



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL**

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE PRODUÇÃO DO
BIOPOLÍMERO DA BACTÉRIA *Beijerinckia* sp. 7070 VIA
ENZIMÁTICA**

ÂNGELA NUNES MOREIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a Dr^a Claire Tondo Vendruscolo e co-orientação do Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Área de Concentração em Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Março de 2002



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE PRODUÇÃO DO
BIOPOLÍMERO DA BACTÉRIA *Beijerinckia* sp. 7070 VIA
ENZIMÁTICA**

ÂNGELA NUNES MOREIRA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas,
sob a orientação da Prof^a Dr^a
Claire Tondo Vendruscolo e co-
orientação do Prof. Dr.
Francisco Augusto Burkert Del
Pino, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia

Agroindustrial, Área de
Concentração em Biotecnologia,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Março de 2002

ÂNGELA NUNES MOREIRA

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE PRODUÇÃO DO
BIOPOLÍMERO DA BACTÉRIA *Beijerinckia* sp. 7070 VIA
ENZIMÁTICA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas,
sob a orientação da Prof^a Dr^a
Claire Tondo Vendruscolo e co-
orientação do Prof. Dr.
Francisco Augusto Burket Del
Pino, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia
Agroindustrial, Área de
Concentração em Biotecnologia,
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

APROVADA: 27 de março de 2002.

Prof^a Dr^a Leonor Almeida de Souza-Soares

Prof^a Dr^a Lúgia Furlan

Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino

Prof^a Dr^a Claire Tondo Vendruscolo
(Orientadora)

Dedico este trabalho, com amor,

A Deus

Aos meus pais

A meus irmãos e sobrinhos

A meu amor Fabricio

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado essa vida maravilhosa e essa oportunidade.

Aos meus pais, Francisco de Paula Moreira e Vera Maria Nunes Moreira, pelo amor, carinho e dedicação de sempre, especialmente nesses dois anos tão importantes.

A meus irmãos, Ciça, Luiz e Andréia, e sobrinhos, Paula e Júnior, pela amizade e carinho.

A meu amor, Fabricio Rochedo Conceição, que mesmo antes de ser o amor da minha vida contribuiu e me apoiou, com carinho e dedicação, nesse trabalho.

Aos meus orientadores, Dr^a Claire Tondo Vendruscolo e Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino pela orientação e amizade.

Ao Dr. José Antonio Guimarães Aleixo, pelo valioso apoio, amizade e ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação e pela amizade, em especial aos professores Vladimir e Celso, ao secretário e amigo Fábio, e aos colegas Alejandro, Márcia e Leandro.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia, que estiveram presentes em todos os momentos e que sempre me apoiaram, e em especial a Kelly, Bilica, Charly, Murilo, Otávio, Patrícia, Kika, Adriana, Carioca, André, Marcelo, Miltinho, Robledo, Mariana e Bete, pela amizade, carinho, incentivo e auxílio.

Aos colegas e amigos Angelita, Bilica, Fabricio, Eliezer, Felipe, Joana, Dejalma, Franciela e Caroline; aos professores José Beiro Carvalhal, Gladis Aver Ribeiro, Carlos Gil Turnes, Odir Dellagostin e Albino Magalhães, e a funcionária e amiga Alegani Monteiro pela colaboração nos experimentos.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Nutrição e de Pós-Graduação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

INDICE

SUMÁRIO.....	ix
SUMMARY	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 Produção de biopolímeros microbianos.....	1
Vias biossintéticas de produção de biopolímeros	
microbianos e produção via enzimática.....	3
1.3 Composição química dos biopolímeros microbianos.....	12
1.4 Propriedades reológicas dos biopolímeros microbianos.....	15
Hipóteses.....	18
Objetivos.....	19
2. CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PRODUZIDOS POR	
<i>Beijerinckia</i> sp. 7070 EM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO.....	20
RESUMO.....	20
SUMMARY.....	21
2.1– INTRODUÇÃO.....	21
2.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.2.1 – Microrganismo.....	23
2.2.2 – Meios e condições de incubação.....	23
2.2.3 – Recuperação dos polímeros microbianos.....	24
2.2.4 – Produção de biopolímero microbiano.....	24
2.2.5 – Produtividade.....	24
2.2.6 – Viscosidade.....	24
2.2.7 – Análise estatística.....	25
2.2.8 – Análise cromatográfica.....	25

2.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
2.3.1 – Produção de biopolímero microbiano.....	25
2.3.2 – Produtividade	27
2.3.3 – Viscosidade	28
2.3.4 – Análise cromatográfica.....	32
2.4 – CONCLUSÕES.....	35
2.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

3. ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS VIA ENZIMÁTICA ATRAVÉS DE INATIVAÇÃO E LISE CELULAR E COM CÉLULAS VIÁVEIS DE *Beijerinckia* sp. 7070.....38

RESUMO.....	38
SUMMARY.....	39
3.1 – INTRODUÇÃO.....	39
3.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.2.1 – Microrganismo e caracterização morfo-fisiológica e bioquímica.....	42
3.2.2 – Antibiograma.....	42
3.2.3 – Determinação da CIM pela Técnica da Diluição em Tubos.....	43
3.2.4 – Produção e produtividade de biopolímeros microbianos utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas.....	43
3.2.5 – Análise estatística.....	44
3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.3.1 – Caracterização morfo-fisiológica e bioquímica da <i>Beijerinckia</i> sp. 7070.....	45
3.3.2 – Antibiograma	46
3.3.3 – Concentração inibitória mínima (CIM).....	46
3.3.4 – Produção e produtividade de biopolímeros microbianos utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas.....	47
3.4 – CONCLUSÕES.....	51
3.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

4. COMPORTAMENTO REOLÓGICO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO BIOBOLÍMERO CLAIRANA® PRODUZIDO VIA ENZIMÁTICA ATRAVÉS DE INATIVAÇÃO E LISE CELULAR E PRODUZIDO COM CÉLULAS VIÁVEIS DE <i>Beijerinckia</i> sp. 7070.....	55
RESUMO.....	55
SUMMARY.....	56
4.1 – INTRODUÇÃO.....	56
4.2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.2.1 – Microrganismo.....	59
4.2.2 – Produção de biopolímeros microbianos utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas.....	59
4.2.3 – Composição química dos biopolímeros microbianos produzidos utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas..	60
4.2.4 – Comportamento reológico das soluções de biopolímeros das amostras produzidas utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas.....	60
4.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.3.1 – Composição química provável dos biopolímeros microbianos produzidos utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas..	61
4.3.2 – Comportamento reológico das soluções de biopolímeros das amostras produzidas utilizando-se células viáveis inativadas e lisadas.....	63
4.4 – CONCLUSÕES.....	73
4.5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
5. CONCLUSÕES GERAIS.....	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

SUMÁRIO

MOREIRA, ÂNGELA NUNES. M.S., Universidade Federal de Pelotas, março de 2002.
Estudo da viabilidade de produção do biopolímero da bactéria *Beijerinckia* sp. 7070 via enzimática. Professora Orientadora: Claire Tondo Vendruscolo. Co-orientador: Francisco Augusto Burkert Del Pino.

Biopolímeros são polissacarídeos microbianos usados como agentes espessantes, gelificantes e de suspensão. *Beijerinckia* sp. 7070 produz o biopolímero denominado clairana®. Os biopolímeros microbianos podem ser produzidos utilizando enzimas purificadas (via enzimática). Os objetivos desse trabalho foram: caracterizar o biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de fermentação; avaliar a possibilidade de produzir esse polímero utilizando enzimas purificadas; verificar se a síntese e as enzimas envolvidas na síntese são intra e/ou extracelulares e se permanecem ativas no meio; e estudar a produção, a provável composição química e o comportamento reológico do biopolímero produzido utilizando somente as enzimas (sem a ação da bactéria), através de inativação e lise celular, e do biopolímero produzido com células viáveis. Para caracterizar a produção em diferentes tempos de fermentação, as amostras foram cultivadas com a bactéria em meio líquido. Os polímeros foram recuperados, secos e pesados para determinar a produção e produtividade; foram então solubilizados em água a 1%, para determinar a viscosidade e hidrolisados, para determinação da composição química. Para produção utilizando somente enzimas, amostras foram cultivadas com a bactéria, em meio líquido, e submetidas à morte celular por inativação e lise celular em 30 e 46 h. Os polímeros dessas amostras e de amostras produzidas com células viáveis foram recuperados, em

diferentes períodos, secos e pesados para determinar as produções; hidrolisados, para determinar as prováveis composições químicas e solubilizados a 6%, para avaliar o comportamento reológico. Na caracterização dos polímeros em diferentes tempos, as maiores produções totais de biopolímeros encontradas foram em 30 e 72 h, a maior produtividade em 48 h e a maior viscosidade foi apresentada pelo polímero em 72 h. Todos os polímeros apresentaram mesma composição química, mas com proporções diferentes. Os resultados da produção utilizando somente enzimas sugerem que é possível produzir o biopolímero clairana® via enzimática. Sugerem ainda que enzimas intra e extracelulares estão envolvidas, permanecem ativas no meio e começam a atuar antes de 30 h de fermentação e que o processo através de lise é mais eficiente do que através de inativação. Com relação à provável composição química, todas amostras apresentaram os mesmos componentes em proporções diferentes e, em relação ao comportamento reológico, as maiores viscosidades encontradas, em geral, foram dos biopolímeros produzidos com células lisadas, sendo a maior do biopolímero produzido com células lisadas em 46 h retirado em 54 h.

Palavras-chave: biopolímero microbiano, enzimas, síntese, produção, comportamento reológico, composição química.

SUMMARY

MOREIRA, ÂNGELA NUNES. M.S., Universidade Federal de Pelotas, March 2002.
Study on the viability of *Beijerinckia* sp. 7070 bacteria biopolymer production by enzymatic way. Adviser: Claire Tondo Vendruscolo. Comit e: Francisco Augusto Burkert Del Pino.

Biopolymers are microbial polysaccharides used as thickening, gelling and suspending agents. *Beijerinckia* sp. 7070 produces the biopolymer denominated as clairana®. The microbial biopolymers can be produced using purified enzymes (by enzymatic way). The aims of this work were to characterize the biopolymer produced by *Beijerinckia* sp. 7070 at different fermentation times; to evaluate the possibility to produce this polymer using purified enzymes; to verify if synthesis and the enzymes involved in the synthesis are intra and/or extracellular and if the enzymes remain active in the medium; and to study production, probable chemical composition and rheological behaviour of the biopolymer produced using enzymes only (without bacteria action), through cellular inactivation and lyses, and of the biopolymer produced through viable cells. In order to characterize the production at different fermentation times, the samples were cultivated with bacteria in liquid medium. The polymers were recovered, dried and weighed to determine the production and productivity; they then were solubilized in water at 1%, to determine the viscosity and hydrolyzed, for determination of the chemical composition. For production using enzymes only, samples were cultivated with the bacteria, in liquid medium, and subjected to cellular death through cellular inactivation and lyses after 30 and 46 h. The polymers of these samples and the samples produced with viable cells were recovered, at different times, dried and weighed to determine the productions; hydrolyzed, to determine the probable chemical compositions and solubilized in water

at 6%, to evaluate the reological behaviour. In the characterization of the polymers at different times, the highest total biopolymer productions found were in 30 and 72 h, the highest productivity was in 48 h and the highest viscosity was presented by the polymer in 72 h. All polymers showed the same chemical composition, but with different proportions. The results of the production using enzymes only suggest that it is possible to produce the clairana® biopolymer by enzymatic way. It suggests yet that intra and extracellular enzymes are involved, they remain active in the medium and begin to act before 30 h of fermentation and the process through cellular lyses is more effective than through cellular inactivation. With regarding to the chemical composition, all samples presented the same components at different proportions and, regarding the reological behaviour, the highest viscosity found, in general, were of the biopolymers produced with lysed cells being the highest of the biopolymer produced with lysed cells in 46 h removed in 54 h.

Keywords: microbial biopolymer, enzymes, synthesis, production, reological behaviour, chemical composition.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Produção de Biopolímeros

Polissacarídeos microbianos, conhecidos por biopolímeros, são produzidos por quase todos os microrganismos. Esses microrganismos têm a capacidade de crescer em culturas puras e em fermentações em larga escala (Scamparini *et al.*, 1997). A produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) é muito comum em muitos gêneros de bactérias. Esses EPS podem formar uma cápsula ao redor da célula ou podem ser excretados para o meio ambiente como um muco (Coplin & Cook, 1990). Microrganismos produtores de EPS ocorrem amplamente na natureza em diferentes tipos de habitat. Tipicamente, podem ser encontrados no solo, em água fresca, na água do mar, em material de plantas infectadas ou em alimentos armazenados (Kang & McNelly, 1977). Como as bactérias fitopatogênicas precisam crescer ou sobreviver no solo, em folhas ou raízes de plantas para completar seu ciclo de vida, a proteção contra o meio ambiente hostil seria um motivo para estas produzirem EPS (Coplin & Cook, 1990). Espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, geralmente, também são produtoras de EPS. Embora essas bactérias usem nitrogênio atmosférico como fonte de nitrogênio, é indispensável o uso de fonte de carbono na forma de carboidratos como glicose, sacarose ou manitol (Sutherland, 1982).

