultura

A solução aquosa de um polissacarídeo pode ser considerada como um colóide hidrofílico e a precipitação deste pode ser realizada pela diminuição da solubilidade do biopolímero dissolvido usando diferentes métodos como a adição de sais, solventes miscíveis em água e concentração por evaporação. Entre as opções de recuperação que têm sido estudadas, está a precipitação com solventes orgânicos de baixo peso molecular como o etanol (GONZALES et al., 1989) e álcool isopropílico (IPA) (GALINDO; ALBITER, 1996); o uso de misturas de sais e álcool (GARCÍA-OCHOA; CASAS; MOHEOLANO, 1993) e precipitação com sais tri e tetra valentes (KENNEDY; BRADSHAW, 1984). Também o uso de ultrafiltração tem sido mencionado (LO; YANG; MIN, 1997). A técnica mais comum para o isolamento primário e purificação dos polissacarídeos é a precipitação usando solventes solúveis em água como os álcoois (SMITH; PACE, 1982). Tanto o custo do álcool para a recuperação como as inevitáveis perdas do processo, contribuem significativamente no valor total da produção. Portanto o conhecimento do controle do mecanismo de separação de fases é importante para se criar alternativas para a precipitação e minimização das quantidades de álcool usadas.



Os álcoois de baixo peso molecular (metanol, etanol e isopropanol) e acetona, que são não-solventes para o polissacarídeo e podem ser adicionados no caldo de fermentação não somente para a diminuição da solubilidade até que a separação das fases ocorra, mas também para lavar as impurezas como por exemplo, substâncias coloridas, sais e células (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

As fases críticas do processo de recuperação de um polissacarídeo em relação ao custo são a remoção das células e a precipitação do polissacarídeo. O consumo de energia nestas etapas pode ser muito grande, uma vez que a recuperação do álcool usado na precipitação deve ser por destilação, e necessita também um equipamento de alto custo (GONZALES et al., 1989).

Em geral, os polissacarídeos são separados das células das bactérias por centrifugação e/ou microfiltração. A secagem do EPS separado, após diálise com água para remoção do açúcar residual e do solvente orgânico, normalmente deve ser realizada à temperatura ambiente para não ocorrer degradação, ou através da liofilização do polímero. Somme (1974), removeu as células por centrifugação, precipitou o EPS adicionando etanol ao sobrenadante viscoso, seguido de centrifugação e lavagem do precipitado com etanol, diálise e secagem. Robertsen et al. (1981) filtraram o sobrenadante através de Celite 545 e através de filtro "Millipore" 0,8 μm . A

filtração foi necessária para remover resíduos de bactérias que passaram para a solução viscosa do polissacarídeo. O filtrado foi concentrado por evaporação sob pressão reduzida, dialisado e centrifugado.

Cadmus; Burton e Slodki, (1982) centrifugaram o caldo de fermentação por 30 minutos a 20.000 rpm, para remover as células. O polímero foi então recuperado do sobrenadante por precipitação com três volumes de etanol 95% e após foi dialisado contra água destilada, ajustando para pH 7,0 e liofilizado.

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

Na precipitação do EPS aniônico produzido por *Pseudomonas elodea*, o caldo de fermentação foi pasteurizado após a fermentação completa, para eliminar as células viáveis. Subseqüentemente, foi realizado o processo de recolhimento do EPS, desacetilado ou não, através da adição de dois volumes de isopropanol 99%. O polissacarídeo foi recolhido e seco a 55°C através de circulação de ar, por uma hora, enquanto na forma desacetilada o pH do caldo de fermentação foi primeiramente ajustado a 10,0, com a adição

de KOH ou NaOH e aquecido a 95°C e então resfriado até 80°C e mantido nessa condição por 10 minutos. Posteriormente, foi neutralizado com H₂SO₄. O produto clarificado foi obtido através de filtração do caldo de fermentação quente tratado com álcali em pH 10,0, em membranas filtrantes "Gelman" (KANG et al., 1982; SANDERSON, 1990).

3.6 Tratamentos prévios nos polissacarídeos

Para a análise da composição glicosídica de um polissacarídeo é necessário remover os açúcares residuais do meio de crescimento e a proteína presente que pode ser originária da própria massa celular devido separação incompleta na centrifugação ou da biossíntese da bactéria. Na cromatografia de filtração em gel a ordem de eluição é diretamente proporcional ao tamanho das moléculas (massa molecular), com aquelas de menor peso molecular sendo eluídas por último e na cromatografia de troca iônica os solutos iônicos interagem com a fase estacionária os quais são liberados da coluna por aumento da força iônica do solvente utilizado. O material eluído é coletado em frascos de pequeno volume e analisados, individualmente, para açúcares totais e proteínas (PAZUR, 1994).

Outra possibilidade para fazer a purificação de polissacarídeos é efetuar a precipitação fracionada com solventes ou detergentes catiônicos,



como brometo de cetiltrimetilamônio, que precipitam seletivamente os polissacarídeos mais ácidos.

A purificação de polissacarídeos com agentes químicos ou com enzimas que interagem de forma específica com certos grupos como proteínas é uma outra forma viável. Sucessivas diálises contra água destilada devem ser usadas para separar peptídeos gerados pela hidrólise enzimática (SOMME, 1974; ROBERTSEN et al., 1981; CLARKE, 1995).

3.7 Hidrólise dos polissacarídeos

O primeiro passo na análise de biopolímeros é a clivagem das ligações glicosídicas entre as unidades monoméricas que os compõem. Isto normalmente é realizado por hidrólise ácida e/ou enzimática, e dependendo da maneira como esses monômeros forem detectados poderão, após a hidrólise, sofrer procedimentos de derivatização para proteção dos grupos funcionais. Têm sido realizados numerosos estudos para determinar as condições ótimas deste processo (DUDMAN, 1976).

Para uma identificação precisa, assim como, para uma análise quantitativa das unidades que compõem o polissacarídeo é necessário que a hidrólise ácida seja realizada em condições suficientemente brandas que não



causem degradação dos açúcares mas que permitam a quebra de todas as ligações glicosídicas.

Na prática, entretanto, pode ocorrer a destruição dos constituintes de interesse, ou por outro lado, a hidrólise incompleta devido a presença de uniões mais resistentes. As ligações glicosídicas de ácidos urônicos são muito estáveis e pode ocorrer descarboxilação ao invés da liberação dos ácidos. Por este motivo é conveniente utilizar diversos agentes hidrolisantes em diferentes condições e/ou reações de derivação para proteção dos grupos funcionais.

Diversos procedimentos, diferindo na natureza e na concentração dos ácidos envolvidos e no tempo e na temperatura usados, estão disponíveis para a hidrólise ácida de polissacarídeos com posterior identificação e quantificação dos componentes por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os agentes de hidrólise mais comumente usados são ácido sulfúrico, trifluoroacético (TFA), clorídrico, sulfúrico em metanol absoluto, fluorídrico e vários outros ácidos usados em clivagem reductiva (DAZZO; BRILL, 1979). A maior desvantagem do ácido sulfúrico está na incapacidade para hidrolisar completamente as ligações α (1-4) do ácido poliglicurônico e na dificuldade de remover este após a hidrólise. Por outro lado uma hidrólise com TFA (2 M, 1 hora, 121°C) permite que este possa ser facilmente removido por evaporação após o processo, entretanto foi relatado que estes



parâmetros são insuficientes para hidrolisar as ligações β (1-4) dos polímeros celulósicos e glicosaminoglucanas (DUDMAN, 1976).

Quando é necessário utilizar condições drásticas para garantir a quebra de ligações mais resistentes a maior dificuldade está sempre envolvida com a decomposição dos monômeros liberados. Com respeito a isto, as reações de derivação do heteropolissacarídeo, procurando por um lado proteger os grupamentos mais degradáveis e por outro facilitar a hidrólise, podem ser usadas no lugar da hidrólise ácida clássica, desde que a recuperação de açúcares neutros e ácidos urônicos seja eficiente (DUDMAN, 1976).

Um estudo com o objetivo de testar o melhor agente hidrolisante e diferentes condições de hidrólise foi realizado por Ruiter et al.(1992) para a análise de ácidos urônicos de polissacarídeos originários de fungos, plantas e animais, e constataram que o máximo de hidrólise, com um mínimo de decomposição, foi obtido com HCl metanólico 2 M à 80°C por 16 horas, seguido por hidrólise com TFA 2 M a 121°C por 1 hora.



3.8 Análises dos polissacarídeos hidrolisados

Os métodos de análises de polissacarídeos complexos baseiam-se principalmente na determinação dos constituintes monossacarídicos obtidos após hidrólise química dos polímeros nativos. Estes são compostos por vários resíduos de açúcares interligados através de diversos tipos de ligações glicosídicas diferentes (1→2; 1→3; 1→4; etc.) a estrutura de cada resíduo (pentose ou hexose) e a configuração anomérica das ligações (α ou β) podem diferir consideravelmente na sua suscetibilidade à hidrólise ácida. Os ácidos urônicos são freqüentemente envolvidos por fortes ligações glicosídicas, particularmente nos tipos de ligações que envolvem ácidos aldobiurônicos. Os procedimentos empregados para a determinação destes constituintes, geralmente exigem hidrólise antes ou depois de reações de derivação e posterior separação, identificação, quantificação e determinação da seqüência dos resíduos glicosil e configuração anomérica dos mesmos por técnicas e/ou métodos cromatográficos como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG), as quais devem ser auxiliadas por técnicas espectrofotométricas como a de Infravermelho, e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou hidrólise enzimática (DAZZO; BRILL, 1979).



3.9 Análises cromatográficas para determinação da composição dos polissacarídeos

A análise de um polissacarídeo envolve basicamente a constituição dos monossacarídeos, determinação da seqüência destes, determinação da posição das ligações glicosídicas, que em adição, incluem análises de outros grupos funcionais, com reações de derivação e conseqüente caracterização, identificação e quantificação. Os polissacarídeos apresentam uma diversidade estrutural nos grupos funcionais dos monossacarídeos (aldose, cetose, etc.), diferentes açúcares (manose, glicose, galactose, etc.), seqüência dos monômeros na cadeia, diferenças nas ligações glicosídicas e configurações anoméricas. Portanto, é necessária a análise destes parâmetros, embora exista uma grande variedade de métodos instrumentais, químicos e enzimáticos, nenhum deles é completo quando usado individualmente (CHAPLIN ; KENNEDY, 1994).

3.9.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

Por causa da diversidade, somada à complexidade da composição química, de heteropolissacarídeos produzidos por microrganismos, a



identificação e quantificação requer uma série de procedimentos analíticos complexos. Entretanto, uma primeira classificação pode ser obtida com base na composição dos monossacarídeos após clivagem das ligações glicosídicas (RASSI, 1996).

Muitos métodos cromatográficos foram testados para a identificação e quantificação de carboidratos. A cromatografia líquida permite a injeção direta da amostra do EPS hidrolisado e pode ser usado um sistema de detecção do índice de refração para açúcares, ultravioleta (210 nm) para grupos funcionais ou um arranjo de diodos para ácidos (210 nm e monitoração de outros comprimentos de onda). Embora a sensibilidade do arranjo de diodos seja menor, pode-se fazer a comparação dos espectros no início, meio e fim de cada pico, verificando-se assim a pureza do pico cromatográfico.

A análise de monossacarídeos por cromatografia gasosa (CG) requer derivatizações para aumentar a volatilidade dos compostos e diminuir a interação com a fase estacionária. Existem diversos métodos de derivatização, mas os mais usados são os procedimentos de formação de alditóis acetilados e trimetilsilanização (STEFANSSON ; WESTERLUND, 1996).

A técnica de cromatografia líquida com fase estacionária de sílica é muito usada na separação e análise de derivados de carboidratos, mas o método tem sido substituído pela cromatografia de fase reversa (RPLC), cuja



fase estacionária é uma superfície não polar, geralmente sílica com grupos alquila (C_4 , C_8 , C_{18}) ligados covalentemente. As sílicas C_8 e C_{18} baseadas em gel poroso, e C_{18} revestida monomericamente (géis de sílica reagidos com monoclóro, dicloro ou triclorosilano) têm sido as mais usadas em RPLC de carboidratos. Diversas revisões relatam o uso de RPLC com colunas poliméricas tipo poliestirenodivinilbenzeno e outras fases de resinas, mas a adsorção em sílica revestida, permanece, entretanto, uma opção favorável para alguns autores, exemplo disso, é o uso da cromatografia de interação eletrofílica (HILIC) com fase estacionária muito menos hidrofóbica que RPLC, uma vez que, a fase móvel é mais polar do que a fase estacionária. Para os carboidratos e derivados a água ou misturas de solventes hidro-orgânicos e tamponados ou não, podem ser usadas, devendo porém ser compatíveis com o detector (transparência óptica) (RASSI, 1996).