As bactérias do gênero *Beijerinckia* spp., que são fixadoras de nitrogênio, são bastonetes Gram-negativos estritamente aeróbios e possuem a capacidade de produzir biopolímeros com diferentes composições, dependendo da espécie. A cepa 7070 foi isolada do solo canavieiro do município de Ribeirão Preto-SP por Vendruscolo (1995). A viabilidade industrial do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 foi demonstrada através das respostas de rendimento, comportamento reológico, estabilidade ao pH, temperatura e tempo de produção. Esse polímero possui fortes características

pseudoplásticas e altas viscosidades com baixas taxas de deformação. Isso confere ao polímero excelentes características organolépticas e de suspensão (Vendruscolo, 1995).

Curvas de crescimento de *Beijerinckia* spp. e *Azotobacter* spp. mostraram que a produção de polissacarídeos ocorre no começo da fase de crescimento. Quando a glicose torna-se limitante, o polissacarídeo é conseqüentemente consumido pelas células. Isso sugere que esses polissacarídeos são materiais de reserva verdadeiros (López & Backing, 1968).

O monoesterato glicerol e a carboximetilcelulose são emulsificantes que, apesar de serem muito utilizados na indústria de alimentos, estão perdendo gradualmente seu campo, devido à pressão dos consumidores em substituir o uso de aditivos artificiais ou quimicamente sintetizados em alimentos por aditivos naturais. Emulsificantes de alimentos produzidos através de fermentação, além de apresentarem natureza biodegradável, ainda apresentam vantagens como: eficiência na produção a uma ampla margem de temperatura, pH e salinidade, e em condições limitantes, como baixa temperatura e pressão (Shepherd et al., 1995)

Os polissacarídeos hidrocolóides obtidos a partir de plantas, usados tradicionalmente em alimentos e processamentos de alimentos, também estão sendo substituídos por biopolímeros, pois esses apresentam vantagens como: (1) performance com sucesso por suas propriedades distintas, (2) reprodutibilidade e estabilidade das suas propriedades físico-químicas (3) adaptação geral para ingestão sem efeitos adversos, pois seus constituintes e suas ligações glicosídicas permitem boa digestão e metabolismo, (4) custo estável e relativamente baixo, por esses serem extracelulares e pela produção com bons rendimentos a partir de substratos de baixo custo, e (5) substituição de gomas de plantas naturais por biopolímeros, pois estes não necessitam de aquecimento para formação do gel (Jeanes, 1774; Pace, 1980; Becker et al. 1998).

Estudos estão sendo desenvolvidos para otimizar o processo de produção, como pesquisas de modificação na composição de meios, no pH, temperatura, agitação e tempo de fermentação, visando a obtenção de um biopolímero com potencial aplicação industrial e alta produtividade. No entanto,

para a produção industrial, é de extrema importância o desenvolvimento de processos econômicos, como redução de meios de cultura e tempo de fermentação (Maldonado, 1996). Os polissacarídeos mais usados em produção industrial são a dextrana, que é uma glicana neutra, e a xantana, um heteropolissacarídeo polianiônico (Jeanes, 1974).

Na produção convencional de biopolímeros em meio líquido, o microrganismo é cultivado em meio contendo fonte de carbono e sais minerais. A produção pode ser também através da utilização de enzimas purificadas (via enzimática), sem a ação da bactéria. O processo de produção via enzimática é utilizado, por exemplo, na produção de dextrana, que é um homopolissacarídeo do qual são conhecidas a via metabólica e a enzima indutora do processo.

O estudo da produção de biopolímeros via enzimática é importante, pois além de diminuir os riscos de contaminação, reduz os custos industriais do processo e ainda possibilita a obtenção de produtos com melhores características.

1.2 Vias biossintéticas de produção de biopolímeros e produção via enzimática

Um grande número de seqüências de proteínas envolvidas na biossíntese de polissacarídeos tornou-se disponível durante os últimos anos, principalmente devido à clonagem e seqüenciamento dos genes correspondentes (Geremia, 1996). Um exemplo dessas proteínas é a glicanassacarase, que é uma enzima extracelular produzida, principalmente, por *Leuconostoc mesenteroides*, espécies de *Streptococcus* e bactérias lácticas. Esta enzima catalisa a síntese de polímeros de D-glicose de alto peso molecular, com diferentes estruturas, chamados glicanas, a partir da transferência de resíduos glicosil vindos da clivagem da sacarose. Glicanas que apresentam resíduos de glicose contínuos ligados $\alpha(1-6)$ são conhecidos como dextranas. Os diferentes tipos de dextranas diferem entre si através do tipo de ligação ramificada $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$ ou $\alpha(1-4)$, porcentagem de ramificação, comprimento das cadeias ramificadas e arranjo espacial. A freqüência e natureza dos pontos ramificados dependem principalmente da

origem da dextranassacarase, ou seja, do organismo produtor. As glicanas, que contêm resíduos de glicose contínuos ligados $\alpha(1-3)$ na cadeia principal, são conhecidas como mutanas, e glicanas com resíduos de glicose ligados alternando ligações $\alpha(1-6)$ e $\alpha(1-3)$ são conhecidos como alternanas (Robyt et al., 1974).

A sacarose é o único substrato doador natural para síntese de glicana. Essa síntese não necessita de primer endógeno. A energia necessária para catalisar todas as reações vem somente da clivagem da ligação glicosídica da sacarose (Monchois et al., 1999).

Outras proteínas conhecidas são as glicosiltransferases, que catalisam a clivagem da sacarose, a transferência de resíduos glicosil para a cadeia de crescimento da glicana (Arguello-Morales et al., 1999) e a formação de ligações glicosídicas usando um açúcar difosfo nucleotídeo como o açúcar doador. São responsáveis pela seqüência de açúcares e pelo tipo de ligação em oligo e polissacarídeos (Geremia et al., 1996).

A dextranassacarase é uma glicosiltransferase extracelular que catalisa a transferência de resíduos glicosil, a partir de sacarose, para o polímero dextrana e libera frutose de acordo com a seguinte reação (Dols et al., 1998):



A dextranassacarase de *L. mesenteroides* catalisa cinco diferentes reações: (1) síntese de dextrana a partir de sacarose e formação de ligações glicosídicas $\alpha(1-6)$ entre resíduos D-glicose formados pela hidrólise da sacarose; (2) formação de ligações ramificadas $\alpha(1-3)$ pela transferência de unidades glicosil ou dextranil a partir do sítio ativo para uma cadeia de dextrana exógena; (3) transferência de D-glicose para maltose, na presença de sacarose e outro carboidrato (um aceptor); (4) transferência de D-glicose a partir da extremidade não-redutora da cadeia de dextrana para maltose, na ausência de sacarose (reação que ocorre entre dextrana e maltose); e (5) hidrólise extremamente baixa de glicose a partir da extremidade não-redutora da cadeia de dextrana (Kitaoka & Robyt, 1999).

A dextrana produzida por *Leuconostoc mesenteroides* foi um dos primeiros biopolímeros a serem produzidos em escala industrial e a encontrar

várias aplicações na medicina (Monchois et al., 1999), como expander de volume sanguíneo, no tratamento de anemia, e em biotecnologia (Lopretti et al., 1999).

A produção da enzima dextranassacarase somente ocorre quando sacarose está presente no meio de cultura. A sacarose é consumida pela biomassa e pela enzima extracelular produzida pelo metabolismo da célula para produzir dextrana e frutose. Como a dextrana é sempre produzida junto com a enzima durante o cultivo, preparações de dextranassacarase sempre contêm dextrana, o que pode afetar as propriedades da enzima (Santos et al., 2000). Isso foi confirmado por um estudo de Miller et al. (1986), onde procedimentos para purificação de dextranassacarase de *L. mesenteroides* falharam na remoção de importantes impurezas, especialmente polissacarídeos, causando dificuldade na obtenção da enzima. Níveis maiores de sacarose induzem melhor a produção de enzima, mas o excesso de dextrana produzido junto com a enzima dificulta a remoção de células e a medida da atividade enzimática (Santos et al., 2000). Dextranassacarases livres de carboidratos podem ser obtidas somente após numerosos passos de purificação (Dols et al., 1997).

Quando cresce em meio com glicose e frutose e na ausência de sacarose, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 1299 produz duas distintas dextranassacarases extracelulares nomeadas glicosiltransferase glicose e glicosiltransferase frutose (Dols et al., 1998).

Em um processo de produção típico de dextrana, o microrganismo produtor de dextranassacarase cresce em meio de fermentação com excesso de sacarose a 25-30° C e pH inicial de 7,0-7,2. Enquanto procede a fermentação, a bactéria excreta a enzima no meio. O pH do meio cai (para cerca de 5,0) e a enzima converte sacarose a dextrana e frutose (Lopretti et al., 1999).

As enzimas que catalisam a síntese de glicana a partir de sacarose formam complexos enzima-glicosil e glicanil covalentes. A unidade glicosil é transferida para a extremidade redutora da cadeia de crescimento da dextrana através do mecanismo de inserção em dois sítios (Robyt et al., 1974; Kitaoka & Robyt, 1999). Su & Robyt (1993) propuseram que este é o começo do crescimento da cadeia de dextrana que é, então, covalentemente ligada ao

sítio ativo da enzima e alongada através desse mecanismo. Foi proposto que esses dois sítios atacam duas moléculas de sacarose para formar dois intermediários glicosil covalentes. O C-6 hidroxil de um desses intermediários ataca o C-1 de outro intermediário glicosil para adicionar glicose na extremidade redutora de outra glicose e formar a ligação glicosídica $\alpha(1-6)$ e uma unidade isomaltosil. O sítio novamente livre ataca uma outra molécula de sacarose para formar um novo intermediário glicosil. O C-6 hidroxil dessa glicose intermediária então ataca o C-1 da unidade isomaltosil para formar outra ligação $\alpha(1-6)$ e uma unidade isomaltotriosil. O processo continua entre os dois sítios, gerando a síntese de uma cadeia de crescimento de dextrana através da inserção de glicose na extremidade redutora da cadeia (Su & Robyt, 1994). O último passo da síntese corresponde à dissociação da glicana da enzima (Monchois *et al.*, 1999).

O crescimento da cadeia de dextrana termina através da adição de aceptores (Su & Robyt *et al.*, 1994), ou seja, carboidratos como a maltose que se ligam a um sítio de ligação do acceptor e bloqueiam a transferência de glicose para dextrana. O grupo OH da extremidade não redutora da maltose ataca a glicose ou a dextrana ligada covalentemente, causando a transferência dessas unidades para a maltose. Quando a glicose é transferida, é formado o produto-acceptor panose. Essa reação, onde intermediários glicosil e dextranosil são transferidos para os aceptores para formar um produto-acceptor, é catalisada também pela dextranassacarase. Foi demonstrado que a maltose é o melhor acceptor na reação de dextranassacarase e a quantidade de glicose desviada de dextrana para produtos aceptores é dependente da concentração de acceptor, da concentração de sacarose e da quantidade de enzima presente. Portanto, em geral, quando a proporção de aceptores aumenta, a quantidade de produtos-aceptores também aumenta e a quantidade de dextrana sintetizada diminui (Su & Robyt, 1993).

A dextrana pode também agir como acceptor, resultando na adição do resíduo glicosil na extremidade não redutora da molécula de dextrana ou na formação de uma ligação ramificada (Dols *et al.*, 1997). Portanto a ramificação de glicanas ocorre quando a cadeia de glicana age como acceptor e ataca o complexo enzima-glicosil ou glicanil. A glicose ou a cadeia de glicana é transferida para a cadeia acceptor onde é ligada por uma ligação ramificada

(Robyt *et al.*, 1974). O produto endógeno D-frutose também pode agir como aceptor, mas este é um aceptor fraco e somente diminui a quantidade de dextrana de 1-2% (Su & Robyt, 1993).

A atividade da dextranassacarase é testada através da medida da quantidade de sacarose consumida. Uma unidade de dextranassacarase é definida como a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em uma hora sob condições ideais ($t = 30^{\circ} \text{C}$; $\text{pH} = 5,0$) (Santos *et al.*, 2000).

A levana é um polímero de frutose de alto peso molecular, altamente ramificado, com predominância de ligações $\beta(2-6)$. É sintetizada por uma simples exoenzima, a levanassacarase, e purificada do sobrenadante da cultura de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseocola*, que cresce em meio líquido rico em sacarose (Kasapis *et al.*, 1993).

A síntese de levana ocorre através de um processo de transfrutolidação, que produz glicose monomérica em adição a frutana de alto peso molecular. A enzima levanassacarase pode agir autonomicamente, sem requerer cofator ou outra energia externa além da conservada na ligação acetal da própria sacarose. É altamente tolerante ao estresse físico e químico e, portanto muito bem adaptada a sobreviver em ambiente hostil (Kasapis *et al.*, 1993).

Segundo Hettwer *et al.* (1995), a enzima levanassacarase conduz a síntese de levana a partir de sacarose e a hidrólise de levana ao monossacarídeo frutose.

A goma gelana é um exopolissacarídeo bacteriano, recentemente comercializado, com potencial aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e outras indústrias (Martins *et al.*, 1996). *Pseudomonas elodea* é a fonte bacteriana para a produção de goma gelana através de fermentação aeróbica (Vendruscolo, 1993).

Enzimas biossintéticas são necessárias para formação de açúcares nucleotídeos UDP-D-ácido glicurônico e dTDP-L-ramnose, que são doadores de monômeros para biossíntese de unidades tetrassacarídicas repetitivas da gelana (Martins & Sá-Correia, 1994; Martins *et al.*, 1996).

A biossíntese de dextrana e levana não implica sistemas multienzimáticos, açúcares ativados e lipídio carregador intermediário. Sua produção é extracelular e utiliza enzimas que catalisam a polimerização de um oligossacarídeo. Os controles sobre a atividade e o modo de ação destas

enzimas polimerizantes podem ser exercidos manipulando o ambiente (Pace, 1980).

Na produção de EPS por bactérias Gram-positivas, como *Leuconostoc mesenteroides*, enzimas lipoprotéicas extracelulares estão envolvidas e são secretadas na superfície da célula. Já a síntese de EPS (hetero e homopolissacarídeos) por bactérias Gram-negativas é intracelular (Santos et al., 2000; Sutherland, 2001) e instável em diferentes espécies bacterianas, como *Xanthomonas campestris* (Martins et al., 1996).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo ácido produzido por *X. campestris*; que consiste de unidades repetitivas do pentassacarídeo polimerizado, composto de glicose, manose e ácido glicurônico em uma fração molar 2:2:1 (Becker et al., 1998).

Durante a década de 80, vários grupos de pesquisa conduziram um extenso trabalho para identificação das vias bioquímicas, genéticas e de regulação da síntese de xantana. Um entendimento desse processo pode melhorar a produção e/ou a qualidade da goma xantana (Harding et al., 1994).

A biossíntese de xantana requer: (1) síntese de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples; (2) transferência de monossacarídeos, a partir do nucleotídeo correspondente, para o lipídeo carregador localizado na membrana da célula para formar a unidade pentassacarídica repetitiva; (3) adição de grupos acetil e piruvato, que são obtidos a partir de acetil-coA e fosfoenolpiruvato, respectivamente; e (4) polimerização e excreção. O local preciso do processo de polimerização e o estágio final da secreção do EPS a partir da membrana citoplasmática, envolvendo a passagem através do periplasma e membrana exterior e, finalmente, a excreção no ambiente extracelular, ainda não são bem elucidados (Harding et al., 1994; Sutherland, 1997; Sutherland, 2001). Alguns autores consideram que primeiro ocorre a polimerização das unidades pentassacarídicas no interior da célula, e após a excreção do polissacarídeo no exterior (Coplin & Cook, 1990; Harding et al., 1993; Harding et al., 1994; Katsen et al., 1998; Sutherland, 2001). Já, segundo Köplin et al. (1992), as unidades pentassacarídicas são secretadas e após polimerizadas.

Mecanismos devem existir em todos sistemas sintetizadores de EPS bacterianos para controlar a massa final e para liberar o polímero do lipídeo isoprenóide para o exterior, utilizando alguma fonte de energia (Sutherland, 2001).

A síntese de EPS requer, então, enzimas para produção de cada açúcar nucleotídeo precursor; glicosiltransferases para as adições dos açúcares; uma ou mais polimerases, para a polimerização dos oligossacarídeos, e proteínas envolvidas na exportação do polissacarídeo para o meio extracelular. Se o substrato ou a enzima for ausente, a síntese é bloqueada e intermediários oligossacarídeos são acumulados no lipídeo carregador (Coplin & Cook, 1990).

A via bioquímica para síntese de xantana foi, em parte, elucidada pela aplicação de um sistema *in vitro*. Uma preparação enzimática de células tratadas com EDTA-tris foi incubada com combinações de açúcares doadores para verificar a ordem de incorporação destes na síntese de xantana. A caracterização dos açúcares ligados a lipídeos carregadores indicou que um pentassacarídeo linear-P-P-lipídeo é formado através da adição seqüencial de cada resíduo de açúcar, na seguinte ordem: glicose, glicose, manose, ácido glicurônico e manose. Esses resíduos de açúcar são suplementados através dos açúcares nucleotídeos, UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose. A via de síntese da xantana é mostrada na FIGURA 1 (Coplin & Cook, 1990; Harding *et al.*, 1994). O exame do processo de polimerização indicou que a cadeia de xantana cresce na extremidade redutora (Becker *et al.*, 1998).

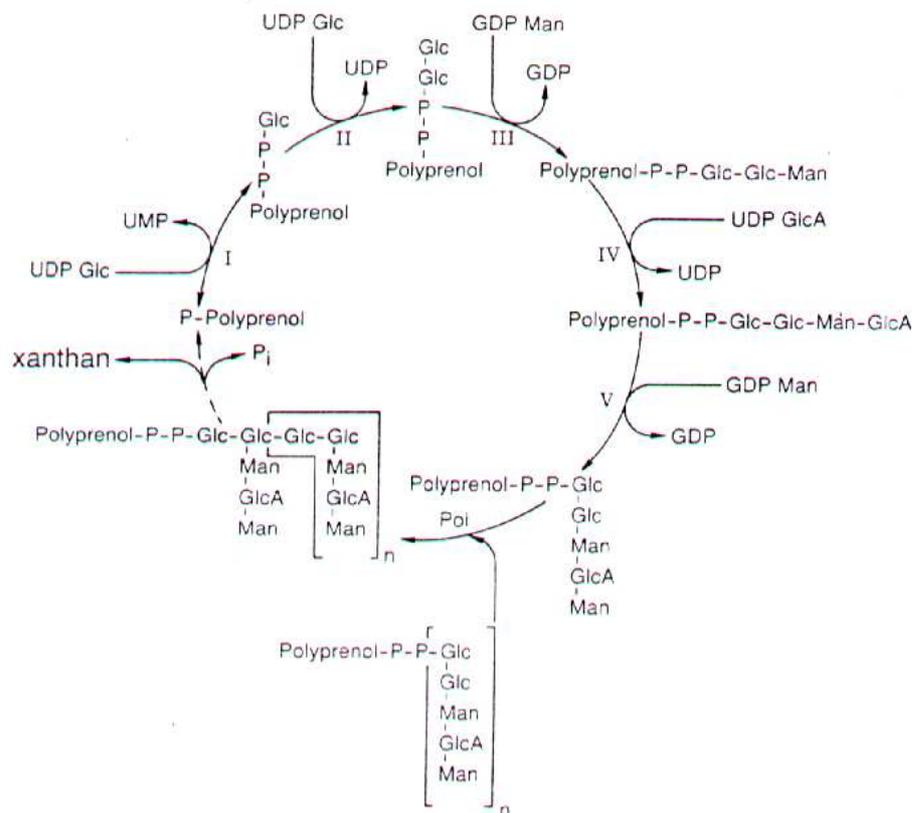


FIGURA 1. Via de biossíntese do biopolímero xantana (I-V: glicosiltransferases I-V; Pol: polimerase).

A polimerização envolve a transferência seqüencial da cadeia de crescimento ao pentassacarídeo-P-P-poliprenol. Isso envolve a formação de uma ligação entre o C-1 da glicose da cadeia de crescimento e o C-4 da segunda glicose do pentassacarídeo ligado a lipídeo, gerando um polímero ramificado, com uma cadeia principal e uma cadeia lateral trissacarídica (Harding *et al.*, 1994).

O estágio final da biossíntese de outras bactérias Gram-negativas, como a *Klebsiella aerogenes*, normalmente envolve a adição da seqüência do oligossacarídeo mais longo à extremidade não-redutora de uma simples unidade repetitiva ligada ao lipídeo isoprenóide e envolve liberações simultâneas do lipídeo isoprenóide difosfato. O lipídeo carregador é desfosforilado para produzir o isoprenil fosfato, que pode então recomeçar a seqüência da biossíntese (Sutherland, 2001).

A síntese de açúcares nucleotídeos na produção de xantana ocorre no citoplasma e supõe-se que a síntese do pentassacarídeo-P-P-poliprenol ocorra na face interior da membrana do citoplasma (Harding *et al.*, 1994).

A FIGURA 2 apresenta a via de síntese dos açúcares nucleotídeos precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose, a partir da conversão de açúcares simples, para síntese de xantana.

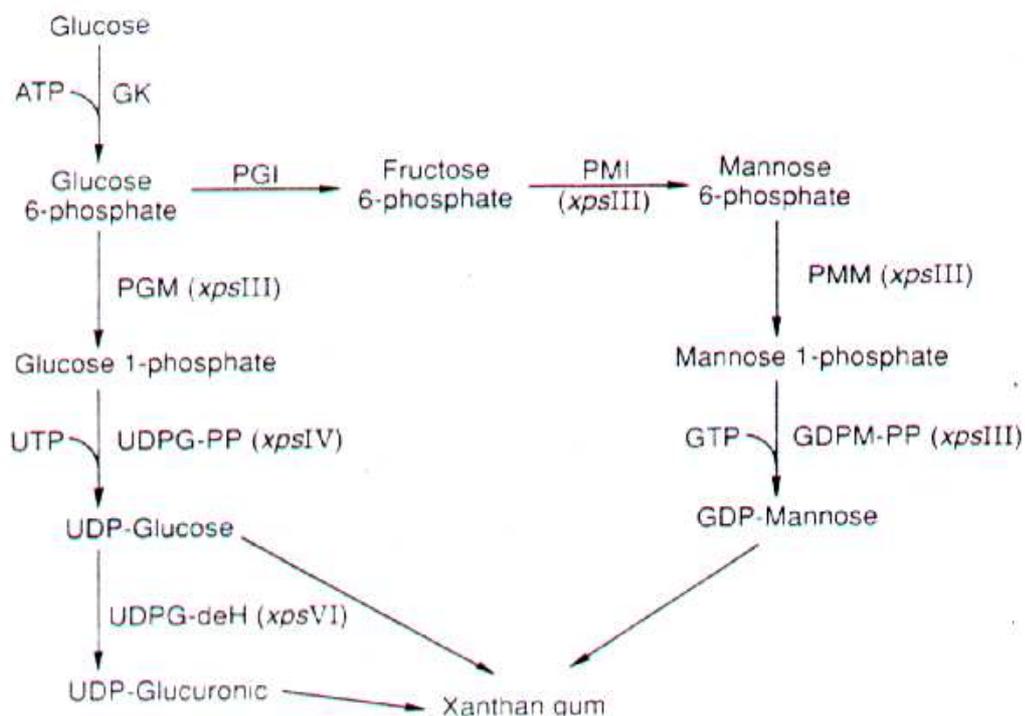


FIGURA 2. Via de síntese dos açúcares nucleotídeos precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose, a partir da conversão de açúcares simples, para síntese de xantana. Enzimas envolvidas: UDP-glicose pirofosfarilase (UDPG-PP); UDP-glicose desidrogenase (UDPG-deH); fosfomanose isomerase (PMI); fosfomanomutase (PMM); GDP-manose pirofosforilase (GDPM-PP); fosfoglicose isomerase (PGI); glicoquinase (GK) e fosfoglicomutase (PGM)

A aplicação da tecnologia do DNA recombinante para estudar a biossíntese e regulação genética de biopolímeros está sendo investigada usando *X. campestris*. Recentemente, uma ampla região do DNA *xpsI*, essencial para a síntese do polissacarídeo xantana, foi descrita (Harding *et al.*, 1993). O fato desses genes para biossíntese do polissacarídeo xantana estarem agrupados facilita muito manipulações genéticas para aumentar a produtividade ou para alterar a estrutura da xantana (Harding *et al.*, 1994).

Um problema que pode ser encontrado tanto em laboratório como em produções comerciais, é a presença de polissacarases ou polissacarídeo liases degradadoras do EPS produzido pela bactéria. Essas enzimas são, geralmente, produtos intracelulares localizados no periplasma. Se as células forem lisadas durante a cultura, as enzimas podem ser liberadas no meio extracelular e degradarem o polímero. A *X. campestris* produz uma celulase e o *Sphingomonas paucimobilis* produz uma gelana liase (Sutherland, 2001).

Estudos bioquímicos e fisiológicos demonstram que a síntese de xantana é similar a biossíntese de exopolissacarídeos de outras bactérias Gram-negativas (Sutherland, 1988; Köplin *et al.*, 1992). A via biossintética da *Beijerinckia* sp. 7070, que é uma bactéria Gram-negativa, ainda não é conhecida.

1.3 Composição química dos biopolímeros

Os exopolissacarídeos (EPS) sintetizados por células microbianas variam muito em sua composição e, conseqüentemente, em suas propriedades físicas e químicas. Alguns são moléculas neutras, mas a maioria são moléculas polianiónicas, devido à presença de ácidos urônicos como o ácido D-glicurônico (mais comum), ácido D-galacturônico e ácido D-manurônico (Sutherland, 2001). Os EPS ácidos produzidos pela maioria das bactérias fitopatogênicas são altamente aniônicos. Os homopolímeros incluem glicanas, levanas e alginatos e os heteropolímeros são polímeros ácidos compostos de arranjos lineares de unidades repetitivas de açúcares neutros, ácido glicurônico e radicais de acetato, piruvato, hidroxibutirato e succinato (Sutherland, 1988).