A CLAE vem sendo utilizada na identificação e quantificação de produtos da hidrólise ácida de polissacarídeos. O uso de colunas com fase estacionária ligadas a NH_2 com a mistura acetonitrila:água como eluente em CLAE tem sido muito utilizada para a separação de carboidratos e polióis com detecção por índice de refração, ou para estes compostos juntamente com ácidos urônicos usando refratômetro diferencial (WEI ; FANG, 1990). Outros polissacarídeos como a frutana, obtida do trigo, foi parcialmente hidrolisada com HCl e os produtos foram analisados através de duas colunas C_{18} em série com a finalidade de aumentar a resolução; sendo que a água foi



utilizada como fase móvel e os produtos foram detectados por índice de refração. Os resultados obtidos levaram a uma considerável separação de numerosos oligômeros da frutana. A separação de três frutanas com grau de polimerização conhecidos (GP3) se deu em 8 minutos e para as frutanas com GP4 em torno de 15 minutos. O uso do índice de refração como detector tornou possível a detecção de 0,1 microgramas de carboidrato na amostra injetada, sendo obtida uma resposta linear quando a amostra foi maior que 0,1 mg, tornando a identificação possível também para grandes quantidades. Com a resolução da CLAE foi possível detectar e quantificar pequenas quantidades de alguns compostos na presença de grandes quantidades de outros compostos (BANCAL ; GAUDILLÈRE, 1989).

3.9.2 Análises de carboidratos por cromatografia de troca iônica de alta performance com detector de pulso amperométrico (HPAE-PAD)

Para resolver algumas limitações das técnicas de cromatografia líquida em relação à solubilidade e concentração da amostra, foi desenvolvida uma técnica cromatográfica conhecida como troca iônica de alta performance (HPAE). Nesta, o cromatógrafo é acoplado com um detector de pulso amperométrico (PAD), permitindo a quantificação direta de carboidratos não derivatizados em níveis de nanomol (nmol) com um mínimo de amostra preparada. A cromatografia HPAE apresenta a vantagem de que

a natureza fracamente ácida dos carboidratos confere alta seletividade na separação em pH elevado usando uma fase bastante forte de resina de troca iônica. Esta técnica tem sido revisada extensivamente (DIONEX, 1993).

A técnica da HPAE-PAD é extremamente seletiva e específica devido a detecção por pulsos amperométricos de compostos que contenham grupos funcionais que possam ser oxidados na voltagem empregada (neste caso, a sensibilidade para carboidratos está em ordem de magnitude maior do que para outras classes de analitos).

Esta técnica tem sido muito empregada para a análise de carboidratos ácidos e glicopeptídeos mas não para açúcares neutros. Entretanto, o exame dos valores de pK_a de monossacarídeos neutros mostra que os carboidratos são na verdade ácidos fracos. Em pH elevado, eles são parcialmente ionizados, e assim podem ser separados por mecanismos de troca de ânions. Esta aproximação não pode ser usada com colunas clássicas de sílica devido à solubilização da matriz em pH elevado, o que não ocorre com o polímero de troca iônica.

As colunas empregadas devem ser específicas para a análise de carboidratos por cromatografia aniônica. Elas permitem a separação e análise de mono-, oligo-, e polissacarídeos. Suas características de empacotamento permitem uma rápida transferência de massa, uma grande estabilidade em toda a faixa de pH (0-14) e um bom comportamento em



relação a diferenças de pressão na ordem de 4000 psi, devendo assim se reequilibrar rapidamente após análises com gradientes de vazão e pressão.

Outra estratégia usada é a variação da concentração do NaOH no eluente. Esse parâmetro altera o tempo de retenção dos compostos em análise na coluna e pode ser aplicado em oligossacarídeos neutros não reduzidos.

Os carboidratos sofrem um número conhecido de reações em pH elevado que podem vir a interferir na técnica cromatográfica. Entretanto, a maioria dessas reações são lentas à temperatura ambiente e acredita-se que não chega a comprometer a análise cromatográfica.

A técnica de detecção por pulso amperométrico permite a identificação de carboidratos com excelente relação entre sinal e ruído, ficando a sensibilidade desta análise em aproximadamente 10 picomoles sem necessidade de derivatização da amostra. Os carboidratos são detectados pela medida da corrente elétrica gerada pela sua oxidação na superfície de um eletrodo de ouro. Os produtos dessa oxidação também contaminam a superfície do eletrodo, portanto recomenda-se que ele deve ser lavado entre as medidas. Este processo é realizado com o aumento do potencial a um nível suficiente para oxidar a superfície do eletrodo, causando a desorção dos produtos de oxidação dos carboidratos, deixando assim a superfície do eletrodo em condições para uma nova detecção (DIONEX, 1993).



4. Materiais e Métodos

4.1 Isolamento e seleção das bactérias produtoras

4.1.1 Isolamento das bactérias

As amostras de rizosfera foram coletadas de plantas escolhidas aleatoriamente com o mínimo de terra possível. Essas foram coletadas a uma profundidade de 15 cm em relação à superfície do solo, com o auxílio de uma pinça e tesoura desinfetadas em álcool 70%. Em seguida, foram colocadas dentro de um frasco fechado, previamente esterilizado, acondicionadas em caixa térmica contendo gelo reciclável e, imediatamente, levadas ao Laboratório para o processamento das mesmas, devidamente identificadas.

Foram pesadas 10 g das raízes com a terra remanescente e adicionadas a 90 mL de água destilada estéril. A partir dessa, foram feitas diluições decimais seriadas até diluição 10^{-15} , das quais, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL, que foi semeada em superfície com o auxílio de uma alça de Drigalsky em placas de Petri contendo meio "Plate Count Agar" (PCA). As placas foram incubadas a 30°C por 24, 48, 72, 96 e 120 horas. A cada 24 horas as culturas que cresciam formando colônias isoladas, gomosas e brilhantes

foram selecionadas e novamente semeadas em placa de Petri contendo PCA para a purificação da cultura.

4.1.2 Obtenção da cultura pura

O método para a obtenção da cultura pura foi o de esgotamento em placa de Petri contendo PCA. Para a avaliação da pureza foram feitos esfregaços em lâminas de microscopia e a seguir, coradas pelo método de Gram. Desta forma, puderam ser observadas as características microscópicas das bactérias isoladas.

4.1.3 Manutenção e propagação dos microrganismos

As culturas purificadas foram semeadas por esgotamento em tubos contendo PCA inclinado, incubadas a 30°C durante 24 horas e depois, mantidas na geladeira à temperatura de 7°C. As bactérias selecionadas permaneceram neste meio até a data de serem repicadas para as provas bioquímicas de identificação. As culturas foram armazenadas sob uma camada de óleo mineral em tubos contendo PCA inclinado e foram usadas como culturas de estoque.



4.2 Produção dos biopolímeros

4.2.1 Microrganismos

Para a produção dos polissacarídeos microbianos foram utilizadas duas bactérias, isoladas da rizosfera, que apresentaram colônias gomosas. Uma dessas foi caracterizada parcialmente por QUEIROZ (2001) como pertencente ao gênero *Pseudomonas* (denominada como 10D) e outra e caracterizada por FARIA (2002) como sendo do gênero *Rhizobium* sp. (denominada 24A).

4.2.2 Meio base

O meio base empregado para a fermentação consistiu de uma fonte de carbono (sacarose ou glicose), uma fonte de nitrogênio (sulfato de amônia) e de sais minerais, como proposto por Souw & Demain (1979):



Componente	Quantidade (g/L)
KH_2PO_4	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,0
ácido cítrico	
H_3BO_3	0,006
ZnO	0,006
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0024
CaCO_3	0,002
HCl	0,15

O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH e/ou HCl (antes da esterilização).

4.2.3 Meios de produção

Os meios de produção foram obtidos pela adição de soluções esterilizadas das fontes de carbono ao meio base (item 4.2.2), previamente esterilizado, de modo a fornecer a concentração de 2%. As fontes de carbono testadas foram glicose e sacarose. A concentração foi expressa em porcentagem peso/volume.



4.2.4 Preparo do inóculo

A bactéria foi inoculada por esgotamento em tubos inclinados de PCA que foram incubados por 24 h. a 30°C. Após a incubação foi feita a suspensão da cultura pela adição de 2,0 mL de água destilada estéril e transferida para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de produção e incubada a 30°C e 200 rpm durante 24 horas (pré-inóculo).

4.2.5 Produção dos biopolímeros

A suspensão de células preparada em 4.2.4 foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de produção. A seguir, foram incubados a 30°C e 200 rpm durante 96 h. o esquema da produção está na Figura 3.

4.2.6 Separação do polissacarídeo e das células

O polissacarídeo produzido e solubilizado no caldo de fermentação foi centrifugado por 10 minutos a 6000 rpm usando uma centrífuga Jouan modelo 1000 com controle de temperatura. A seguir, foi precipitado com três volumes de etanol anidro e, depois da remoção do sobrenadante, foi



colocado para secar em estufa a vácuo a 50°C até atingir peso constante.

Esse material foi denominado polissacarídeo bruto.

O material celular depositado na centrifugação foi removido e seco em estufa a vácuo a 50°C em placas de Petri até peso constante para a determinação do crescimento celular.



Figura 2. Fluxograma do processo utilizado na produção das heparinases.

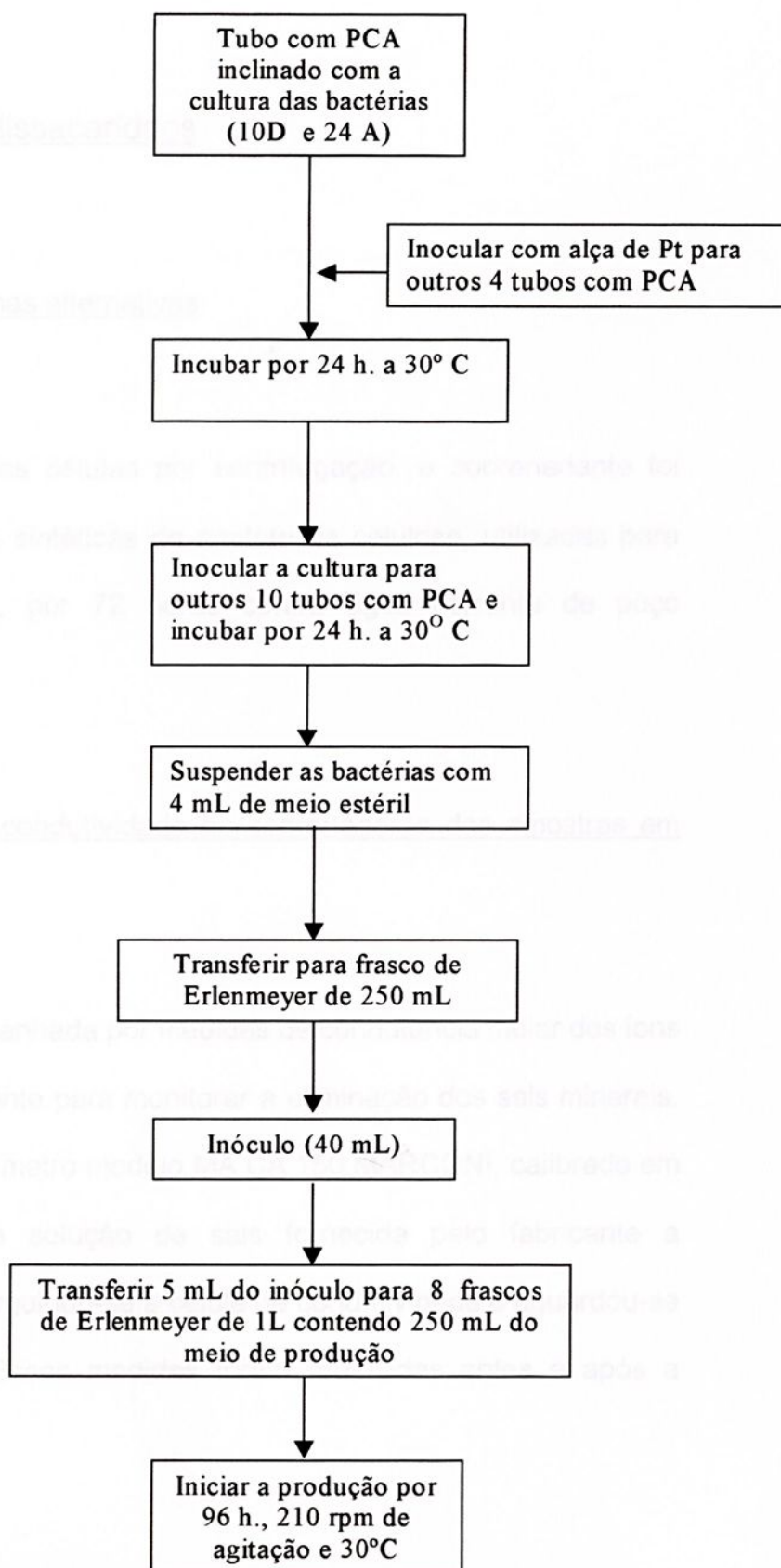


Figura 3. Fluxograma do processo utilizado na produção dos biopolímeros.