A estrutura de muitos polissacarídeos produzidos por bactérias Gram-negativas é relativamente simples, compreendendo homopolissacarídeos, geralmente polímeros compostos de D-glicose, ou heteropolissacarídeos, normalmente compostos de unidades repetitivas regulares de dissacarídeos e octassacarídeos compostos de 2 a 4 tipos de monossacarídeos que contém grupos acil (Sutherland, 2001).

Alguns componentes tais como: D-glicose, D-manose, D-galactose e D-ácido glicurônico ocorrem muito freqüentemente nos biopolímeros, outros como

L-ramnose ou L-fucose são menos comuns e D-ácido manurônico e L-ácido glicurônico são raros (Sutherland, 1982).

Para um biopolímero ter uma boa aplicabilidade, ele deve ter composição química compatível com o metabolismo humano (Padilha, 1997) e aprovação prévia dos órgãos competentes para serem utilizados em produtos para consumo humano, como alimentos, fármacos e cosméticos, através de um rigoroso controle de qualidade (Moreira *et al.*, 1998).

Algumas espécies bacterianas produzem um simples EPS, como a *X. campestris*, e outras podem sintetizar (geralmente não simultaneamente) dois ou mesmo três polímeros extracelulares, junto com oligossacarídeos intracelulares. *Azotobacter chroococcum* pode produzir diferentes EPS dependendo do substrato fornecido. Crescendo em meio com glicose e vários outros substratos produz alginato bacteriano, enquanto que com sacarose, produz o homopolissacarídeo levana (Sutherland, 2001).

A avaliação de cepas e espécies de *Beijerinckia* tem revelado polissacarídeos com diferentes composições. O polímero de *Beijerinckia mobilis* apresenta alto conteúdo de L-ácido glicurônico e heptose ao longo de uma cadeia com acetato e piruvato (Cooke & Percival, 1975). Alguns desses polímeros são pouco solúveis, talvez devido à presença de resíduos L-guluronosil (Kang & McNeely, 1977).

O polímero extracelular de *B. mobilis* é dividido em um polissacarídeo neutro (10%); uma fração dialisável (5%), consistindo de glicose e oligossacarídeos contendo glicose, arabinose e ramnose; e um polissacarídeo ácido (85%) de alto peso molecular composto de L-ácido glicurônico (65%), D-glicose (15%), D-glicero-D-manoheptose (20%), além de ácido acético e pirúvico (Cooke & Percival, 1975).

A bactéria do solo *B. indica* produz um polissacarídeo em que glicose, ramnose e ácido glicurônico estão presentes em uma fração molar aproximada 6.6:1.5:1.0. O conteúdo acetil do polímero é 9% (Kang & McNeely, 1977).

O polissacarídeo CV-70 obtido por fermentação aeróbica de *Beijerinckia* contém glicose, fucose, e resíduos de galactose em uma proporção de 3:1:3, todos na forma piranosídica. Glicose e galactose foram encontradas na

conformação β e fucose, na conformação α . Sua cadeia principal consiste de unidades β -D-galactose e α -L-fucose, ligados por (1-4). A cadeia lateral é formada por β -D-glicose, que é ramificada através da ligação (1-4) (Scamparini *et al.*, 1997).

A composição química do polímero OS-32 produzido pela cepa 32 de *Beijerinckia* isolada por Vendruscolo (1995) é: glicose, galactose e fucose na proporção de 3:1:3 e do polímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070, caracterizado também por Vendruscolo (1995) é: glicose, galactose, fucose, ácido galacturônico e glicurônico. O componente principal é glicose sendo 52,8% do peso seco do polissacarídeo (Vendruscolo, 1993).

O polímero dextrana é composto de resíduos α -D-glicopiranosil ligados através de ligação α (1-6) na cadeia linear e ligações α (1-2), α (1-3), e/ou α (1-4) nos pontos de ramificação. A estrutura da dextrana e a frequência e natureza dos pontos ramificados dependem, principalmente, da origem da dextranassacarase (do organismo produtor) e, em menor extensão, do grau de purificação da enzima. Cada estrutura de dextrana é característica de uma determinada dextranassacarase (Dols *et al.*, 1997; Dols *et al.*, 1998).

O polímero levana consiste de resíduos D-frutofuranosil ligados predominantemente através de ligação β (2-6), e com extensa ramificação através de ligação β (2-1) (Kasapis *et al.*, 1993).

A gelana é um polissacarídeo aniônico de alta massa molecular composto de tetrassacarídeos com unidades repetitivas β (1-3)-D-glicose e α (1-4)-L-ramnose (Dlamini & Peiris, 1997). Existem diferentes gelanas que apresentam estruturas semelhantes, mas diferem na natureza e localização de suas cadeias laterais e na presença ou ausência de certos grupos acil (Kennedy & Sutherland, 1994).

A xantana consiste de resíduos de D-glicose, D-manose e D-ácido glicurônico na fração molar de 2:2:1 e proporções variáveis de resíduos O-acetil e piruvil (Becker *et al.*, 1998). Os resíduos de manose são acetilados e piruvatados em lugares específicos a vários graus (Katsen *et al.*, 1998). A xantana é modificada pela acetilação e piruvatação desses resíduos. A extensão da acetilação e piruvatação varia, dependendo da cepa e condições de fermentação (Harding *et al.*, 1994).

A semelhança estrutural existente entre os monossacarídeos dificulta a sua separação nos métodos cromatográficos clássicos, como a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa. No entanto, estes métodos são os mais simples e econômicos, indicados quando o volume e freqüência de análises não justificam o emprego de métodos instrumentais complexos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Moreira *et al.*, 1998).

1.4 Propriedades reológicas dos biopolímeros

A viscosidade, elasticidade, viscoelasticidade, pseudoelasticidade, a capacidade de formar gel, emulsões e suspensões são algumas das propriedades reológicas que os biopolímeros podem apresentar. A viscosidade (η) é uma função da taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) aplicada na matéria. A viscosidade das soluções de biopolímeros pode ser newtoniana, ou seja, independente da taxa de deformação ou pseudoplástica, ou seja, apresentar redução da viscosidade com aumento da taxa de deformação.

Microrganismos produzem biopolímeros com aplicações potenciais em uma série de segmentos industriais. Na indústria de alimentos são usados como agentes de suspensão, espessantes, emulsificantes, gelificantes, e em produtos da linha diet e light. Os polissacarídeos extracelulares são de maior interesse industrial, devido a maior facilidade de extração e purificação. Para um biopolímero ter uma boa aplicabilidade, ele deve possuir propriedades reológicas interessantes e contínuas durante mudanças na temperatura, pH e força iônica (Scamparini *et al.*, 1997).

A produção de exopolissacarídeos microbianos fornece uma alternativa válida para substituição das gomas comumente usadas, como o amido e outros, através do desenvolvimento de produtos com propriedades praticamente idênticas ou, através da produção de materiais com melhores características reológicas, que podem ser usados para novas aplicações. Isto é devido à variedade de polissacarídeos sintetizados por microrganismos. Embora a composição desses polímeros seja limitada a um pequeno número de monossacarídeos, outros componentes também são encontrados como fosfato, acetato e piruvato. Além disso, a produção industrial dos biopolímeros

não é vulnerável a problemas na colheita, condições climáticas ou poluição marinha (Cooke & Percival, 1975; Kang & McNelly, 1977).

As propriedades físicas de alguns EPS microbianos dependem de sua estrutura primária, secundária e terciária e da natureza das ligações nas cadeias, onde, por exemplo, em dextranas, ligações $\beta(1-4)$ conferem ao polímero rigidez, e $\alpha(1-2)$ conferem flexibilidade (Sutherland, 2001).

No Brasil, pesquisas visam à otimização do processo fermentativo de produção de biopolímeros extracelulares com potencial de aplicação industrial e o estudo de novas cepas bacterianas (Padilha, 1997).

Alguns organismos produzem emulsificantes extracelulares tão bons como a goma arábica e carboximetilcelulose. A *Beijerinckia indica* sp. *lactiogenes*, uma conhecida produtora do polissacarídeo com propriedades lipofílicas chamado indican, é um desses. Indican deve sua propriedade lipofílica a características estruturais como um esqueleto linear altamente acetilado (15-29%) e ao alto conteúdo de desoxiaçúcar L-ramnose. Essas características estruturais promovem auto-associações apolares e geram soluções tixotrópicas viscosas a concentrações de 0,5% ou acima disso. Indican apresenta menor tensão interfacial e superficial e confere estabilidade a emulsões de óleo em água através da formação de filmes interfaciais. Dificuldades associadas com a separação e extração do polímero indican do meio foram consideradas como uma das principais causas para a não utilização deste na indústria (Shepherd et al., 1995).

A viscosidade de soluções aquosas do polissacarídeo produzido por *Beijerinckia* spp. pode ser maior do que a de soluções similares de xantana e estável a uma série de temperaturas, bem como a pH de 3-12. As soluções são pseudoplásticas e a presença de sais eleva a viscosidade. Possui tendência a formar géis a valores de pH altos (10 ou mais) na presença de sais monovalentes (Kang & McNeely, 1977).

A viscosidade aparente de soluções aquosas a 3% a 25°C do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 demonstrou que este biopolímero é de interesse industrial, pois apresentou uma elevada viscosidade aparente e estabilidade em ampla faixa de temperatura em pH 7,0 (Vendruscolo, 1995; Padilha, 1997).

A viscosidade da solução de levana permanece newtoniana para uma concentração de polímero de cerca de 20%. A redução da viscosidade com o aumento da taxa de deformação foi observada a maiores concentrações, mas foi observada uma região “platô” de fluxo newtoniano em baixas taxas de deformação a concentrações mais altas (26.5%). (Kasapis *et al.*, 1993).

A viscosidade não é constante, mas aumenta com a concentração, devido a interações entre cadeias próximas, vizinhas. Viscosidades relativas dentro de um limite inferior de $\eta_{rel} > 1.2$ foram obtidas para levana a concentrações entre 1 e 3 % (v/v) (Kasapis *et al.*, 1993).

A goma gelana forma soluções aquosas altamente viscosas e géis termorreversíveis sob condições apropriadas. Apresenta numerosas aplicações industriais como biogoma com alta viscosidade, agente de suspensão e agente gelificante (Vendruscolo, 1993).

Dados reológicos do polímero gelana sugerem que em solução, o polissacarídeo assume conformação rígida. Uma série de texturas de gel pode ser produzida através do controle do nível de acetilação do polímero, pois para os polissacarídeos da família das gelanas, a viscosidade intrínseca como função da energia iônica depende da sua estrutura e da presença ou ausência de grupos acetil. A gelatinização é claramente afetada pelas condições de crescimento usadas na produção e os procedimentos utilizados no processo pós-fermentação (Sutherland, 1997).

Após a desacetilação, a gelana forma um gel similar ao gel ágar com a metade da concentração e com maior estabilidade térmica (Martins *et al.*, 1996). Por isso, a gelana é produzida comercialmente como agente gelificante para várias aplicações em alimentos na forma desacetilada. Somente o polímero desacetilado exhibe gelatinização com propriedades similares ao ágar (Kennedy & Sutherland, 1994).

A falha de polissacarídeos em formar gel parece ser devido à presença de cadeias laterais que protegem os grupos carboxil a níveis variados (Sutherland, 1997).

A xantana é um dos poucos polímeros que têm propriedades funcionais que levam ao extenso espectro de usos, bem como a produção comercial em grandes quantidades. É o segundo polissacarídeo microbiano, após a dextrana, a ser desenvolvido por um processo economicamente viável. Por sua

propriedade reológica, tais como alta viscosidade e pseudoelasticidade, a xantana tem potencial aplicação em processos de produção industrial (Köplin *et al.*, 1992) como na indústria têxtil, de tintas, de papel, de cosméticos, farmacêutica e de óleos, sendo usada como agente espessante, viscosificante, gelificante e estabilizante. Também é usada como adesivo e para inibição de formação de cristais de gelo (Becker *et al.*, 1998).

A xantana não é sensível à ampla variação de temperatura, pH e concentrações eletrolíticas e também manifesta uma alta estabilidade à deformação (Becker *et al.*, 1998). A gelatinização da xantana é muito afetada pela relação D-manose:D-galactose (Sutherland, 1997).

Modificações na cadeia lateral do polímero e seus substituintes acil alteram as propriedades reológicas da xantana. Tanto a eliminação de resíduos acetil como o aumento do conteúdo de piruvato, aumentam sua viscosidade. A viscosidade máxima intrínseca pode, então, ser encontrada através do bloqueio da acetilação e aumento da piruvatação. (Harding *et al.*, 1994).

1.5 Hipóteses

- A produção, a produtividade, a viscosidade e a composição química do biopolímero variam conforme o tempo de fermentação;
- É possível produzir o biopolímero da bactéria *Beijerinckia* sp. 7070 utilizando enzimas purificadas (via enzimática);
- Várias enzimas estão envolvidas na síntese desse biopolímero e, estas, são intra e/ou extracelulares;
- As enzimas envolvidas na síntese e na degradação do biopolímero permanecem ativas no meio após serem liberadas, mesmo sem a ação de célula bacteriana;
- A quantidade de biopolímero produzido, avaliada pela produção e produtividade deste, pode ser influenciada pelo método de produção utilizado, ou seja, produção via enzimática após inativação e após lise celular, e produção convencional com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070;

- A qualidade do biopolímero produzido, avaliada pelo comportamento reológico e a composição química deste, também pode ser influenciada pelo método de produção utilizado.

1.6 Objetivos

- Caracterizar os biopolímeros produzidos em diferentes tempos de fermentação, quanto à produção, produtividade, viscosidade e composição química;
- Avaliar a possibilidade de produzir o biopolímero clairana® via enzimática;
- Verificar se a síntese e as enzimas envolvidas nesta são intra e/ou extracelulares;
- Verificar se as enzimas envolvidas na síntese e na degradação do biopolímero permanecem ativas no meio, após serem liberadas, mesmo sem a ação da célula bacteriana;
- Estudar a produção do biopolímero clairana® pelo processo via enzimática, através de inativação e lise celular, e pelo processo convencional com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070.
- Estudar o comportamento reológico e a composição química do biopolímero clairana® produzido por via enzimática, através de inativação e lise celular, e do biopolímero produzido convencionalmente com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070.

CARACTERIZAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS PRODUZIDOS POR *Beijerinckia* sp. 7070 EM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO

Ângela Nunes MOREIRA, Caroline Dellinghausen BORGES, Angelita da Silveira MOREIRA, Francisco A. B. DEL PINO, Claire Tondo VENDRUSCOLO

RESUMO

Biopolímeros são polissacarídeos microbianos. O biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 possui comportamento pseudoplástico e apresenta alta viscosidade em baixas taxas de deformação, conferindo ao polímero excelentes características de suspensão. O objetivo desse trabalho foi caracterizar o biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 em diferentes tempos de fermentação, quanto à produção total, produção de polímeros de fibra longa e curta, produtividade, viscosidade e composição química. As amostras foram cultivadas em meio líquido. Os polímeros foram recuperados em diferentes tempos de fermentação, secos e pesados para determinação da produção e produtividade. Na análise microscópica um aumento de 40 vezes foi utilizado para verificar o tipo de fibra nos diferentes tempos. Viscosidades aparentes de solução aquosa 1% foram determinadas a 6, 12, 30 e 60 rpm, a 25°C, em um viscosímetro Brookfield. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa determinou a composição do biopolímero. As maiores produções totais encontradas foram em 30 e 72 h, a maior produtividade em 48 h e a maior viscosidade foi apresentada pelo polímero em 72 h. Os polímeros de fibra longa apresentaram uma tendência de tornarem-se mais longos com o tempo. A viscosidade do polímero de fibra longa foi maior que a do de fibra curta. Todos os biopolímeros apresentaram os mesmos componentes: glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico, mas com intensidades diferentes.

Palavras-chave: biopolímero, fermentação, viscosidade, cromatografia.

SUMMARY

CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMERS PRODUCED BY *Beijerinckia* sp. 7070 AT DIFFERENT FERMENTATION TIME. Biopolymers are microbial polysaccharides. The biopolymer produced by *Beijerinckia* sp. 7070 has pseudoplastic behaviour and shows high viscosity at low deformation rates, giving to the polymer excellent suspension characteristics. The objective of this work was to characterize the biopolymer produced by *Beijerinckia* sp. 7070 at different fermentation time in relation to total production, production of short and long fiber polymers, productivity, viscosity and chemical composition. The samples were cultivated in liquid medium. The polymers were recovered at different fermentation times, dried and weighted for determination of the production and productivity. In the microscopic analyses an increase of 40 times was used in order to verify the fiber type at different times. Apparent viscosities of the 1% (w/v) aqueous solutions were determined at 6, 12, 30 and 60 rpm, at 25°C, in a Brookfield viscosimeter. Comparative Thin Layer Chromatography determined the biopolymer composition. The highest total biopolymer productions found were at 30 and 72 h, the highest productivity was in 48 h and the highest viscosity was presented by the polymer in 72 h. The long fiber polymer showed a tendency of becoming longer with time. The viscosity of long fiber polymer was higher than the short fiber one. All polymers showed the same components: glucose, galactose, fucose and glucuronic acid, but with different intensities.

Keywords: biopolymer, fermentation, viscosity, chromatography.

1 - INTRODUÇÃO

Atualmente há considerável interesse em polissacarídeos obtidos pela ação de microrganismos. Estes polissacarídeos são conhecidos como biopolímeros e são obtidos por processos fermentativos. Possuem capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo quando aplicados em baixas concentrações. O monoesterato glicerol e a carboximetilcelulose são emulsificantes amplamente utilizados na indústria de alimentos. Embora muito

efetivos nas suas funções, estes componentes estão perdendo gradualmente seu campo devido a maior conscientização dos consumidores em reduzir o uso de aditivos artificiais ou quimicamente sintetizados em alimentos. A produção de emulsificantes através de fermentação microbiana, além de solucionar esse problema, pois produz polímero de natureza biodegradável, é eficiente a uma ampla margem de temperatura, pH e salinidade, e ainda possui capacidade de síntese em condições desfavoráveis, como baixas temperaturas e pressão [14]. Além disso, os biopolímeros apresentam vantagens também em relação aos polissacarídeos de origem vegetal e animal, tais como: reprodutibilidade e estabilidade das propriedades físico-químicas e custo e suprimento estáveis [10]. Devido a suas propriedades físico-químicas, os biopolímeros podem ser utilizados amplamente na indústria como emulsificantes, gelificantes e estabilizantes [12]. Os polissacarídeos microbianos atualmente utilizados em produção industrial são a dextrana, que é uma glicana neutra e a xantana, um heteropolissacarídeo poliânico [5].

A produção de polissacarídeos extracelulares é muito comum em muitos gêneros de bactérias. Esses exopolissacarídeos podem formar uma cápsula ao redor da célula ou podem ser excretados para o meio ambiente como um muco [3]. A *Beijerinckia* sp. 7070 é uma bactéria fixadora de nitrogênio. Espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio são geralmente produtoras de exopolissacarídeos [6].

Os biopolímeros que despertam interesse industrial devem apresentar característica de elevada viscosidade em ampla faixa de pH e temperatura e devem apresentar composição química compatível com o metabolismo humano. Estudos estão sendo desenvolvidos para otimizar o processo de produção visando à obtenção de biopolímeros com potencial aplicação industrial e alta produtividade. No entanto, para a produção industrial, é de extrema importância o desenvolvimento de processos econômicos como redução de meios de cultura e tempo de fermentação [8]. Em estudos realizados por VENDRUSCOLO [19] foi demonstrada a viabilidade industrial do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 através das respostas de rendimento, comportamento reológico, estabilidade ao pH, temperatura e tempo de produção. Além disso, PADILHA [11] observou em um estudo onde

analisou somente dois tempos (24 e 36 horas), que a produção, composição química e a viscosidade foi diferente em cada um dos tempos. Portanto é importante estudar o(s) melhor(es) tempo(s) de fermentação para obtenção de uma maior quantidade e melhor qualidade do biopolímero.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o biopolímero produzido pela bactéria *Beijerinckia* sp. 7070, em diferentes tempos de fermentação, quanto à produção total, produção de polímeros de fibra longa e curta, produtividade, viscosidade e composição química.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Microrganismo

Foi utilizada nesse trabalho a bactéria *Beijerinckia* sp. 7070, que foi isolada do solo de plantação de cana-de-açúcar na região de Ribeirão Preto-SP, identificada e caracterizada como produtora de biopolímero por VENDRUSCOLO [19].

2.2 - Meios e condições de incubação

Durante o desenvolvimento do trabalho a cultura foi mantida através de liofilização [5]. As placas cultivadas com *Beijerinckia* sp. 7070 foram incubadas a 24°C, por 24 horas.

Para a produção de biopolímero utilizou-se o meio líquido YM contendo (g.L⁻¹): (1) K₂HPO₄ 2,0, MgSO₄ 7H₂O 2,7, KH₂PO₄ 13,62; (2) extrato de levedura 0,2, triptose 2,0; (3) sacarose 50,0 [20]. O pH da solução (1) foi ajustado a 6,8 e as três soluções foram esterilizadas separadamente a 121°C por 15 minutos. Utilizou-se metodologia de VENDRUSCOLO [19] modificada por PADILHA [11]. O inóculo utilizado na produção foi de 1 mL de suspensão bacteriana com 1x10¹⁰UFC/mL preparado a partir de colônias de 24 horas de crescimento. O inóculo foi acrescentado a 100 mL de meio de produção, em erlenmeyer de 250 mL. A produção de biopolímero foi realizada por fermentação aeróbica em batelada, em incubador agitador New Brunswick Scientific, modelo Innova 4230. As condições de incubação foram: 24°C, 180

rpm e os tempos utilizados foram: 16, 18, 20, 24, 28, 30, 32, 34, 36, 48, 72 e 96 horas.

2.3 – Recuperação dos polímeros

Os meios fermentados de cada tempo foram centrifugados, para remoção das células, a 16000 g, à temperatura de 4° a 14°C por 20 minutos em centrífuga refrigerada. Ao sobrenadante adicionou-se etanol 95% na proporção de 1:4 (v/v) para recuperação dos biopolímeros. Os polímeros apresentaram fibras longas e curtas. As fibras longas foram separadas das fibras curtas através de peneira, com 42 orifícios/cm² sendo as fibras curtas recolhidas após decantação. Os biopolímeros foram secos em estufa a 56°C até atingir peso constante e após foram pesados e triturados.

2.4 - Produção de biopolímero

A produção total dos biopolímeros e a produção dos polímeros de fibra longa e curta (g/L) obtidos nos diferentes tempos de fermentação foram avaliadas pelo peso do produto seco por volume de meio. Foi realizada ainda análise microscópica dos polímeros em microscópio óptico OLYMPUS modelo BX50 de contraste interferencial de fases. O sistema de vídeo micrografia utilizado foi composto por câmera digital SONY modelo DXC-107A e monitor de vídeo SONY HR Triniton. Para captura de imagem foi utilizada placa de captura de imagem ATI Technologies Inc modelo ALL-IN-WONDER™ PRO adaptada a um computador. Um aumento de 40 vezes foi usado para observação visual dos polímeros de fibra longa e curta nos diferentes tempos.

2.5 – Produtividade

A produtividade (g/L/h) foi avaliada pelo peso do produto seco por volume de meio por tempo de fermentação.

2.6 - Viscosidade

A determinação da viscosidade da solução aquosa dos biopolímeros a 1% (m/v) foi realizada em viscosímetro rotacional Broockfield modelo LV, com spindle 3, a 25°C, nas seguintes taxas de deformação: 6, 12, 30 e 60 rpm.

2.7 - Análise estatística

Todas as amostras, em triplicata, foram analisadas estatisticamente pelo método de Fischer.

2.8 - Análise cromatográfica

Para preparar as amostras para cromatografia, foi realizada hidrólise dos biopolímeros em HCl 1N (3% m/v) a 80°C por 16 h em banho-maria com temperatura controlada. A composição dos biopolímeros foi determinada através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) em cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄, Merck. O eluente empregado foi clorofórmio: metanol: ácido acético: água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Para revelação utilizou-se o reagente anisaldeído sulfúrico. Os padrões utilizados foram: fucose, ácido glicurônico, galactose, glicose e ácido galacturônico.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Produção de biopolímero

A produção total de biopolímeros nos diferentes tempos apresentada na *Figura 1* mostrou que a maior produção ocorreu em 30 e 72 h. Os períodos de aumento se devem, provavelmente à maior presença de enzimas polimerizantes e os de declínio, de enzimas hidrolíticas, como polissacarases ou polissacarídeo liases degradadoras do EPS produzido pela bactéria.

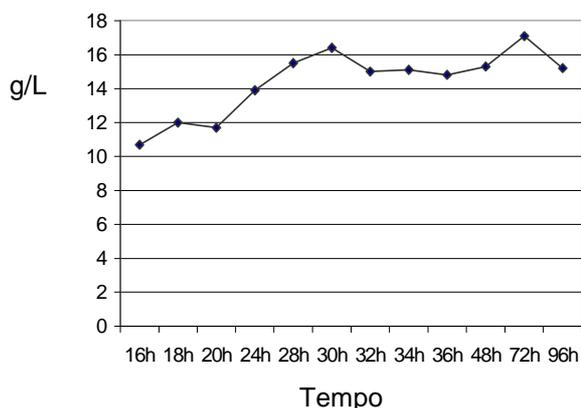


FIGURA 1. Produção total de biopolímero em g/L por *Beijerinckia* sp 7070 em diferentes tempos de fermentação.

VENDRUSCOLO [19] obteve em 72 h de cultivo da mesma bactéria, uma produção total de 10,60 g/L nas mesmas condições, porém utilizando além do meio de produção, o meio de crescimento de células. Já neste estudo foi obtido, sem a utilização do meio de crescimento de células, 17,1 g/L para o mesmo tempo de fermentação.

Com relação à produção de polímeros de fibras longas e curtas, observamos na *Figura 2*, que com o passar do tempo aumentou a produção dos de fibra longa e diminuiu a dos de fibra curta, provavelmente pela ação de enzimas que foram polimerizando esses fragmentos. Observou-se também que em 30 h ocorreu um equilíbrio entre a quantidade de fibras longas e curtas produzidas (não apresentou diferença estatística).