4.3 Purificação dos polissacarídeos

4.3.1 Diálise em membranas alternativas

Após a retirada das células por centrifugação, o sobrenadante foi dialisado em membranas sintéticas de acetato de celulose, utilizadas para fabricação de salsichas, por 72 horas contra água corrente de poço artesiano.

4.3.2 Determinação da condutividade no sobrenadante das amostras em solução

A diálise foi acompanhada por medidas de condutância molar dos íons dissolvidos no sobrenadante para monitorar a eliminação dos sais minerais. Foi utilizado um condutivímetro modelo MA CA 150 MARCONI, calibrado em 146,7 mS/cm com uma solução de sais fornecida pelo fabricante a temperatura de 25°C. Mergulhou-se a célula de condutividade e aguardou-se o tempo de equilíbrio. Essas medidas foram realizadas antes e após a diálise.



4.3.3 Concentração e precipitação do sobrenadante

O sobrenadante foi concentrado em estufa a vácuo a 50°C por 24 horas e precipitado com etanol anidro previamente resfriado em volume equivalente a três vezes o do caldo de fermentação. Após a decantação, o polissacarídeo obtido foi colocado para secar em estufa a vácuo, a 50° C até atingir peso constante. A Figura 4 apresenta todo o processo de purificação do polissacarídeo.

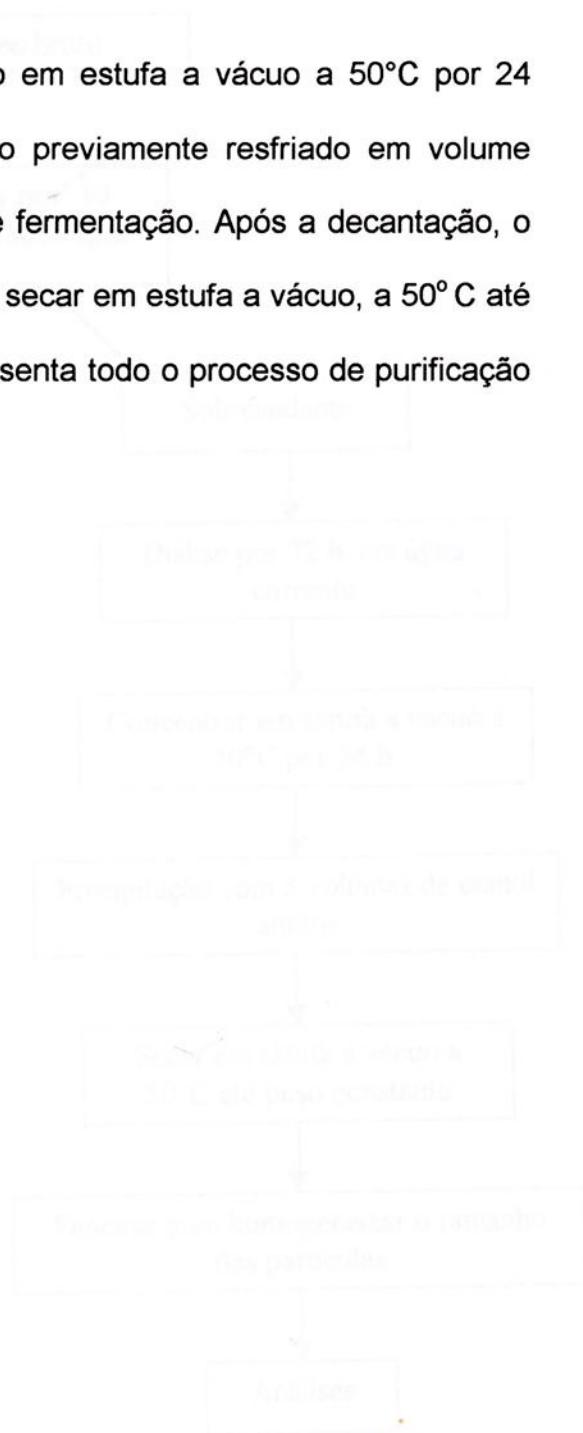


Figura 4: Etapas de purificação do polissacarídeo fermentado.

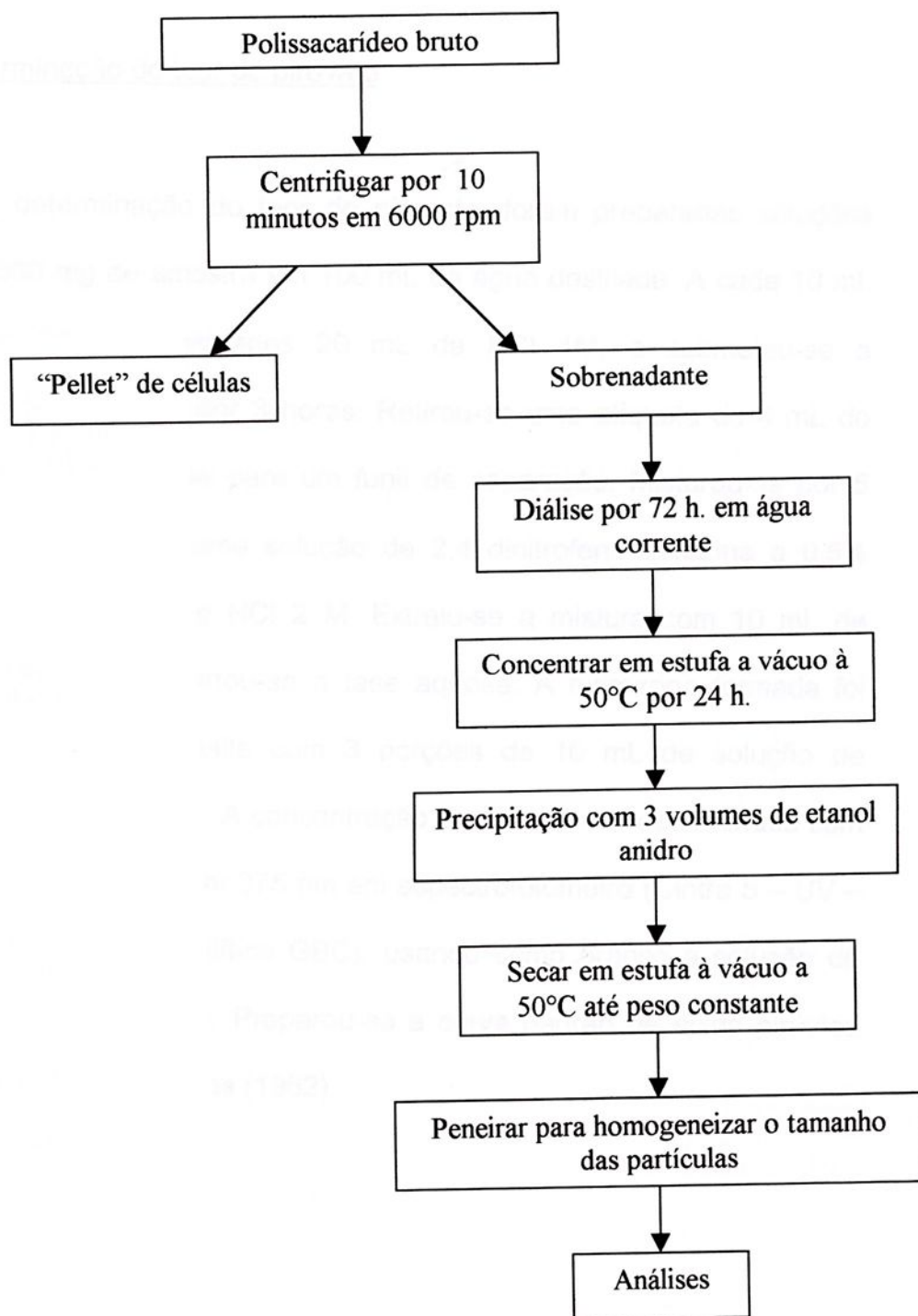


Figura 4. Etapas da purificação do polissacarídeo bacteriano

4.4 Identificação dos polissacarídeos

4.4.1 Determinação do teor de piruvato

Para determinação do teor de piruvato, foram preparadas soluções contendo 600 mg de amostra em 100 mL de água destilada. A cada 10 mL de solução foram adicionados 20 mL de HCl 1M, e submeteu-se a aquecimento em refluxo por 3 horas. Retirou-se uma alíquota de 4 mL do hidrolizado e transferiu-se para um funil de separação. Misturou-se por 5 minutos, com 2 mL de uma solução de 2,4 dinitrofenil-hidrazina a 0,5% preparada em solução de HCl 2 M. Extraíu-se a mistura com 10 mL de acetato de etila, e descartou-se a fase aquosa. A hidrazona formada foi extraída do acetato de etila com 3 porções de 10 mL de solução de carbonato de sódio a 10%. A concentração de piruvato foi determinada com a leitura da Absorbância em 375 nm em espectrofotômetro (Cintra 5 – UV – Visível Duplo Feixe – Analítica GBC), usando como branco a solução de carbonato de sódio a 10%. Preparou-se a curva padrão de ácido pirúvico conforme Sloneker & Orentas (1962).



4.4.2 Determinação do teor de acetila

A determinação da acetila foi realizada após a hidrólise do polissacarídeo com NaOH 0,5 M e posterior neutralização com HCl 0,5 M. Pesou-se 0,4 g, com precisão de 0,1 mg, do polissacarídeo e adicionou-se 2,00 mL de etanol absoluto e aproximadamente 10 mL de água destilada. Agitou-se em agitador magnético por 2 horas, até total solubilização da amostra. Titulou-se inicialmente com solução fatorada de NaOH 0,1 M para a verificação da acidez livre (V1). Adicionou-se 20,00 mL de solução de NaOH 0,5 M e deixou-se a amostra em repouso por 15 min. Adicionou-se 20,00 mL de solução de HCl 0,5 M e 5 gotas de indicador de fenolftaleína. Titulou-se o excesso de ácido com solução de NaOH 0,1 M. Procedeu-se a repetição do procedimento sem a amostra (prova em branco) (MAYNARD, 1970).

4.4.3 Determinação de cinzas

Pesou-se 1 grama, com precisão de 0,1 mg, da amostra triturada e homogeneizada em cadinho de porcelana tarado e previamente preparado em mufla a 550°C por 30 minutos. Levou-se à mufla na temperatura de 550°C por 4 horas. Após o período o cadinho foi para um dessecador por 40 min. e procedeu-se então a pesagem. O cálculo do teor de cinzas na amostra



foi determinado pela diferença das massas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

4.4.4 Determinação quantitativa de proteínas residuais

Para verificar a presença ou não de proteínas no polissacarídeo após a diálise foi utilizado o Método de Bradford (1976). Para esta determinação foi feita uma curva padrão utilizando soro albumina bovina. As leituras foram realizadas num espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

4.4.5 Determinação de açúcares totais

Foi utilizado o método espectrofotométrico para determinação de açúcares e substâncias relacionadas descrito por Dubois et al. (1956). Este método baseia-se na reação característica do açúcar, o qual adquire uma coloração amarelo-alaranjada quando tratado com fenol e ácido sulfúrico concentrado. Foi usado como padrão uma solução de galactose e os valores de absorbância foram lidos em 489 nm.



4.4.6 Análises de carboidratos por Cromatografia de Troca Iônica de Alta Performance com Detector de Pulso Amperométrico (HPAE-PAD)

4.4.6.1 Preparação da amostra

A amostra contendo cerca de 10 a 25 μg de carboidrato calculado a partir dos valores encontrados na análise de açúcares totais (4.4.5) foi pesada em frascos Ependorfs de material conhecidamente inerte ao ataque ácido.

4.4.6.2 Hidrólise

A hidrólise ácida foi feita pela adição de 200 μL de ácido trifluoro acético (TFA) de concentração 5 M adicionado a amostra liofilizada. Procedeu-se uma purga com gás nitrogênio por 2 minutos para assegurar a total remoção do oxigênio. O tubo foi selado e aquecido a 100°C por 16 horas. Após o processo, o ácido residual foi totalmente removido da amostra por evaporação utilizando-se uma centrífuga a vácuo (Heto-DNA Plus), seguido por dois ciclos de lavagens com a adição de 200 μL de H_2O e subsequente evaporação.