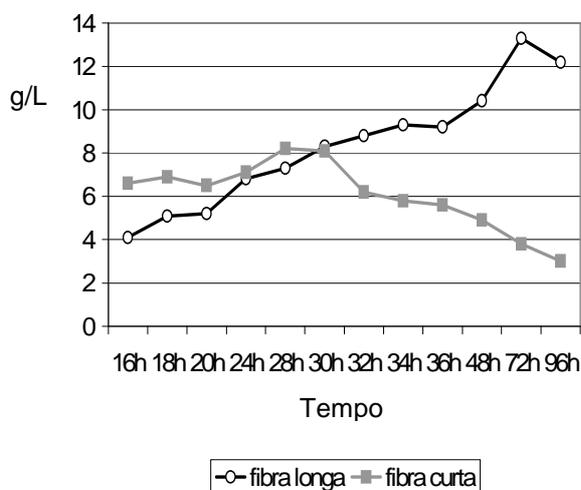


FIGURA 2. Produção de polímeros de fibras longas e curtas por *Beijerinckia* sp 7070 em diferentes tempos de fermentação.

A *Figura 3* apresenta micrografias de polarização (aumento de 40 vezes) dos biopolímeros de fibra longa em 30 h (A) e em 72 h (B) e de fibra curta em 72 h (C). A análise microscópica das fibras demonstrou a tendência de as fibras longas tornaram-se ainda mais longas com o passar do tempo. As fibras curtas não apresentaram diferença.

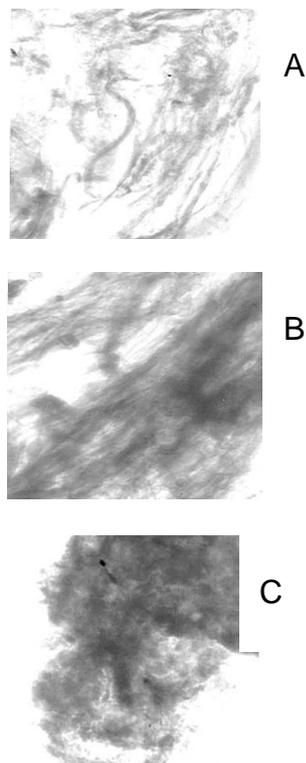


FIGURA 3. Micrografias de polarização (40X) dos biopolímeros de fibra longa em 30 h (A) e em 72 h (B) e de fibra curta em 72 h (C).

3.2 – Produtividade

Como podemos observar na *Figura 4*, a produtividade dos polímeros de fibra longa permaneceu praticamente constante até 48 h e a partir daí observou-se um declínio. Já a produtividade dos de fibra curta decresceu com o passar do tempo.

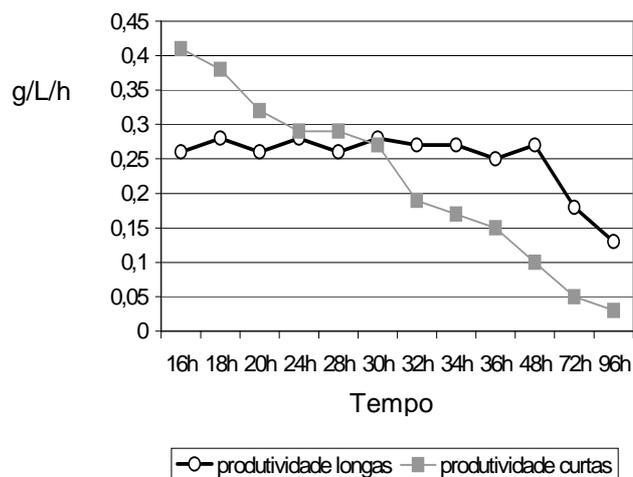


FIGURA 4. Produtividade (g/L/h) dos biopolímeros de fibra longa e curta em diferentes tempos de fermentação.

Os resultados demonstraram que em 30 e 72 h ocorreu a maior produção, mas a maior produtividade foi obtida em 48 h de fermentação.

3.3 - Viscosidade

A *Tabela 1* apresenta os resultados da análise de viscosidade das soluções aquosas de biopolímeros a 1% obtidos em diferentes tempos de fermentação medidas a 25° C, nas taxas de deformação de 6, 12, 30 e 60 rpm e a *Figura 5* somente em 30 rpm. A maior viscosidade encontrada foi a do biopolímero de fibra longa após 72 horas de fermentação.

TABELA 1. Viscosidade aparente de soluções aquosas a 1% (m/v) de biopolímeros obtidos em diferentes tempos de fermentação, medida a 25°C, em 6, 12, 30 e 60 rpm.

Tempo	Tipo de fibra	Viscosidade aparente (Pas)			
		6 rpm	12 rpm	30 rpm	60 rpm
16 h	FL*	75	75	75	65
	FC**	25	25	30	30
18 h	FL	25	37,5	40	37,5
	FC	25	37,5	35	35
20 h	FL	50	37,5	40	37,5
	FC	50	50	60	55
24 h	FL	50	62,5	60	55
	FC	25	37,5	40	37,5
28 h	FL	75	87,5	85	75
	FC	25	25	20	20
30 h	FL	75	87,5	90	82,5
	FC	75	75	90	65
32 h	FL	150	150	135	115
	FC	75	75	85	65
34 h	FL	150	150	140	120
	FC	75	75	75	65
36 h	FL	100	100	100	90
	FC	75	62,5	75	60
48 h	FL	325	312,5	250	200
	FC	75	62,5	65	60
72 h	FL	600	525	390	287,5
	FC	65	65	70	65
96 h	FL	425	387,5	305	235
	FC	60	60	65	60

* FL: polímero de fibra longa

**FC: polímero de fibra curta

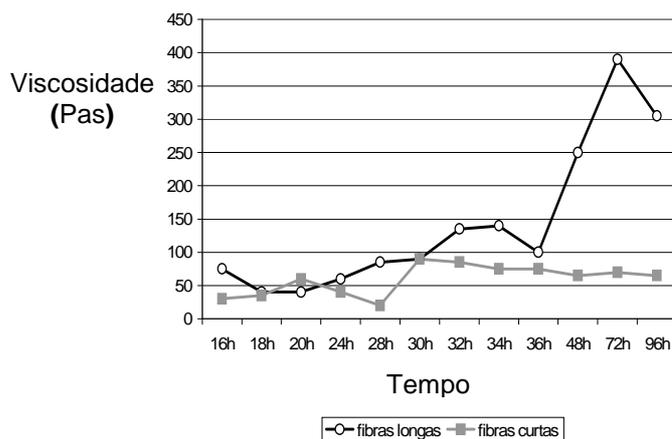


FIGURA 5. Viscosidade aparente de soluções aquosas a 1% (m/v) de biopolímeros obtidos em diferentes tempos de fermentação, medida a 25°C, 30 rpm.

Como podemos observar na *Figura 5*, em geral, os polímeros de fibra longa apresentaram maior viscosidade, e a viscosidade dos de fibra curta permaneceu praticamente estável ao longo do tempo. Até 24 h de cultivo, as viscosidades dos polímeros de fibra longa e curta permaneceram similares e a partir daí, a viscosidade dos de fibra longa foi aumentando progressivamente apresentando somente um decréscimo em 36 h. Em 30 h de cultivo, que foi o tempo em que houve um equilíbrio na quantidade de polímeros de fibras longas e curtas, a viscosidade destes foi igual. PADILHA [11] encontrou em 24 e 36 h de produção maior viscosidade em polímeros de fibra curta do que de fibra longa. Neste trabalho, nos mesmos períodos as viscosidades dos polímeros de fibra longa e curta foram semelhantes.

Entre 18 e 72 h a produtividade decaiu 35,8% e neste mesmo período a viscosidade aumentou 97,5%, o que é mais importante.

A viscosidade aparente de soluções aquosas de biopolímeros a 1%, medidas a 30 rpm obtidas após 72 h de cultivo por VENDRUSCOLO [19] foi de 510 Pas, enquanto a encontrada nesse estudo do polímero de fibra longa no mesmo período foi de 390 Pas. No primeiro foi utilizado meio de crescimento de células e no segundo não.

Em estudos anteriores, foi observado que a viscosidade de soluções aquosas do polissacarídeo produzido por bactérias do gênero *Beijerinckia* foi maior que a de soluções similares de xantana e a viscosidade foi estável a uma ampla faixa de temperaturas bem como à variação de pH de 3 a 12 [20].

Os biopolímeros de 16, 18, 20, 24, 28, 30, 32, 34 e 36 h apresentaram comportamento praticamente newtoniano e os de 48, 72 e 96 h, comportamento pseudoplástico. Os obtidos após 72 e 96 h por VENDRUSCOLO [19] também apresentaram comportamento pseudoplástico. Soluções aquosas de outros biopolímeros, como a xantana, também são altamente pseudoplásticas [16].

Em um estudo realizado por BUENO & GARCIA-CRUZ [1] com a bactéria do gênero *Pseudomonas*, foi verificada a influência do tempo de fermentação em 24, 48 e 72 h, utilizando-se dois caldos de fermentação diferentes. Em um caldo, a fonte de carbono utilizada foi a glicose e no outro, a sacarose na concentração de 2,0%. Os biopolímeros apresentaram comportamento pseudoplástico e a maior viscosidade aparente obtida foi também em 72 h de fermentação. O meio contendo sacarose produziu fluídos mais viscosos em 24 e 48 h e o contendo glicose produziu fluídos mais viscosos somente após 72 h de fermentação.

Biopolímeros de alto peso molecular geralmente exibem uma série de propriedades úteis incluindo alta viscosidade, e outras de particular interesse para indústria de alimentos devido a suas propriedades de emulsão estabilizante [14]. Alginatos bacterianos normalmente produzem soluções altamente viscosas, em que a viscosidade é dependente da massa molecular dos polissacarídeos [16].

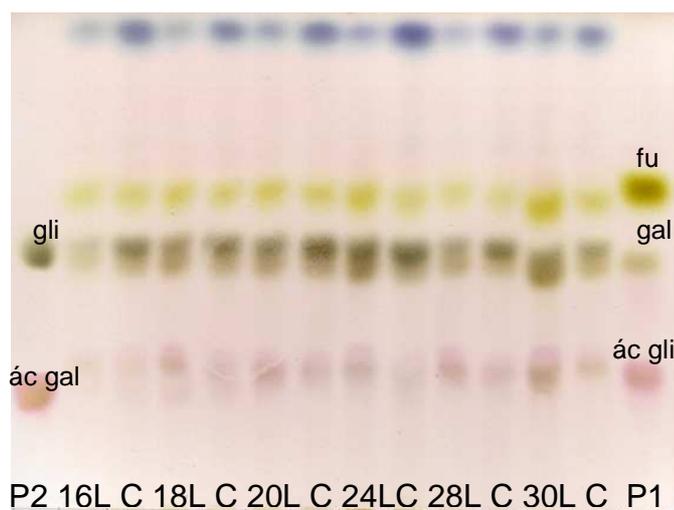
No estudo de SHEPHERD et al [14] nove organismos testados produziram emulsificantes extracelulares tão bons quanto os controles positivos goma arábica e carboximetilcelulose. Entre estes está o biopolímero produzido pela *Beijerinckia indica* ss. *lacticogenes*. Este é conhecido como indican e é um polissacarídeo com propriedades lipofílicas [18]. O biopolímero indican deve sua propriedade lipofílica à combinação de aspectos estruturais que incluem uma cadeia linear altamente acetilada (15-20%) e ao alto conteúdo de desoxi ramnose.

Uma série de texturas de gel pode ser produzida através do controle do nível de acetilação do polímero [7]. Para os polissacarídeos da família das gelanas, a viscosidade intrínseca como uma função da força iônica depende da sua estrutura e da presença ou ausência de grupos acetil. A energia do gel depende dos cátions presentes. DONER E DOUDS [4] recentemente demonstraram a importância da forma dos sais deste polissacarídeo nas suas propriedades de gelatinização e esta seria claramente afetada pelas condições de crescimento utilizadas para sua produção e pelos procedimentos utilizados no processo pós-fermentação.

As propriedades reológicas do biopolímero devem ser contínuas durante mudanças na temperatura, pH e força iônica. O conhecimento sobre as propriedades dos biopolímeros, principalmente a viscosidade e o comportamento reológico são importantes para futuras aplicações industriais, refletem sua estrutura química primária e servem para prever em quais produtos podem ser utilizados [13].

3.4 - Análise cromatográfica

A *Figura 6* apresenta o resultado da análise cromatográfica dos biopolímeros hidrolisados em diferentes tempos de fermentação.



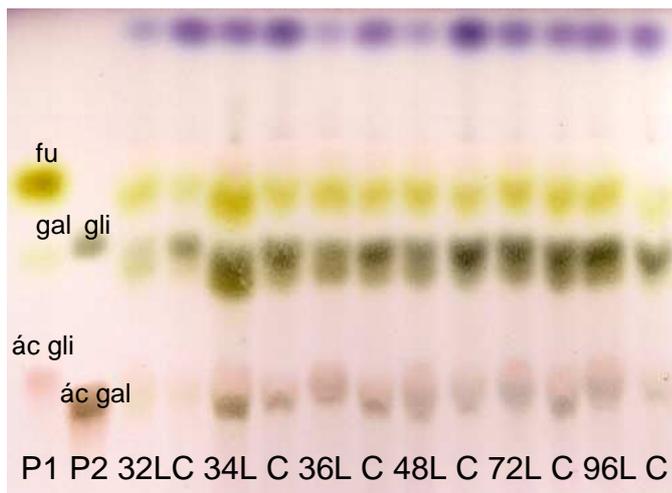


FIGURA 6. Análise cromatográfica (CCDC) das amostras de biopolímeros hidrolisados (L: fibras longas; c: fibras curtas). Padrões utilizados: fucose, galactose e ácido glicurônico (P1) e glicose e ácido galacturônico (P2). Eluente: clorofórmio: metanol: ácido acético: água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Observou-se na *Figura 6* que todos os biopolímeros apresentaram os mesmos componentes: glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico, mas em intensidades diferentes. Como SCAMPARINI et al [14] utilizando métodos espectrométricos e cromatográficos mais precisos não detectaram o ácido glicurônico, é possível que este seja um produto de degradação surgido durante a hidrólise. Todos os biopolímeros de fibra curta apresentaram maior teor de glicose e os de fibra longa apresentaram, geralmente, maior teor de ácido glicurônico.

A análise de outras cepas e espécies de *Beijerinckia* tem revelado polissacarídeos com diferentes composições. O polímero de *Beijerinckia mobilis* apresentou alto conteúdo de ácido L-glicurônico [2]. O polissacarídeo CV-70 obtido por fermentação aeróbica de *Beijerinckia* sp contém glicose, fucose, e resíduos de galactose em uma proporção de 3:1:3, todos na forma piranosídica [13]. A bactéria do solo *Beijerinckia indica*, que é também capaz de fixar nitrogênio, produz um polissacarídeo no qual glicose, ramnose e ácido glicurônico estão presentes em uma fração polar aproximada 6.6:1.5:1.0. O

conteúdo acetil do polímero é 9% [6]. Para a produção do polissacarídeo em laboratório foi usado um meio contendo nitrogênio com 3% de glicose.

Alguns componentes tais como D-glicose, D-manose, D-galactose e D-ácido glicurônico ocorrem muito frequentemente, outros como L-ramnose ou L-fucose são menos comuns e o D-ácido manurônico e o L-ácido glicurônico são raros [15].

A composição do biopolímero influencia no seu comportamento reológico. A gelatinização da xantana é amplamente afetada especialmente pela relação D-manose:D-galactose [16].

Os exopolissacarídeos ácidos produzidos pela maioria das bactérias fitopatogênicas são altamente aniônicos. Os homopolímeros incluem glicanas, levanas e alginatos. Os heteropolímeros são polímeros ácidos compostos de arranjos lineares de unidades repetitivas de açúcares neutros, ácido glicurônico e radicais de acetato, piruvato, hidroxibutirato e succinato [17].

Segundo MOREIRA et al. [9], a semelhança estrutural existente entre os monossacarídeos dificulta a sua separação nos métodos cromatográficos clássicos, como a Cromatografia em Camada Delgada Comparativa. No entanto, estes métodos são os mais simples e econômicos, indicados quando o volume e frequência de análises não justificam o emprego de métodos instrumentais complexos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os resultados da análise cromatográfica mostraram que os biopolímeros que continham aparentemente maior teor de fucose e galactose foram também os mais viscosos.

4 - CONCLUSÕES

- Em 30 e 72 h ocorreu a maior produção total de biopolímero, que se deve, provavelmente à maior presença de enzimas polimerizantes nestes períodos. A produção de polímeros de fibra longa aumentou com o tempo e a de fibra curta diminuiu, possivelmente pela ação de enzimas que foram polimerizando esses fragmentos. Em 30 h ocorreu um equilíbrio entre a quantidade de fibras longas e curtas produzidas. As fibras dos polímeros de fibras longas tornaram-se ainda mais longas com o tempo.
- A maior produtividade encontrada foi após 48 h de fermentação. A produtividade dos polímeros de fibra longa permaneceu praticamente constante e a dos de fibra curta decresceu com o passar do tempo.
- Em 72 h de fermentação foi encontrada a maior viscosidade e o polímero foi de fibra longa. Em geral, os polímeros que apresentaram maior viscosidade foram os de fibra longa, e a viscosidade dos de fibra curta permaneceu praticamente estável ao longo do tempo. A viscosidade de ambos foi igual em 30 h de cultivo, onde houve um equilíbrio na quantidade de polímeros de fibras longas e curtas. Os biopolímeros de 16 a 36 h apresentaram comportamento praticamente newtoniano e os de 48, 72 e 96 h, comportamento pseudoplástico.
- Todos os biopolímeros apresentaram os mesmos componentes: glicose, fucose, galactose e ácido glicurônico, mas com intensidades diferentes e todos os de fibra curta apresentaram maior teor de glicose. Os biopolímeros de fibra longa apresentaram, geralmente, maior teor de ácido glicurônico. Foi observado também que o teor de fucose e galactose influenciou na viscosidade.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BUENO, S.M., GARCIA-CRUZ, C.H. Influência do tempo de fermentação e presença de sais na reologia do caldo de fermentação de uma bactéria do gênero *Pseudomonas* isolada do solo. **XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Fortaleza, CE, 8-10 de agosto de 2000.
- [2] COOKE, A. A., PERCIVAL, E. Structural investigation of the extracellular polysaccharides elaborated by *Beijerinckia mobilis*. **Carbohydrate Research**, v. 43, p.117-132, 1975.
- [3] COPLIN, D.L., COOK, D. Molecular-genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, p. 271-279, 1990.
- [4] DONER, L. W., DOUDS, D. D. Purification of commercial gellan to monovalent cation salts result in acute modification of solution and gel-forming properties. **Carbohydrate Research**, v. 273, p. 225-233, 1995.
- [5] JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides. New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, p. 34-39, may, 1974.
- [6] KANG, K. S., McNEELY, W. PS-7 – A new bacterial heteropolysaccharide, L. In: SANDFORD, P. A. & LASKIN, A. (Ed) **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington: D. C. American Chemical Society, 1977. P.220-230.
- [7] KANG, K. S., VEEDER, G. T. US Patent 4326053, 1982.
- [8] MALDONADE, I.R. Contribuição ao estudo dos parâmetros de fermentação por *Beijerinckia sp.* Campinas, 1996. Exame de Qualificação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [9] MOREIRA, A. S., SOUZA, A. S., VENDRUSCOLO, C. T. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia e camada delgada: metodologia. **Agrociência**, v.3, p. 222-224, 1998.
- [10] PACE, G. N. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v.15, p. 41-70, 1980.

- [11] PADILHA, F. F. Estudo da compartimentalização das enzimas para produção de biopolímeros por *Beijerinckia sp.* 7070. Pelotas, 1997. Exame de Qualificação (Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).
- [12] RINAUDO, M. On the relation structure-properties of some polysaccharide used in the food industry. **Food Hydrocolloids**, p. 510, 1993
- [13] SCAMPARINI, A.; MARIUZZO, D.; FUJIHARA, H.; JACOBUSI, R.; VENDRUSCOLO, C. Structural studies of CV-70 polysaccharide. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 115-121, 1997.
- [14] SHEPHERD, R., ROCKEY, J., SUTHERLAND, I. W., ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995.
- [15] SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**. Edinburgh, 1982. Cap.23, p. 79-106.
- [16] SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 249-261, 1997.
- [17] SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides - structure and function. **International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology**, v.113, p. 187-231, 1988.
- [18] SYMES, K. C. Lipophilic polysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 2, p. 276-279, 1982.
- [19] VENDRUSCOLO, C.T. Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia sp* isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil. Campinas, 1995. Exame de Qualificação (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [20] VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. Gellan gum – production and properties. In: NISHINARI, K.; DOI, E. (Ed) **Food hydrocolloids**, New York: Plenum Press, 1993.

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS VIA ENZIMÁTICA ATRAVÉS
DE INATIVAÇÃO E LISE CELULAR E COM CÉLULAS VIÁVEIS DE
Beijerinckia sp. 7070**

Ângela Nunes MOREIRA, Francisco A. B. DEL PINO, Claire Tondo
VENDRUSCOLO

RESUMO

Biopolímeros são polissacarídeos extracelulares produzidos por microrganismos. A *Beijerinckia* sp. 7070 produz o biopolímero denominado clairana®. Biopolímeros podem ser produzidos utilizando enzimas purificadas (via enzimática). O objetivo desse trabalho foi avaliar a possibilidade de produzir o biopolímero clairana® via enzimática; verificar se a síntese e as enzimas envolvidas na síntese são intra e/ou extracelulares; se as enzimas permanecem ativas no meio e, estudar a produção do biopolímero por esse processo, através de inativação e lise celular, e pelo processo convencional com células viáveis. As amostras foram cultivadas com a bactéria em meio líquido, submetidas a morte celular por inativação e lise celular após 30 h, e retiradas em três períodos, junto com amostras produzidas com células viáveis. O mesmo procedimento foi realizado em 46 h. Os polímeros foram recuperados, secos, pesados e analisados. Os resultados sugerem que é possível produzir o biopolímero clairana® via enzimática; que, provavelmente enzimas intra e extracelulares estão envolvidas, permanecendo ativas no meio e começando a atuar antes de 30 h de fermentação e que o processo via enzimática através de lise foi mais eficiente pois libera os polissacarídeos produzidos intracelularmente para o meio externo.

Palavras-chave: biopolímeros, enzimas, produção, via enzimática.

SUMMARY

STUDY ON THE BIOPOLYMER PRODUCTION BY ENZYMATIC PATHWAY THROUGH CELLULAR INACTIVATION AND LYSE AND WITH VIABLE CELLS BY *Beijerinckia* sp. 7070. Biopolymers are extracellular polysaccharides produced by microorganisms. *Beijerinckia* sp. 7070 produces the biopolymer denominated as clairana®. Biopolymers can be produced using purified enzymes (by enzymatic pathway). The aim of this work was to evaluate the possibility to produce the clairana® biopolymer using purified enzymes; to verify if the synthesis and the enzymes involved in the synthesis are intra and/or extracellular; if the enzymes remain active in the medium and, to study biopolymer production for this process, through cellular inactivation and lyse, and trough conventional process with viable cells. The samples were cultivated with bacteria in liquid medium, were subjected to cellular death through cellular inactivation and lyse after 30 h, and were removed in three different times, together with samples produced with viable cells. The same procedure was performed after 46 h. The polymers were recovered, dried, weighed and analyzed. The results suggest that it is possible to produce the clairana® biopolymer by enzymatic pathway; that, probably, intra and extracellular enzymes are involved, remaining active in the medium and beginning to act before 30 h of fermentation and the enzymatic pathway process through cellular lyse is more effective, because it releases the polysaccharides intracellularly produced to medium.

Keywords: biopolymers, enzymes, production, enzymatic pathway.

1 – INTRODUÇÃO

Biopolímeros são polissacarídeos extracelulares produzidos por microrganismos, que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso. A produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) é muito comum em muitos gêneros de bactérias. Esses EPS podem formar uma cápsula ao redor da célula ou podem ser excretados para o meio ambiente

como um muco [3]. O biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 é denominado clairana®.

A produção de biopolímeros em meio líquido pode ser cultivando o microrganismo em meio contendo fonte de carbono e sais minerais. Este é o processo utilizado atualmente para produção de biopolímero por *Beijerinckia* sp. 7070. Outro tipo de produção, em meio líquido, é por via enzimática, ou seja, utilizando enzimas purificadas (sem a ação da bactéria). As enzimas são, primeiramente, produzidas e purificadas e depois, utilizadas para síntese do polímero em meio contendo substrato.

O processo via enzimática é utilizado, por exemplo, na produção de dextrana, que é um homopolissacarídeo do qual são conhecidas a via metabólica e a enzima indutora do processo.

Um grande número de seqüências de proteínas envolvidas na biossíntese de polissacarídeos tornou-se disponível durante os últimos anos, principalmente devido à clonagem e seqüenciamento dos genes correspondentes [5].

As glicanassacarases são enzimas extracelulares produzidas, principalmente, por *Leuconostoc mesenteroides*, espécies de *Streptococcus* e bactérias lácticas. Estas enzimas catalisam a síntese de polímeros de D-glicose de alto peso molecular, com diferentes estruturas, chamados glicanas, a partir da transferência de resíduos glicosil vindos da clivagem da sacarose [15]

A dextrana é produzida pela enzima dextranassacarase. Esta é uma glicosiltransferase extracelular que catalisa a clivagem da sacarose; a transferência de resíduos glicosil a partir dessa clivagem para a cadeia de crescimento da dextrana; a formação de ligações glicosídicas usando um açúcar difosfo nucleotídeo como o açúcar doador e a liberação de frutose [2, 4, 5].

A levana é um polímero de frutose de alto peso molecular, altamente ramificado, sintetizado por uma simples exoenzima, a levanassacarase [8].