4.4.6.3 Padrões de açúcares utilizados

Foi utilizado como padrão uma mistura contendo 120 $\mu\text{g/mL}$ de cada um dos seguintes monossacarídeos: L-fucose, L-ramnose, D-arabinose, D-xilose, D-manose, D-galactose e D-glicose.

4.4.6.4 Análise por cromatografia líquida de alta pressão em cromatógrafo de íons (HPAEC)

Os monossacarídeos foram quantificados por cromatografia líquida de alta pressão consistindo de um sistema Dionex DX500 e um Detector de Amperometria Integrada (IAD) (Figura 5). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocraticamente (H_2O) usando uma coluna analítica CarboPac PA10 (4 x 250 mm) equipada com uma guarda coluna PA10 a velocidade de fluxo de 1,2 mL/min. As condições de eluição foram produzidas usando H_2O deionizada (eluente 1) e NaOH 200 mM (eluente 2) preparada a partir de solução de NaOH 50%. A coluna foi regenerada após 35 min. de corrida com 100% do eluente 2, por 10 min. seguida pelo retorno a H_2O deionizada, precedida por um período de 15 min. nas mesmas condições da corrida (para equilibrar a coluna) antes da injeção da amostra.





Figura 5. Configuração do sistema cromatográfico utilizado para a análise dos monômeros dos açúcares do polissacarídeo (HPAE-PAD).

5. Resultados e Discussão

5.1 Seleção das bactérias produtoras

A seleção das bactérias produtoras foi baseada na determinação dos parâmetros de fermentação de 5 bactérias diferentes (7F, 20F, 10D, 13D e 24A). Os parâmetros utilizados foram: tempo de cultivo, agitação, temperatura, produção, crescimento e viscosidade do caldo de fermentação. Destes, o principal critério utilizado para a escolha foi o maior valor de viscosidade do caldo de fermentação, e a seguir, a maior produção de polissacarídeo. O crescimento celular foi determinado como peso celular seco, sendo que este parâmetro não foi decisivo, uma vez que a produção do polissacarídeo independe do crescimento (EVANS; YEO; ELLWOOD, 1978). Na Tabela 2 estão representados os caldos de fermentação que apresentaram maior viscosidade e as bactérias correspondentes denominadas 24A, 10D e 13D.

A Tabela 3 relaciona os valores de produção em g/L de polissacarídeo e o peso celular seco (g/L) encontrados durante a síntese de biopolímero com as bactérias selecionadas, num período de incubação de 96 horas a 200 rpm e 30°C. O maior valor do polissacarídeo produzido e da viscosidade fornecida ao caldo de fermentação foi determinado para a bactéria 24A.



Tabela 2. Viscosidade do caldo de fermentação para a seleção das bactérias produtoras durante o período de incubação de 48, 72 e 96 h. a 200 rpm e 30°C.

Bactérias	Viscosidade (cp)		
	48 h.	72 h.	96 h.
7F	0,5	0,4	0,5
20F	0,5	0,4	0,6
10D	2,2	2,2	2,4
13D	2,2	2,3	2,3
24A	4,5	9,3	10,7

Tabela 3. Produção de polissacarídeos e determinação do peso celular seco das bactérias produtoras, após 96 horas de incubação a 200 rpm e 30°C.

Bactérias	Polissacarídeo (g/L)	Peso celular seco (g/L)
7F	8,0	0,4
20F	6,8	0,4
10D	7,8	1,1
13D	7,9	1,2
24A	11,6	3,4

Não houve diferença significativa entre os valores obtidos na produção de polissacarídeos para as bactérias 7F, 13D e 10D. Entretanto, os valores de viscosidade foram maiores para as bactérias 13D e 10D. Nesta Tabela 3 pode-se ainda observar que o crescimento (peso celular seco) da bactéria 24A foi superior as demais seguido pelas bactérias 13D e 10D, sugerindo que a produção de polissacarídeo foi proporcional, exceto para a bactéria 7F.

Baseado nestes resultados, selecionou-se então, as bactérias 24A e 10D para as sínteses posteriores necessárias a elaboração do trabalho proposto.

5.2 Identificação das bactérias selecionadas

Esta etapa foi realizada pelo grupo de trabalho do laboratório de Biopolímeros do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE- São José do Rio Preto - SP. A bactéria 10D foi submetida inicialmente a coloração de Gram e a observação de suas características morfológicas para confirmação de sua pureza. Em seguida, foram realizados diversos testes bioquímicos e seus resultados foram confrontados com o Manual de Bergey's (1994) que é específico para este tipo de caracterização. A bactéria 10D foi caracterizada por Queiroz (2001) quem determinou que



esta possuía 93% de semelhança com o gênero *Pseudomonas*, 85% com o gênero *Agrobacterium* e 75% com o gênero *Xanthomonas*.

A bactéria 24A foi caracterizada por Faria (2002), usando técnicas bioquímicas e de biologia molecular, e o estudo mostrou 84% de similaridade com as seqüências parciais do DNAr 16S do gênero *Rhizobium sp* que estavam depositadas no GenBank.

5.3 Produção dos polissacarídeos

A produção dos polissacarídeos foi realizada com as bactérias previamente selecionadas, no meio proposto por Souw & Demain (1979), adicionado de 2% da fonte de carbono (sacarose ou glicose) e incubadas num agitador tipo "Shaker" com agitação orbital a 200 rpm durante um período de 76 horas a 30°C. O pH foi ajustado a 7,0. Estas condições de trabalho, determinadas previamente, mostraram ser ideais para frascos Erlenmeyer de 250 mL de volume contendo 50 mL do meio de fermentação.



5.3.1 Aumento da escala de produção

Foi testado o aumento do volume do frasco Erlenmeyer e do volume do meio de produção do polissacarídeo. Inicialmente 50 mL do meio de produção estavam contidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL. O volume do meio foi aumentado para 200 mL e do frasco Erlenmeyer para 1000 mL. Foi mantida constante a proporção do inóculo de bactérias adicionado ao meio, da mesma forma que a agitação (200 rpm), temperatura (30°C) e pH (7,0).

Os resultados obtidos estão listados na Tabela 4 e evidenciam que houve uma diminuição na quantidade de polissacarídeo produzido com o aumento da escala de trabalho. O principal fator responsável por esse resultado pode ter sido a aeração insuficiente, uma vez que, a maior altura da camada líquida do meio de produção impediu uma troca satisfatória do oxigênio necessário para o microrganismo metabolizar a fonte de carbono e num volume maior a agitação de 200 rpm foi insuficiente.

A importância de uma boa incorporação de oxigênio (agitação) é um fator primordial nas fermentações, uma vez que permite maior homogeneidade ao cultivo e proporciona a uniformidade da concentração de nutrientes, pH e temperatura, além de dispersar as bolhas de ar na massa líquida, permitindo, assim, que o ar chegue ao microrganismo (PELCZAR; REID; CHAIN, 1996). Além disso, a aeração do sistema é fundamental para a manutenção da bactéria por mais tempo em metabolismo oxidativo, gerando,



assim, mais ATP para a biossíntese, e também promovendo a oxidação de certos produtos que se acumulam no meio de cultura, resultantes do próprio metabolismo celular e que são tóxicos para as bactérias (CASTRO, 1993).

Tabela 4. Produção de polissacarídeos usando as bactérias 10D e 24A e as fontes de carbono glicose ou sacarose, variando a escala de produção após 96 h. de incubação a 200 rpm e 30°C.

Bactérias	Fonte de Carbono	Polissacarídeo obtido em Erlenmeyer de 250 mL (g/L)	Polissacarídeo obtido em Erlenmeyer de 1000 mL (g/L)
10D	Glicose	7,8	5,9
10D	Sacarose	9,2	5,3
24A	Glicose	7,9	5,4
24A	Sacarose	8,2	5,5

Em reatores com agitação a taxa de transferência de oxigênio na massa líquida é influenciada pela taxa de fluxo de ar e pela velocidade da agitação (GARCÍA-OCHOA, 2000). Em nosso sistema, uma alternativa seria introduzir haletas dentro dos frascos de Erlenmeyer; estas produziriam um vórtice e um turbilhonamento, o que aumentaria a superfície de contato do meio de produção com o ar e tornaria sua absorção mais eficiente. Alguns autores sugerem também a variação da velocidade de agitação em função da viscosidade do caldo de fermentação, iniciando com valores mais baixos e a partir do aumento da viscosidade a velocidade também sofreria um acréscimo devido à limitação na transferência de oxigênio na massa líquida

relacionada ao aumento da viscosidade. Moo-Young; Christi e Vlach (1993) também observaram que uma agitação excessiva, principalmente nas etapas iniciais da fermentação, causaria danos as células e comprometeria o resultado final.

5.3.2 Recuperação dos polissacarídeos do caldo de fermentação

A principal técnica usada para a recuperação dos polissacarídeos do caldo de fermentação é a precipitação com solventes solúveis em água, como por exemplo, os álcoois (SMITH & PACE, 1982). O tipo de álcool e as perdas do processo viabilizarão o custo final da produção, o que torna o conhecimento do mecanismo, nas fases de separação, importante para se criar alternativas visando maior precipitação com menor volume de álcool.

Nesta etapa do trabalho foi testado o efeito do álcool etílico anidro para precipitar o polissacarídeo do caldo de fermentação. A bactéria 10D foi crescida em 2% de glicose como fonte de carbono, 30°C e 200 rpm de agitação por 76 horas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 6, e mostram que com o aumento do teor alcoólico, a massa de biopolímero recuperada foi incrementada. Resultados semelhantes foram obtidos por Gonzáles et al. (1989).



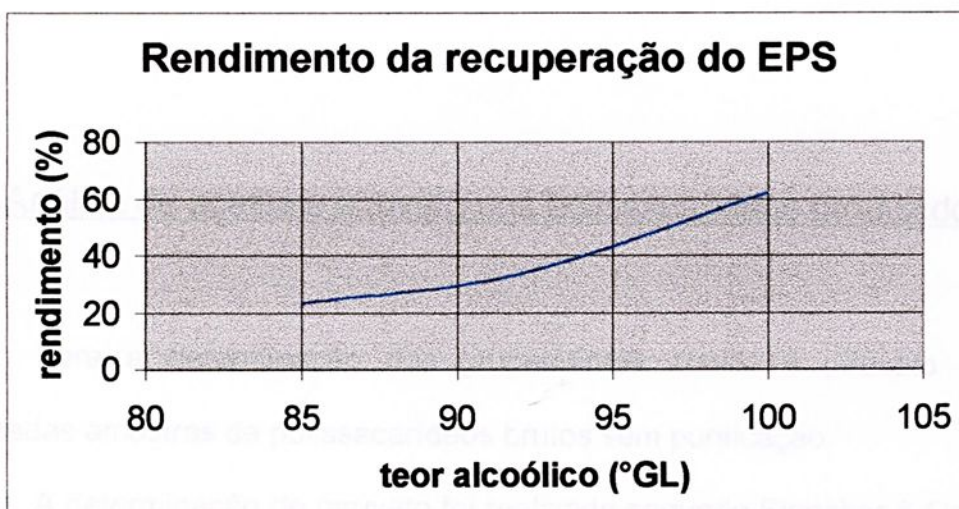


Figura 6. Efeito do teor alcoólico no rendimento da recuperação do polissacarídeo produzido pela bactéria 10D crescida em 2% de glicose a 30°C e 200 rpm de agitação por 76 horas.

O principal efeito da concentração do álcool etílico na recuperação do polissacarídeo é de que ele diminui a constante dielétrica da mistura de solventes. Em consequência, o álcool aumenta as atrações intermoleculares entre as moléculas do soluto e fortalece a ligação do cátion com a molécula do polissacarídeo (GONZALES et al., 1989).

A adição de um solvente polar promove a precipitação do EPS não somente pela diminuição da afinidade da água com o biopolímero, mas também pelo aumento da ligação entre os cátions que estão presentes. Isto justifica os bons resultados quando da adição de sais em combinação com o álcool (GARCÍA-OCHOA; CASAS; MOHEDANO, 1993).

Outra vantagem em se optar por este solvente foi a maior facilidade em se recuperar a mistura etanol-água por processos de destilação.

5.4 Análise de acetila e piruvato nos polissacarídeos produzidos.

Para a determinação dos grupamentos acetila e piruvato foram utilizadas amostras de polissacarídeos brutos sem purificação.

A determinação de piruvato foi realizada segundo Sloneker & Orentas (1962). Foi necessário construir uma curva padrão para as análises espectrofotométricas utilizando o ácido pirúvico p.a. (Sigma-Aldrich), obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,9999 para os resultados da calibração. Para quantificar os grupamentos piruvato no polissacarídeo bacteriano foi utilizado como padrão a goma xantana grau alimentar, fornecida pela empresa CP Kelco Brasil S.A., nome comercial KELTROL F, e o resultado obtido foi 4,9%, portanto de acordo com o encontrado na literatura (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Para a análise do grupamento acetila neste mesmo polissacarídeo, trabalhou-se com diferentes metodologias. Primeiro foi tentado o método proposto por Mc Comb; McCready (1957), cujo princípio é espectrofotométrico, mas os resultados das leituras de absorbância não tinham relação quantitativa com as massas pesadas do padrão, impedindo assim a construção da curva de calibração. Outra tentativa foi o método de Henglein; Volmert (1948), citado por Maynard (1970), que tem como princípio converter o grupamento acetila em ácido acético e destilar esse



ácido obtido para posterior titulação com álcali; os resultados também não foram quantitativos em relação ao padrão. Os melhores resultados, entretanto, foram obtidos de uma adaptação de outro método de Maynard (1970), no que se realiza uma hidrólise alcalina da amostra para disponibilizar os grupamentos acetila, que depois serão neutralizados com 20,00 mL de HCl 0,5 M para uma posterior titulação do excesso de ácido com solução alcalina de NaOH 0,1 N. Para a execução desse método foram realizadas algumas adequações. Devido a difícil solubilização da goma xantana num volume pequeno de água, foi necessária a adição de 2 mL de etanol absoluto à amostra pesada (cerca de 0,4 g) antes de se adicionar água destilada para a preparação da suspensão a ser titulada. Esta foi agitada em agitador magnético por 2 horas e titulada previamente com solução de NaOH 0,1 N para se verificar a acidez livre, ou seja, grupamentos de caráter ácido que não estavam efetivamente ligados à estrutura glicosídica do polissacarídeo como sucede com os grupos acetila. A bibliografia citada, não menciona esta titulação prévia e já parte para a reação de hidrólise com a adição da solução de NaOH.

Outro cuidado analítico observado nessa metodologia foi a padronização constante de todas as soluções utilizadas e a preparação de uma prova em branco, para desconsiderar as alterações das soluções e do reagente adicionado.



Para a quantificação dos grupos acetila, também foi utilizada uma amostra de goma xantana, KELTROL F, e o teor obtido foi 4,3%, o que condiz com a literatura (GARCIA-OCHOA et al., 2000) e com a especificação do fabricante, portanto essa amostra foi utilizada como padrão.

Os resultados da determinação do teor de acetila e piruvato nos polissacarídeos bacterianos estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 5. Teor de acetila e piruvato nos polissacarídeos produzidos pelos isolados bacterianos 10D e 24A em glicose e/ou sacarose na concentração de 2% após incubação por 96 horas a 30°C e 200 rpm

Bactérias	Fonte de Carbono	Teor de piruvato (%)	Teor de acetila (%)
10D	Glicose	tr	1,3
10D	Sacarose	tr	0,6
24A	Glicose	tr	2,2
24A	Sacarose	tr	1,2

tr= traços, valor abaixo do nível de detecção

Os valores apresentados na Tabela 6 evidenciam valores abaixo do limite de detecção para o grupamento piruvato em todas as amostras analisadas.

O polissacarídeo produzido pela bactéria 24A apresentou os maiores valores de acetila nas duas fontes de carbono estudadas.

5.5 Determinação do teor de cinzas

A análise do teor de cinzas ou matéria mineral, foi uma etapa importante no desenvolvimento do trabalho para verificar a presença de contaminantes no meio contendo o polissacarídeo obtido. A metodologia seguida foi a proposta nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). As amostras de polissacarídeos estudadas quando submetidas à incineração, apresentaram valores elevados de cinzas em ambas fontes de carbono (Tabela 7). Essa matéria mineral é proveniente do excesso de sais do meio de produção de Souw e Demain (1979) durante a precipitação do biopolímero do caldo de fermentação com álcool etílico. Portanto, o polissacarídeo bruto apresenta alto teor de contaminantes minerais e tornou-se necessário um tratamento adicional para a eliminação dos sais e posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

Tabela 6. Teor de cinzas dos polissacarídeos brutos determinado em 1g de amostra a 550°C por 4 horas.

Bactérias	Fonte de carbono	Teor de cinzas (%)
10D	Glicose	72,1
10D	Sacarose	75,0
24A	Glicose	62,3
24A	Sacarose	55,4

5.6 Tratamento prévio dos polissacarídeos por diálise

Para dialisar os polissacarídeos as membranas recomendadas deveriam permear substâncias com peso molecular inferior a 12.000 Daltons. Esse material é importado e de preço elevado, portanto foi necessário fazer testes com materiais alternativos que viabilizassem um processo com menor custo.

Tradicionalmente têm sido empregadas membranas dos mais variados tipos de materiais que sempre ofereceram resultados satisfatórios em processos de diálise, desta forma, testamos membranas naturais que foram adquiridas nos açougues e estabelecimentos comerciais especializados de São José do Rio Preto - SP.

As membranas testadas foram intestinos de suínos, bovinos e caprinos, com diferentes diâmetros e fornecedores. Estas, que estavam recobertas com uma camada de sal, para a melhor conservação, apresentavam também resíduos de gordura, em função disso, foram tratadas com uma solução de bicarbonato de sódio a 1% e aquecimento por 20 minutos. A membrana de carneiro foi considerada a mais frágil e com diâmetro inferior as demais; não suportou o tratamento, rompendo-se em diversos locais. As membranas procedentes de bovinos e suínos foram mais resistentes, mas também romperam quando em contato com a solução após



a diálise. Portanto esse tipo de material, que foi o pioneiro na técnica de diálise, não apresentou resultados satisfatórios devido à sua fragilidade.

Foram testados materiais sintéticos de diversas procedências, texturas, diâmetros e espessuras de parede num total de 7 amostras. Preparou-se uma mistura sintética de goma xantana que simulava o polissacarídeo no caldo de fermentação com alto teor de sais minerais (fosfato monoácido de potássio, na proporção 3:7). Para acompanhar a eficiência da diálise foi determinado o teor de cinzas (Instituto Adolfo Lutz, 1985) no polissacarídeo recuperado após precipitação com álcool e a determinação da condutividade iônica da solução antes e após a diálise. Os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados e características das membranas utilizadas para a diálise de uma solução padrão de goma xantana adicionada de fosfato monoácido de potássio, na proporção 3:7, à temperatura de 20°C.

Tipos de membrana	Teor de cinzas (%)	Condutividade (mS/cm) * **	Aparência	Composição e origem	Diâmetro (cm)	Tratamento antes do uso
Preservativo masculino	76,4	4,20	Material lubrificado de alta resistência em forma de tubo	Borracha natural vulcanizada	5,0	Remoção do gel lubrificante por lavagens com água destilada quente
Celofane	72,5	4,00	Transparente Folha de 100 cm ²	Acetato de celulose	20,0	Nenhum
Tripa sintética I	6,8	0,12	Transparente e compactada em forma de tubo Usada para fabricação de salsichas	Fibras de celulose material importado fornecida pelo Frango Sertanejo S. A.	2,5	Imersão em água destilada por 15 min. na temperatura ambiente
Tripa sintética II	50,8	3,86	Cor rósea com odor de condimentos	Material plástico de textura rígida	4,0	Lavagens com água destilada
Tripa sintética III	Não foi possível determinar	Não foi possível determinar	Levemente amarelada, baixa resistência e compactada em forma de tubo	Material flexível de fornecedor desconhecido	3,0	Lavagens com água destilada Material frágil que se rompe facilmente
Tripa sintética IV	Não foi possível determinar	Não foi possível determinar	Transparente, furos na superfície compactada em forma de tubo	Material de fibra de celulose e fornecedor desconhecido	3,0	Lavagens com água destilada
Tripa sintética V	74,8	4,33	Coloração esbranquiçada, textura rígida e resistente, pouco flexível	Material plástico de textura rígida fornecedor desconhecido	8,5	Fervura por 20 min. em água destilada

* mS/cm = no S.I. unidade de condutividade = millisiemens por centímetro ** Padrão = Água deionizada = 0,04 mS/cm.
Solução sem dialisar: teor de cinzas 76,5% e condutividade 4,5 mS/cm.



A principal vantagem dos materiais sintéticos sobre o biológico foi a maior resistência e ausência de furos quando cuidadosamente manipulados. Na Tabela 8 observa-se que algumas membranas chegaram a reduzir em 85% o teor de sais presentes, considerando que os valores encontrados para a solução de polissacarídeo, que simula o caldo de fermentação, antes da diálise foram 76,5% para o teor de cinzas e 4,5 mS / cm para o valor da condutividade.

Os resultados para materiais diferenciados como o preservativo masculino e as folhas de papel celofane não foram satisfatórios. Eles apresentaram a vantagem de serem muito resistentes durante a manipulação e comportarem um grande volume de solução a ser dialisada. Para a remoção da camada de lubrificação do preservativo foram feitas diversas lavagens com água a 80°C em ambos os lados. O material apresentou uma boa resistência, porém os resultados de diálise para a solução de goma xantana e sais inorgânicos após 72 horas não foram satisfatórios, ou seja, a membrana praticamente não permitiu a passagem dos sais, uma vez que o teor de cinzas após tratamento foi 76,4%.

A folha de celofane é um material de fácil aquisição (papelarias da cidade), baixo custo e mais adequado para grandes volumes de solução a ser dialisada, porém após 72 horas de diálise não houve variação no teor de cinzas do produto precipitado (72,5%), o que inviabilizou seu uso.



Foi selecionada para a purificação das amostras de polissacarídeo a tripa sintética I, fornecida pelo Frango Sertanejo S. A., cujo material é constituído de fibras de celulose, com diâmetro interno de 2,5 cm e usada para a fabricação de salsichas.

Foi adotada a técnica da medição da condutividade iônica da solução conforme Santos (1983), que forneceu mais um parâmetro para assegurar que os sais minerais presentes na amostra foram eliminados no processo de diálise com a vantagem de ser realizada diretamente na solução, portanto muito mais rápido do que a determinação de cinzas, uma vez que, não são necessários os processos de precipitação e secagem das amostras.

Para medir a condutividade, a solução deve ser colocada numa célula cuja constante tenha sido determinada previamente por calibração com uma solução de condutividade exatamente conhecida, por exemplo, uma solução padrão de cloreto de potássio. A célula é colocada num dos braços do circuito de uma ponte de Wheatstone, e a resistência é medida (VOGEL, 1981). Desta forma, o tempo de duração da diálise foi determinado após um acompanhamento do valor da condutividade em medidas a cada 24 horas do processo usando o polissacarídeo produzido pela bactéria 10D em fontes de carbono glicose e/ou sacarose. Foi estabelecido que, após 72 horas não houveram mudanças significativas nos valores de condutância, fixando esse período como suficiente para a diálise com a membrana (Figura 7).



Evidenciou-se também que a fonte de carbono utilizada não altera o comportamento do polissacarídeo na diálise.

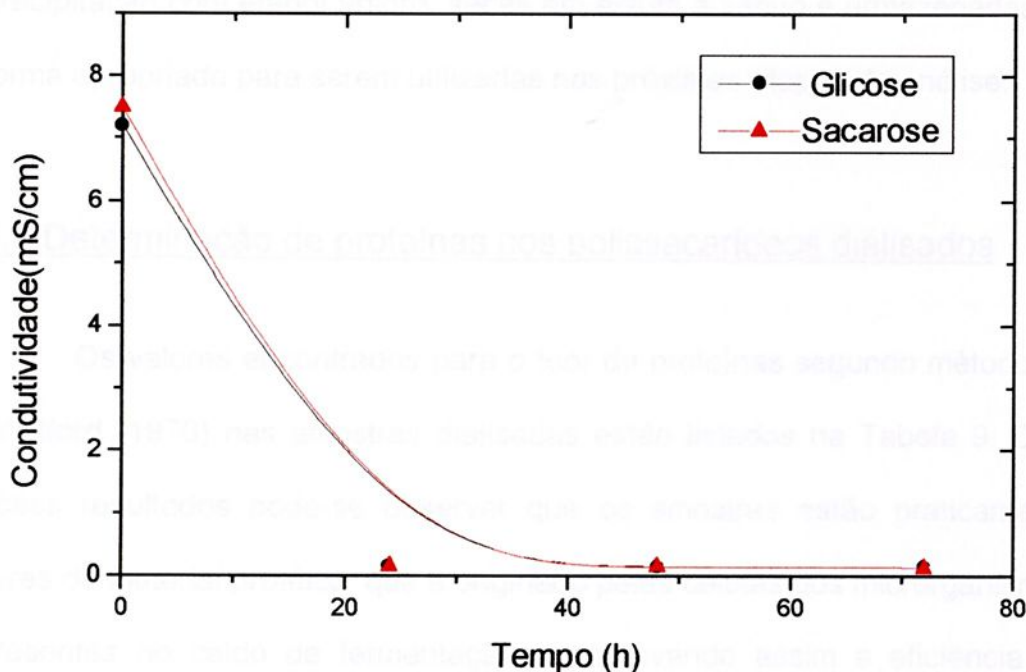


Figura 7. Relação entre a condutividade e o tempo de diálise para a determinação do tempo ideal do processo usando tripa sintética I e polissacarídeo sintetizado pela bactéria 10D com fontes de carbono glicose ou sacarose.

Na Tabela 7 pode ser observado que os valores dos resultados obtidos, em termos de condutividade, variaram de 4,5 mS/cm até 0,12 mS/cm para a tripa sintética I. Como referência foi utilizado o valor encontrado para a água deionizada (0,04 mS/cm). Portanto, essa diferença comprova a permeação dos íons da solução de dentro da membrana para a água do banho.

As amostras de polissacarídeos produzidas com as bactérias 10D e 24A foram submetidas ao processo de diálise por 72 horas, seguida pela precipitação com etanol anidro, secas em estufa a vácuo e armazenadas de forma apropriada para serem utilizadas nas próximas etapas de análise.

5.7 Determinação de proteínas nos polissacarídeos dialisados

Os valores encontrados para o teor de proteínas segundo método de Bradford (1976) nas amostras dialisadas estão listados na Tabela 9. Com esses resultados pode-se observar que as amostras estão praticamente livres de material protéico, que é originado pelas células dos microrganismos presentes no caldo de fermentação, comprovando assim a eficiência da etapa de centrifugação para a remoção das células bacterianas e a provável ausência de proteínas sintetizadas pela bactéria.

Tabela 8. Teor de proteína nos polissacarídeos dialisados em membrana alternativa por 72 horas contra água corrente.

Bactérias	Fonte de Carbono	Teor de proteínas (mg/L)
10D	Glicose	0,02
10D	Sacarose	0,03
24A	Glicose	Tr
24A	Sacarose	Tr

Tr= traços- valor abaixo do nível de detecção.

5.8 Determinação de açúcares totais nas amostras de polissacarídeos dialisados

Foi utilizada a metodologia proposta por Dubois et al. (1956) sendo as determinações feitas em escala microanalítica e em triplicata. Os valores encontrados para o teor de açúcar total nos polissacarídeos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 9. Teor de açúcares totais nas amostras purificadas de polissacarídeos dialisadas por 72 horas contra água corrente.

Bactérias	Fonte de Carbono	Teor de açúcares (%)
10D	Glicose	48,00
10D	Sacarose	25,18
24A	Glicose	51,68
24A	Sacarose	64,57

Os resultados demonstram que os polissacarídeos produzidos pela bactéria 24A apresentam maior teor de açúcar total do que os sintetizados pela bactéria 10D. Esses valores são fundamentais para a etapa seguinte (hidrólise ácida), uma vez que a massa de amostra será calculada em função do teor de açúcar presente.

5.9 Hidrólise dos polissacarídeos com ácido trifluoroacético

Foram hidrolisados 50 μg em açúcares totais de cada amostra. As condições da hidrólise foram: ácido trifluoroacético (TFA) 5 M em temperatura de 100°C por 16 horas em sistema fechado (Figura 8). Essas condições foram consideradas satisfatórias para hidrolisar totalmente qualquer ligação glicosídica entre os monômeros de açúcar presentes considerando-se o tipo de ligação entre eles, se for α ou β , sendo as ligações β mais resistentes e requerem condições mais enérgicas de hidrólise. Quando é necessário utilizar condições drásticas para garantir a quebra de ligações mais resistentes a maior dificuldade está sempre envolvida com a decomposição dos monômeros liberados (DUDMAN, 1976).

Após a hidrólise, o material foi encaminhado a uma centrífuga a vácuo para a remoção total do ácido residual (Figura 9). Essa etapa demandou várias lavagens com água deionizada até a certeza da total eliminação do ácido que poderia danificar seriamente a coluna cromatográfica e comprometer os resultados da análise.

Figura 8. Equipamento utilizado para a remoção dos resíduos de TFA após a hidrólise dos polissacarídeos.

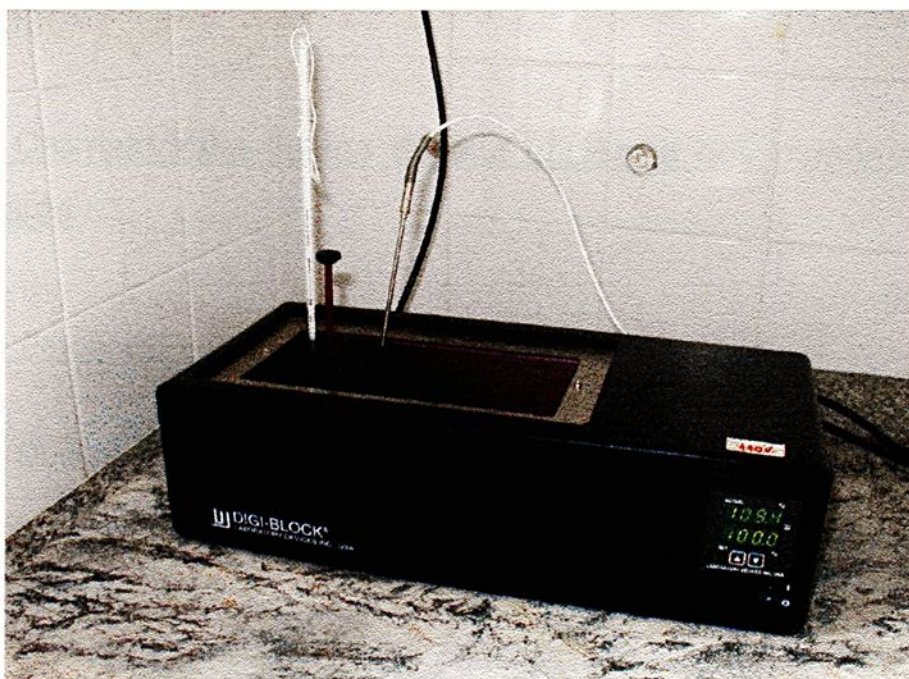


Figura 8. Equipamento utilizado para hidrólise ácida de polissacarídeo a temperatura constante de 100°C.



Figura 9. Equipamento utilizado para a remoção dos resíduos de TFA após a hidrólise do polissacarídeo.

5.10 Cromatografia líquida de alta eficiência dos monômeros de açúcares

5.10.1 Preparação do eluente para análise de carboidratos

Quando se prepara o eluente para as análises de carboidratos por cromatografia líquida, é importante usar os reagentes com alto grau de pureza.

A água deionizada utilizada foi de alta qualidade e totalmente isenta de microrganismos, pois contaminações biológicas são fontes de picos de glicose não esperados após a hidrólise e também é aconselhável o uso de vidro pyrex, evitando assim, tubos de plásticos que suportam um crescimento microbiano. A água foi desgaseificada através de um borbulhamento com gás hélio por 20 a 30 minutos (LEE & RICE, 1993).

A solução de hidróxido de sódio não deve conter contaminação com carbonato. O íon carbonato forma uma espécie bivalente em pH 12 ou maior, ligando-se fortemente a coluna e atuando como um competidor na interação do carboidrato com a resina, causando uma sensível diminuição na seletividade da coluna e perda da resolução e eficiência na análise. As lentilhas de hidróxido de sódio disponíveis no mercado são recobertas por uma fina película de carbonato de sódio e não devem ser usadas. As soluções de hidróxido de sódio 50% peso/peso apresentam teores de



carbonato bem mais baixos e as espécies presentes irão precipitar para o fundo do frasco, desta forma facilitando o descarte da mesma (DIONEX, 1993).

Outros cuidados importantes com a preparação da solução de hidróxido de sódio são em relação ao seu provável depósito de carbonato de sódio, essa solução estoque não deverá ser agitada e a pipetagem da alíquota para a diluição deve ser de forma a não perturbar o fundo do frasco e devem ser usadas pipetas de plástico, pois o borossilicato do vidro forma íons complexos com o carboidrato, o que alteraria o perfil do cromatograma (DIONEX, 1993).

É muito difícil assegurar a isenção do carbonato nas soluções preparadas, mas uma metodologia cuidadosa e sempre da mesma forma, elimina os problemas decorrentes da interferência dessa espécie. Após a preparação do eluente, ele deve ser mantido em atmosfera de gás hélio (5 a 7 psi / 34 a 48 kPa) todo o tempo (DIONEX, 1993).

5.10.2 Composição glicosídica

Nas Figuras 11 e 12 estão representados os cromatogramas das amostras de polissacarídeos hidrolisados com TFA produzidos, respectivamente, pelas bactérias 24A e 10D. Foram identificados 4 picos principais sendo eles, em ordem de eluição, o grupamento acetila, e os

monossacarídeos galactose, glicose e manose. Na amostra de polissacarídeo produzido pela bactéria 10D utilizando sacarose como fonte de carbono (Figura 12) foi detectado um componente com tempo de retenção entre o do grupo acetil e da galactose. Para sua identificação foi injetada uma mistura de padrões constituídos de açúcares neutros e aminados e o componente foi então identificado como sendo a glicosamina. A presença desse açúcar poderia estar relacionada a algum outro polímero ou metabólito produzido pela bactéria e excretado ao meio de fermentação. Estas hipóteses não devem ser descartadas, uma vez que o EPS não sofreu um procedimento de purificação.

Foi injetada também uma amostra de goma xantana grau alimentar, fornecida pela empresa CP Kelco Brasil S.A. nome comercial KELTROL F (Figura 10) que foi submetida às mesmas condições do processo de hidrólise de modo que, essa amostra também fosse uma referência para monitorar a decomposição dos monômeros de açúcar e a eficiência da hidrólise ácida. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 10. Segundo García-Ochoa et al. (2000), na composição química da goma xantana pode ocorrer uma variação na proporção entre os açúcares glicose e manose em amostras sintetizadas por diferentes gêneros de *Xanthomonas*.



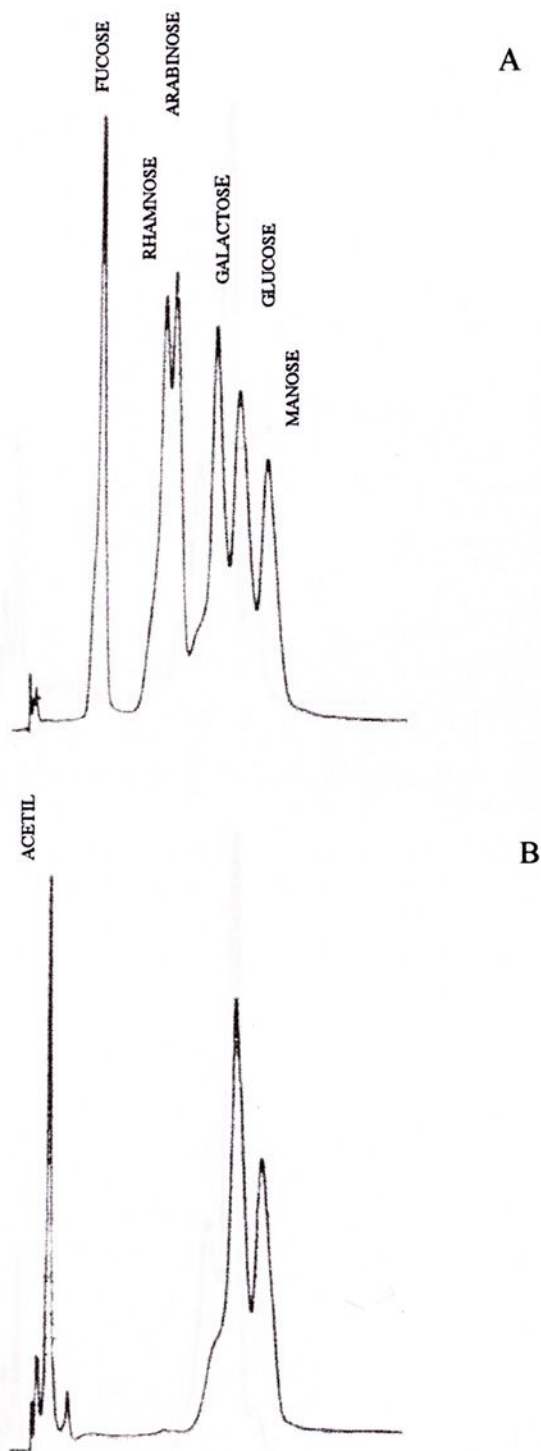


Figura 10. Cromatogramas obtidos por HPAEC-PAD usando coluna Carbo Pac 10 equipada com uma guarda coluna PA-10 e velocidade de fluxo de 1,2 mL/min. sendo os eluentes água deionizada e NaOH 200 mM. A: Cromatograma dos monossacarídeos utilizados como padrão L-fucose, L-ramnose, D-arabinose, D-manose, D-galactose e D-glicose (mistura contendo 120 μ g/mL de cada). B: Cromatograma da goma xantana grau alimentar hidrolisada nas mesmas condições das amostras de polissacarídeo.

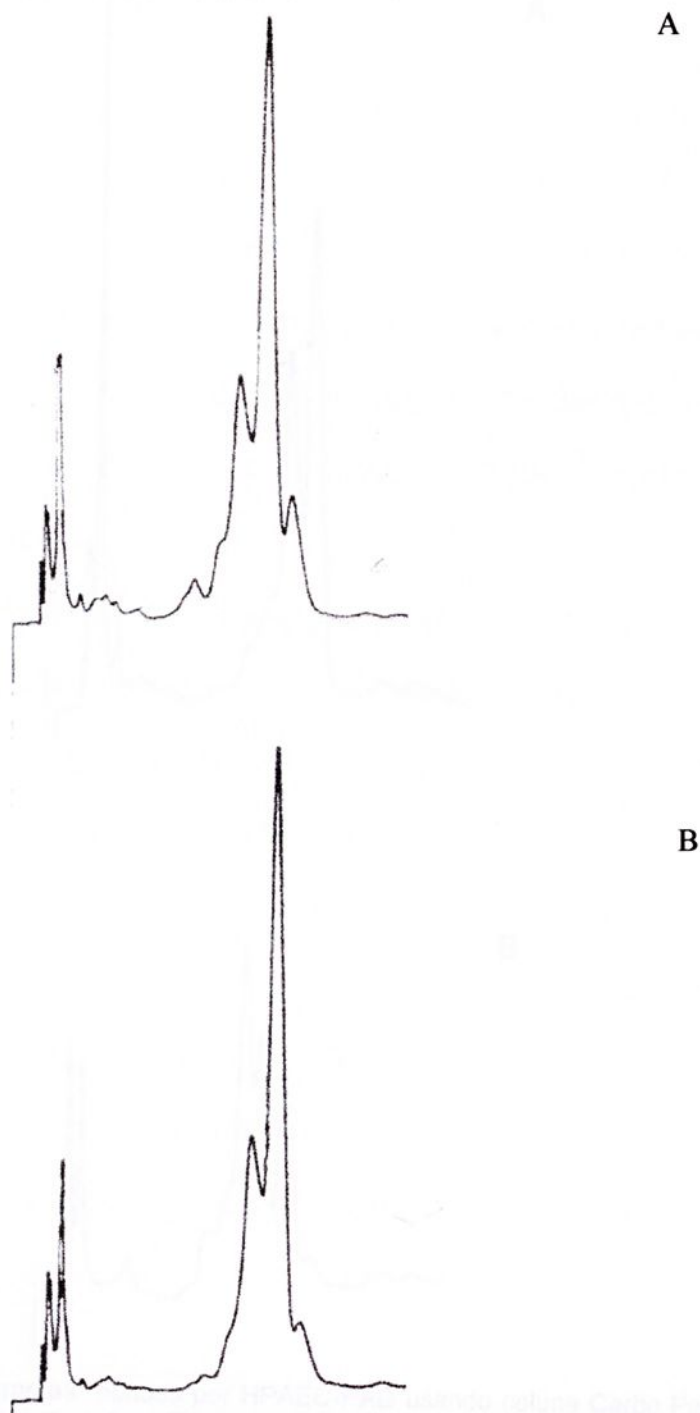


Figura 11. Cromatogramas obtidos por HPAEC-PAD usando coluna Carbo Pac 10 equipada com uma guarda coluna PA-10 e velocidade de fluxo de 1,2 mL/min. sendo os eluentes água deionizada e NaOH 200 mM. A: Cromatograma dos monossacarídeos obtidos após hidrólise com TFA do polissacarídeo produzido com a bactéria 24A e fonte de carbono glicose. B: Cromatograma dos monossacarídeos obtidos após hidrólise com TFA do polissacarídeo produzido com a bactéria 24A e fonte de carbono sacarose.

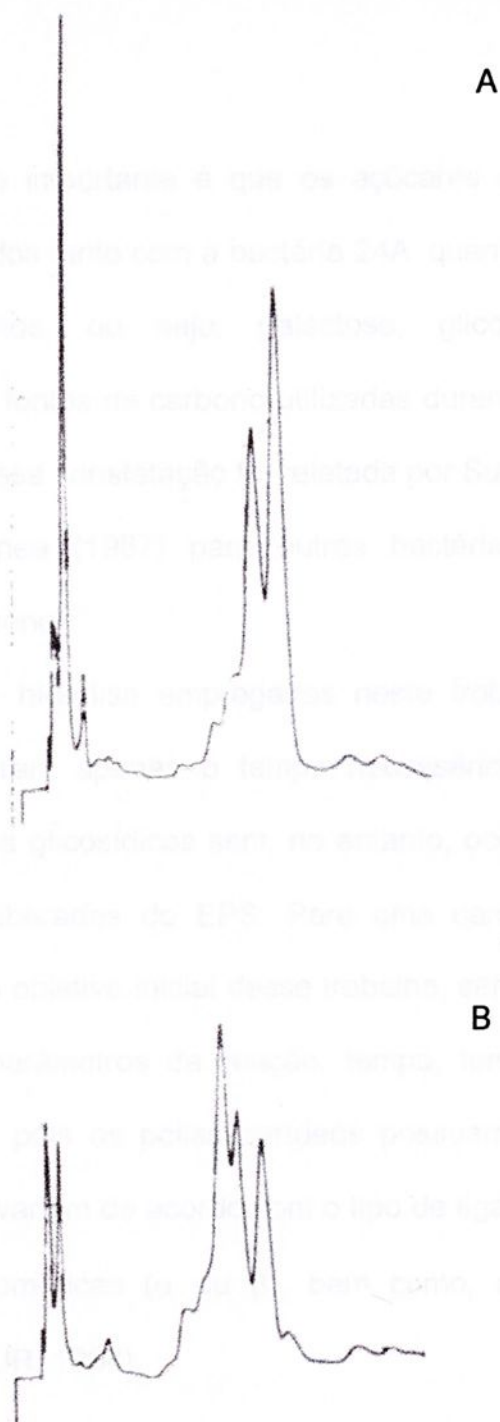


Figura 12. Cromatogramas obtidos por HPAEC-PAD usando coluna Carbo Pac 10 equipada com uma guarda coluna PA-10 e velocidade de fluxo 1,2 ml/min sendo os eluentes água deionizada e NaOH 200 m . A: Cromatograma dos monossacarídeos obtidos após hidrólise com TFA do polissacarídeo obtido com a bactéria 10D e fonte de carbono glicose. B: Cromatograma dos monossacarídeos obtidos após hidrólise com TFA do polissacarídeo obtido com a bactéria 10D e fonte de carbono sacarose.

Outra observação importante é que os açúcares constituintes dos polissacarídeos produzidos tanto com a bactéria 24A quanto com a bactéria 10D foram os mesmos, ou seja, galactose, glicose e manose, independentemente das fontes de carbono utilizadas durante a fermentação (glicose ou sacarose). Essa constatação foi relatada por Sutherland (1983) e Manresa; Espuny; Giunea (1987) para outras bactérias crescidas em diferentes fontes de carbono.

As condições de hidrólise empregadas neste trabalho (TFA 5 M, 100°C, 16h.) consideraram apenas o tempo necessário para ocorrer a quebra total das ligações glicosídicas sem, no entanto, ocorrer degradação dos monossacarídeos liberados do EPS. Para uma caracterização mais detalhada, que não foi o objetivo inicial desse trabalho, seria necessário um estudo dos seguintes parâmetros de reação: tempo, temperatura, tipo e concentração do ácido, pois os polissacarídeos possuem velocidades de hidrólise diferentes que variam de acordo com o tipo de ligação glicosídica e suas configurações anoméricas (α ou β), bem como, dos constituintes monossacarídicos (PAZUR, 1994).



Tabela 10. Composição glicosídica e proporção entre os monômeros de açúcares dos polissacarídeos bacterianos hidrolisados com TFA 5 M em temperatura de 100°C por 16 horas.

Polissacarídeo	Fonte de carbono	Glicose (%)	Manose (%)	Galactose (%)	Proporção
Goma xantana	-	31,2	19,6	-	1,6: 1,0
Bactéria 24A	Sacarose	40,2	4,6	14,4	8,8: 1,0: 3,0
Bactéria 24A	Glicose	44,2	11,6	17,4	3,8: 1,0: 1,5
Bactéria 10D	Sacarose	12,6	21,6	22,2	1,0: 1,7: 1,8
Bactéria 10D	Glicose	18,8	29,6	3,4	5,5: 8,7: 1,0

Dudman (1976) fez um levantamento da composição dos polissacarídeos extracelulares produzidos por diferentes espécies de *Rhizobium* e encontrou galactose, glicose e manose como açúcares constituintes nas mais diversas proporções entre eles, variando em função da linhagem selecionada. Observou também a ausência do grupamento piruvato e confirmou a presença do grupamento acetila com teores de 4,0-8,0%. Os resultados obtidos por cromatografia para a determinação da composição monossacarídica da bactéria 24A coincidiram com aqueles encontrados por Dudman (1976) e também foi constatada a ausência do grupamento piruvato em todas as espécies pesquisadas. A cromatografia de íons permitiu detectar acetila em todas as amostras analisadas porém esses grupamentos não puderam ser quantificados, visto que, as condições de hidrólise realizada foram para açúcares neutros. Os valores encontrados

para o teor de acetila nas amostras analisadas foram determinados por análise volumétrica e se encontram na Tabela 6. Outra informação importante é que Faria (2002) identificou a bactéria 24A através de técnicas bioquímicas e de biologia molecular e relatou que essa bactéria possuía 84% de semelhança com o gênero *Rhizobium sp* e isto pode ser confirmado pelos valores experimentais encontrados na composição dos açúcares constituintes e presença do grupo acetila na molécula do exopolissacarídeo.

Em relação ao polissacarídeo sintetizado pela bactéria 10D, que foi identificada por Queiroz (2001) através de testes bioquímicos como tendo 93% de semelhança com o gênero *Pseudomonas*, não foram encontrados na literatura valores para a composição e proporção dos açúcares constituintes, portanto não pode ser feita uma comparação com o EPS produzido por este gênero bacteriano. Entretanto, devido a grande similaridade com os valores encontrados para a bactéria 24A na composição monossacarídica; na ausência de piruvato e presença de acetila, pode-se sugerir uma caracterização mais detalhada da bactéria 10D por técnicas de biologia molecular para verificar se ela também pertence ao gênero *Rhizobium sp*.



6. Conclusões

O aumento da escala de produção de 50 para 250 mL de meio de cultura não proporcionou resultados satisfatórios em relação a massa de polissacarídeo sintetizado pelas bactérias 10D e 24A.

A produção e recuperação com etanol dos polissacarídeos obtidos por diferentes fontes de carbono (glicose e/ou sacarose) não apresentaram diferenças significativas.

A diálise em membranas alternativas mostrou ser uma técnica eficiente e barata para a remoção do teor de sais minerais presentes nas amostras de polissacarídeos.

A medida da condutividade iônica revelou-se uma técnica rápida, prática e eficiente para o acompanhamento do processo de diálise.

Os polissacarídeos produzidos pelas bactérias 10D e 24A com as duas fontes de carbono (glicose e sacarose) não apresentaram valores detectáveis do grupamento piruvato.



O teor de acetila nos polissacarídeos sintetizados pelas bactérias 10D e 24A com glicose como fonte de carbono apresentou maiores valores do que com sacarose para as duas bactérias estudadas.

A composição monossacarídica (galactose, glicose e manose) foi semelhante nos dois polissacarídeos produzidos pelas bactérias 10D e 24A, mesmo utilizando diferentes fontes de carbono (glicose e/ou sacarose).

Os teores de acetila e piruvato, bem como a composição monossacarídica do polissacarídeo produzido pela bactéria 24A, identificada como *Rhizobium*, apresentaram resultados semelhantes aos encontrados na literatura para este gênero.

Os teores de acetila e piruvato, bem como a composição monossacarídica do polissacarídeo produzido pela bactéria 10D apresentaram resultados semelhantes aos encontrados na literatura para o gênero *Rhizobium*.

7. Referências

BANCAL, P.; GAUDILLÈRE, J. P. Oligofructan separation and quantification by high performance liquid chromatography. Application to *Asparagus officinalis* and *Triticum aestivum*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 27, n. 5, p. 745-750, 1989.

KRIEG, R. (Ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology. **R. KRIEG Ed.**, Baltimore, Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

BORZANI, W. Cinética de processo fermentativo. In: BORZANI, W.; LIMA, U.A. ; AQUARONE, E. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1986. p. 165-184.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRUNELLO, G; CONCONE, B. R. V. Agitação e aeração em fermentadores. In: BORZANI, W.; LIMA, U. A. ; AQUARONE, E. **Engenharia bioquímica**. São Paulo, Ed. Edgard Blucher, 1986, p. 137-167.

BUENO, S. M. **Isolamento e caracterização de bactérias selvagens produtoras de polissacarídeos obtidas de amostras de solo da estação ecológica de São José do Rio Preto-SP**, 2001. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Instituto de



Biociências, Letras e Ciências Exatas Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

BUENO, S. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. **Journal of Food Engineering**, v. 50, p. 41-46, 2001.

CADMUS, M. C.; BURTON, K. A.; SLODKI, M. E. Growth-related substituent changes in exopolysaccharide of fast-growing *Rhizobia*. **Applied and Environmental Microbiology** v. 44, p. 242-245, 1982.

CASTRO, A. F. P. Curva de crescimento bacteriano e noções sobre bacteriologia quantitativa. Campinas: UNICAMP, 1993. 25 p. Apostila de TC1,

CERNING, C. J.; DESMAZEAUD, M. J.; BOUILLANNE, L. M. Isolation and characterization of exocellular polysaccharide. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 625-628, 1986.

CHAPLIN, M. F.; KENNEDY J. F. **Carbohydrate analysis**: A practical approach, 2 nd ed., 1994, chap. 4, p.125-159.

CHRISTENSEN, B. E.; KJOSBAKKEN, J.; SMIDSRØD, O. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. Strain NCMB 2021. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 837-845, 1985.



CLARKE, M. A. Sugars and sugars products. In: Sugar Processing Reserch Institute. Inc. AOAC Official Methods of Analysis, cap. 44 2-3, v. 2- part II, 16° ed. 1995.

CONGREGADO, F.; ESTAÑOL, I.; ESPUNY, M. J.; FUSTÉ, M. C.; MANRESA, M. A.; MARQUES, A. M.; GUINÉA, J. ; SIMON-PUJOL, M. D. Preliminary studies on the production and composition of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp EPS-5029. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 883-888, 1985.

COTTRELL, I. W. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides. In: SANDERFORD, P. A. ; MATSUDA, K. (Ed.) Washington: American Chemical Society, 1979. p. 251-270.

COTTRELL, I. W.; KANG, K. S.; KOVACS, P. Xanthan gum. In: **Handbook of water-soluble gums and resins**. New York : Mc Graw Hill 1980. p. 24.

DAZZO, F. B.; BRILL, W. J. Bacterial polysaccharide which binds *Rhizobium trifolli* to clover root hairs. **Journal of Bacteriology**, p. 1362-1373, 1979.

DIONEX. Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD). s. l.; s. n., 1993. Technical Note 20.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars. **Analitical Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 350-356, 1956.



DUDMAN, W. F. The extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*: Composition Studies. **Carbohydrate Research**, v. 46, p. 97-110, 1976.

EVANS, C. G. T.; YEO, R. G.; ELLWOOD, D. C. Continuous culture studies on the production of extracellular polysaccharides by *Xanthomonas juglandis*. In: **Microbial polysaccharides and polysaccharases**. London: Academic Press., 1978. cap. 2.

FARIA, L. H. G. B.; GARCIA-CRUZ, C. H. Influência da taxa de nitrogênio/carbono durante a produção de polissacarídeos por uma bactéria isolada do solo. CD do I Congresso da Sociedade Brasileira de Biotecnologia, p. 7, 2001.

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo**. 2002. 162 f Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

GALINDO E.; ALBITER, V. High-yield recovery of xanthan by precipitation with isopropyl alcohol in a stirred tank. **Biotechnology Progress**, v. 12, p. 540-547, 1996.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J. A.; MOHEDANO A. F. Precipitation of xanthan gum. **Sep Science Technology**, v. 28, p. 1303-1313, 1993.



GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

GONZALES, R.; JOHNS, M. R.; GREENFIELD, P. F.; PACE, G. W. Xanthan Gum Precipitation Using Ethanol. **Process Biochemistry**, v. 24, n. 6, p. 200-203, 1989.

HENGLEIN, F. A. Pektine. In: PALCH K.; TRACEY, M. V. (Ed.) *Moderne methoden der pflanzenanalyse*. Berlim: Springer, 1955. vol. 2, p. 226-274.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo, 1985. v. 1, p. 27.

JEANES, A. R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. Polysaccharides (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL-B- 1459: Procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. In: **ARS-NC-51 Agriculture Research Service**, U. S. Department of Agriculture, Washington, 1976.

KANEKO, T.; KANG, K. S. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species - taxonomical studies. **Annual Meeting of the American Society for Microbiology**, Washington, American Chemical Society, 1977. p. 220-230.

KANG, K. S.; McNEELY, W. Patent U.S. 3 960 832. 1977.



KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKD, T.; COTTRELL, I. W. PS-60-agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1086-1091, 1982.

KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; COTTRELL, I. W. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. **Progress in Microbiology**, v. 18, p. 231-257, 1983.

KENNEDY, J. F.; RADSHAW, I. J. Production, properties and applications of xanthan. **Progress Industries Microbiology**, v. 19, p. 319-371, 1984.

LEE, Y. C.; RICE, K. G. Fractionation of glycobiology In: **The practical approach series**. Oxford: Oxford University Press, 1993. p. 127-163.

LO, Y. M.; YANG, S. T.; MIN, D. B. Ultrafiltration broth: process and economic analyses. **Journal Food Engineering**, v. 31, p. 219-236, 1997.

LOPEZ, R.; BACKING, J. H. Polysaccharide production by *Beijerinckia* and *Azotobacter*. **Microbiologia Española**, v. 21, p. 53-75, 1968.

MALDONADE, I. R. **Contribuição ao estudo dos parâmetros de fermentação por *Beijerinckia sp.*** 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.



MANRESA, A.; ESPUNY, M. J.; GUINEA, J. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas sp* GPS-910. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 347-351, 1987.

MARQUES, A. M.; ESTANOL, I.; ALSINA, J. M.; FUSTÉ, C.; SIMON-PUJOL, D.; GUINEA, J. ; CONGREGADO, F. Production and rheological properties of extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas sp* strain EPS-5028. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p.1221-1223, 1986.

MAYNARD, J. A. **Physical, chemical and instrumental methods in food analysis**, 2 nd. ed., California: Academic Press, 1970. p. 583-586.

Mc COMB, E. A.; Mc CREADY, R. M. Determination of acetil in pectin and acetylated carbohydrate polymers. **Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 819-821, 1957.

MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y.; VLACH, D. Fermentation of cellulosic materials to mycoprotein foods. **Biotechnology Advances**, v. 11, n. 11, p. 469-479, 1993.

NISHINARI, K.; DOI, E. **Food hydrocolloids**. New York: Plenum Press, 1993. 510 p.

PAZUR, J. Neutral polysaccharides. In: Chaplin, M. F. ; Kennedy, J. F. (Ed.) **Carbohydrate analysis: A practical approach**. 2 ed. M. F. Chaplin ; 1994. cap. 4, p. 125-159.



PELCZAR, M.; REID, R.; CHAIN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil. 1996, p. 1072. v. 2.

PSZCZOLA, D. E. Gellan Gum Wins IFT's Food Technology Industrial Achievement Award. **Food Technology**. v. 47, n. 9, p. 94-96, 1993.

QUEIROZ, G. M. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polissacarídeos obtidas de amostras da rizosfera de plantas**. 2001, 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

RASSI, Z. E. Recent progress in reversed-phase and hydrophobic chromatography of carbohydrate species. **Journal of Chromatography A**, v. 720, p. 93-119, 1996.

READ, R. R.; CONSTERTON, J. W. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Canadian Journal Microbiology**. v.33, p. 1080-1090, 1987.

REED, G. Microbial biomass. Single cell protein and other microbial products. In: REED, G. **Prescott & dunn's industrial microbiology**. Westport: AVI, 1983. p. 543-557.

ROBERTSEN, B. K.; AMAN, P.; DARVILL, A. G.; MCNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. Host-Symbiont Interactions. The Structure of Acidic Extracellular Polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. **Plant Physiology** v. 67, p. 389-400, 1981.



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**, v. 207, p. 176-185, 1992.

SANDERSON, G. R. Gellan gum. **Applied Science**, v. 479, p. 201-232, 1990.

SANDERSON, G. R.; CLARK, R. C. Laboratory produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing and texturizing agent. **Food Technology**, v. 37, n. 4, p. 63-70, 1983.

SANDFORD, P. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; WATSON, P. R.; CADMUS, M. C.; JEANS, A. Variations in *Xanthomonas campestris* NRRL-1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: SANDFORD, P. A. ; LASKINS, A. **Extracellular microbial polysaccharides**. Washington, American Chemical Society, 1977. p. 192-210.

SANDFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. **Advances In Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 36, p. 292-296, 1979.

SANDFORD, P. A. Potencial important microbial gums. In: GLICKSMAN, M. **Food hydrocolloids**. Boca Raton: C.R.C. Press, 1982. v.1, p. 168-199.



SANDFORD, P. A.; COTTRELL, W. I.; PETTITT, D. J. Microbial polysaccharides: new products and their commercial applications. **Pure and Applied Chemistry**, v. 56, n.7, p. 879-892, 1984.

SANTOS, D. F. F. **Tecnologia de tratamento de água:- água para a indústria**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1983.

SCAMPARINI, A.; MARIUZZO, D.; FUJIHARA, H.; JACOBUSI, R.; VENDRUSCOLO, C. Structural studies of CV-70 polysaccharide. **Internal Journal Biologic Macromolecule**, v. 21, p. 115-121, 1997.

SLONEKER, J. H.; ORENTAS, D. G. Piruvic acid, a unique component of exocellular bacterial polysaccharide. **Nature**, v. 194, p. 478-479, 1962.

SMITH, J. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 32, p. 119-129, 1982.

SOMME, R. Chemical Analysis of Exocellular, Acid Polysaccharides from seven *Rhizobium* Strains. **Carbohydrate Research**, v. 33, p. 89-96, 1974.

SOUW, P.; DEMAINE, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459 **Applied Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1186, 1979.

SOUW, P.; DEMAINE, A. L. Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Journal Fermentation Technology**, v. 58, p. 411-416, 1980.

STEFANSSON, M.; WESTERLUND, D. Ligant-exchange chromatography of carbohydrates and glycoconjugates. **Journal of Chromatography A**, v. 720, p. 127-136, 1996.

STREDANSKY, M; CONTI, E.; NAVARINI, L.; BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 11-16, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, v. 23, p. 79-150, 1982.

SUTHERLAND, I. W. Extracellular polysaccharide In : DELLWEY, H. **Biotechnology** Weinhein, Verlag Chemie, p. 553-574, 1983. v. 3.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**. v. 38, n. 4, p. 319-328, 1999.

VANDAME, E. J.; BRUGGEMAN, G.; BAETS, S.; HOOREN, P. T. Useful polymers of microbial origins. **Agro Food Industry Hi-Tech.**, v. 7, n. 5, p. 21-51, 1996.

VENDRUSCOLO, C. T. **Produção de biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo cultivado com cana de açúcar no estado de São Paulo, Brasil.** 1995. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1995.

VOGEL, A. I. **Análise inorgânica quantitativa.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1981. p. 454-455.



WEI, Y.; FANG, J. Studies on the chromatographic behavior of some uronic acids and neutral sugars on amino-bonded phase column. **Journal of Chromatography**, v. 513, p. 227-235, 1990.

WELLS, J. A critical overview. In: SANDFORD, P. A. ; LASKING, A. **Extracellular microbial polysaccharides**. Washington: American Chemical Society, 1977. p. 299-325.

WILKINSON, J. F. The extracellular polysaccharide of bacteria. **Bacteriological Review**, v. 22, p. 46-73, 1958.

WIRTH, F. Embutido escaldado. Fijación de água, fijación de grasa, formación de la estructura. **Fleischwirtschaft** (Español) v. 2, p. 4-14, 1985.