A biossíntese de dextrana e levana não implicam sistemas multienzimáticos, açúcares ativados e lipídio carregador intermediário. Sua produção é extracelular e utiliza enzimas que catalisam a polimerização de um oligossacarídeo. Os controles sobre a atividade e o modo de ação destas enzimas polimerizantes podem ser exercidos manipulando o ambiente [13].

Enzimas biossintéticas são necessárias para formação de açúcares nucleotídeos UDP-D-ácido glicurônico e dTDP-L-ramnose, que são doadores de monômeros para biossíntese de unidades tetrassacarídicas repetitivas para produção de gelana [11, 12].

A biossíntese de xantana é mais complexa e segue os seguintes passos: (1) síntese de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples; (2) transferência de monossacarídeos, a partir do nucleotídeo correspondente para o lipídeo carregador localizado na membrana da célula, para formar a unidade pentassacarídica repetitiva; (3) adição de grupos acetil e piruvato, que são obtidos a partir de acetil-coA e fosfoenolpiruvato, respectivamente; e (4) polimerização e excreção do polissacarídeo. O local preciso do processo de polimerização e o estágio final da secreção do EPS a partir da membrana citoplasmática, envolvendo a passagem através do periplasma e membrana exterior e a excreção no ambiente extracelular, ainda são pouco elucidados [6, 17, 18]. Alguns autores consideram que primeiro ocorre a polimerização das unidades pentassacarídicas no interior da célula, e após a excreção do polissacarídeo no exterior [3, 6, 7, 9, 18]. Já, segundo KÖPLIN *et al.* [10], as unidades pentassacarídicas são secretadas e após polimerizadas.

Na produção de EPS por bactérias Gram-positivas, como *Leuconostoc mesenteroides*, enzimas lipoprotéicas extracelulares estão envolvidas e são secretadas na superfície da célula. Já a síntese de EPS (hetero e homopolissacarídeos) por bactérias Gram-negativas é intracelular [18] e instável em diferentes espécies bacterianas, como *Xanthomonas campestris* [11]. Estudos bioquímicos e fisiológicos, demonstram que a síntese de xantana é similar a biossíntese de exopolissacarídeos de outras bactérias Gram-negativas [10, 16]. A *Beijerinckia* sp. 7070 é uma bactéria Gram-negativa, e a sua via biossintética ainda não é conhecida.

O estudo da produção de bioplímeros via enzimática é de grande importância pois, além de diminuir os riscos de contaminação, reduz os custos industriais do processo e ainda possibilita a obtenção de produtos com melhores características.

Por isso, os objetivos desse trabalho foram: avaliar a possibilidade de produzir o biopolímero clairana® via enzimática; verificar se a síntese e as

enzimas envolvidas na síntese são intra e/ou extracelulares; se as enzimas envolvidas na síntese e na degradação do biopolímero permanecem ativas no meio, mesmo sem a ação de célula bacteriana; e estudar a produção do biopolímero clairana® pelo processo via enzimática, através de inativação e lise celular, e pelo processo convencional com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Microrganismo e caracterização morfo-fisiológica e bioquímica

A bactéria utilizada foi a *Beijerinckia* sp. 7070 isolada por VENDRUSCOLO [19], produtora do biopolímero clairana®. Esta bactéria foi caracterizada bioquimicamente e liofilizada para ser utilizada em todo experimento.

2.2 - Antibiograma

Foi realizado um antibiograma utilizando o Método de Kirby-Bauer, com o objetivo de determinar quais antibióticos inibem a reprodução celular de *Beijerinckia* sp. 7070. Foram testados os antibióticos: ácido pepimídico (20 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg,) kanamicina (30 µg), oflaxacina (5 µg), rifampicina (30µg), tobramicina (10 µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30 µg). Primeiramente, placas com meio YM ágar foram semeadas com a bactéria e os discos colocados a uma distância de 15 mm entre eles e entre as bordas da placa. As placas foram incubadas a 28° C por 24 h e depois observadas para verificação da presença de halos de inibição (zonas claras ao redor dos discos). Os diâmetros desses halos foram medidos e, com o auxílio da Tabela do Boletim COBA da Sociedade Brasileira de Microbiologia [1], foi determinado se a bactéria em teste é considerada sensível, moderadamente sensível (sensibilidade intermediária) ou resistente aos antibióticos.

2.3 - Determinação da CIM pela Técnica da Diluição em Tubos

Para avaliar a viabilidade da produção via enzimática, é preciso obter o caldo de fermentação com as enzimas purificadas secretadas sem a presença de metabolismo celular. Por isso é necessário lisar ou inativar a bactéria. A técnica utilizada para determinação da concentração inibitória mínima, ou seja, a menor concentração de antibiótico necessária para causar a morte celular da bactéria, foi a de Diluição em Tubos. A tetraciclina, por ser um dos antibióticos ao qual a cepa apresentou sensibilidade e por causar inativação celular, foi adicionada em concentrações crescentes em tubos contendo o meio de crescimento YM e a bactéria. As condições do experimento foram: 28°C, 180 rpm por 24 h em incubador com agitação. Após esse período os tubos foram observados visualmente e os que se apresentaram turvos, indicaram crescimento celular e os límpidos, inibição do crescimento. Leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm e com os resultados, foram calculados os números aproximados de células viáveis por mL em cada concentração do antibiótico e assim, determinada a menor concentração de tetraciclina necessária para causar a inativação.

2.4 - Produção e produtividade de biopolímeros utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas.

Para avaliar a possibilidade de produzir o biopolímero clairana® via enzimática; verificar se a síntese e as enzimas envolvidas nesta são intracelulares; se enzimas de síntese e de degradação permanecem ativas no meio, após serem liberadas; e para avaliar se a produção e produtividade do polímero podem ser influenciadas pelo método de produção utilizado (produção via enzimática após inativação e após lise celular, e produção convencional com células viáveis) foi realizada produção com morte celular em dois períodos (30 e 46 h) com conseqüente continuação da fermentação.

A produção de biopolímeros foi realizada por fermentação aeróbica em batelada, em incubador agitador New Brunswick Scientific, modelo Innova 4230. O inóculo de 1 mL de suspensão bacteriana com 1×10^{10} UFC/mL, preparado a partir de colônias de 24 h de crescimento, foi acrescentado a 100 mL de meio líquido de produção YM estéril, contendo (g.L⁻¹): (1) K₂HPO₄ 2,0,

MgSO₄ 7H₂O 2,7, KH₂PO₄ 13,62; (2) extrato de levedura 0,2, triptose 2,0; (3) sacarose 50,0, através de metodologia de VENDRUSCOLO [19] modificada por PADILHA [14].

Em tempo zero, todas amostras contendo o meio adicionado de inoculo foram submetidos às condições de incubação: 24°C, 1 80 rpm. Após 30 h de fermentação, parte dessas amostras foi submetida à morte celular através de lise com o uso de ultrassom (amplitude de 60 Hz e pulso de 3 s por 10 min), e inativação celular, pela adição do antibiótico tetraciclina, na concentração recomendada. Foi adicionado ainda, em ambas amostras, azida sódica. Após, seguiu-se o processo de produção e amostras de meio fermentado com células lisadas, inativadas e viáveis (controles) foram retiradas simultaneamente em três tempos diferentes: 32, 46 e 54 h. Outra parte das amostras foi submetida à morte celular, pelos mesmos procedimentos, em 46 h, sendo as amostras retiradas em 48, 52 e 54 h. Todas amostras foram retiradas em triplicata. Os meios fermentados de cada amostra foram centrifugados, para remoção das células, a 16000 g, à temperatura de 4° a 14°C por 20 minutos em centrífuga refrigerada. Adicionou-se etanol 95% ao sobrenadante, na proporção de 1:4 (v/v), para recuperação dos biopolímeros, sendo estes secos em estufa a 56°C até atingir peso constante, pesados e triturados. A produção (g/L) de biopolímero das amostras com células lisadas e inativadas em 30 e 46 h e intactas retiradas em cada tempo foram avaliadas pelo peso do produto seco por volume de meio. A produtividade (g/L/h) foi avaliada pelo peso do produto seco por volume de meio e pelo tempo de fermentação.

2.5 – Análise estatística

O teste aplicado foi a análise de variância ANOVA, para verificar se existem diferenças significativas entre os tratamentos. Após aplicou-se o teste de Tuckey, para verificar entre quais tratamentos ocorreu a diferença.

3.2 – Antibiograma

A *Tabela 2* apresenta os resultados do antibiograma realizado com a bactéria *Beijerinckia* sp. 7070 frente a doze antibióticos diferentes, pelo Método de Kirby-Bauer, utilizando a Tabela do Boletim COBA da Sociedade Brasileira de Microbiologia [1].

TABELA 2. Teste de sensibilidade da *Beijerinckia* sp. 7070 frente aos seguintes antibióticos, pelo Método de Kirby-Bauer.

Antibiótico	Sensibilidade ou Resistência
Ácido pepimídico (20 µg)	Sensível
Amicacina (30 µg)	Sensível
Ampicilina (10 µg)	Resistente
Cefalotina (30 µg)	Sensível
Cloranfenicol (30 µg)	Sensível
Estreptomicina (10 µg)	Moderadamente sensível
Kanamicina (30 µg)	Resistente
Oflaxacina (5 µg)	Moderadamente sensível
Rifampicina (30 µg)	Sensível
Tetraciclina (30 µg)	Sensível
Tobramicina (10 µg)	Resistente
Vancomicina (30 µg)	Resistente

Pela *Tabela 2*, podemos observar que a *Beijerinckia* sp. 7070 é sensível aos antibióticos: ácido pepimídico, amicacina, cefalotina, cloranfenicol, rifampicina e tetraciclina; resistente a ampicilina, kanamicina, tobramicina e vancomicina e moderadamente resistente a estreptomicina e oflaxacina.

3.3- Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima de tetraciclina para *Beijerinckia* sp. 7070 foi de 300 µg/mL.

3.4 - Produção e produtividade de biopolímeros utilizando células viáveis, inativadas e lisadas

Os resultados das médias de produção das amostras de biopolímeros utilizando células inativadas e lisadas em 30 h e células viáveis, retiradas em 32, 46 e 54 h estão na *Tabela 3*, e dos produzidos com células inativadas e lisadas em 46 h e células viáveis, retirados em 48, 52 e 54 h estão na *Tabela 4*.

TABELA 3. Médias da produção de biopolímeros utilizando células inativadas e lisadas em 30 h e células viáveis, retiradas em 32, 46 e 54 h.

	Produção (g/L) dos biopolímeros		
	cél. inativadas	cél. lisadas	cél. viáveis
32 h	19,6	18	17,2
46 h	16,8	17,4	18,6
54 h	14	16,6	21,8

TABELA 4. Médias da produção de biopolímeros utilizando células inativadas e lisadas em 46 h e células viáveis, retiradas em 48, 52 e 54 h.

	Produção (g/L) dos biopolímeros		
	cél. inativadas	cél. lisadas	cél. viáveis
48 h	17,8	19,4	19,2
52 h	16,8	18	17,4
54 h	14,6	17	21,8

Na produção de biopolímeros utilizando células viáveis, inativadas e lisadas, observou-se, pelas *Tabelas 1 e 2* e pela *Figura 1*, que utilizando células viáveis (controle), ocorreu um aumento progressivo na produção de biopolímero de 30 a 46 h e de 46 a 54 h de cultivo. Já, pela *Figura 2*, observou-se que, na verdade, entre 46 e 54 h ocorreu um declínio em 52 h e após um novo aumento. Os períodos de aumento na produção se devem, provavelmente, a maior presença de enzimas polimerizantes (polimerases) atuando no meio e o período de declínio, de enzimas polissacarídeo liases que degradam parte do polímero formado. A presença de polissacarases ou polissacarídeo liases degradadoras do EPS produzido pela bactéria é um

problema encontrado tanto em laboratórios como em produções comerciais. Essas enzimas são, geralmente, produtos intracelulares localizados no periplasma. Se as células forem lisadas durante a cultura, as enzimas podem ser liberadas no meio extracelular e degradar o polímero. Outra hipótese é que essas enzimas podem ser secretadas normalmente pela bactéria. A *X. campestris* produz uma celulase e o *Sphingomonas paucimobilis* produz uma gelana liase [17].

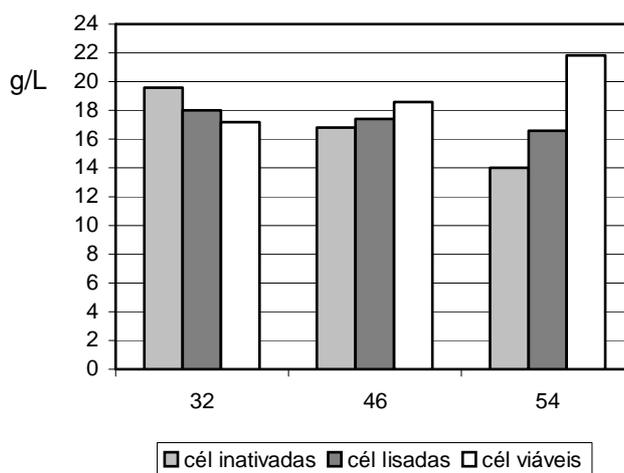


FIGURA 1. Produção de biopolímero (g/L) por células inativadas e lisadas em 30 h de cultivo e por células viáveis, retiradas em 32, 46 e 54 h.

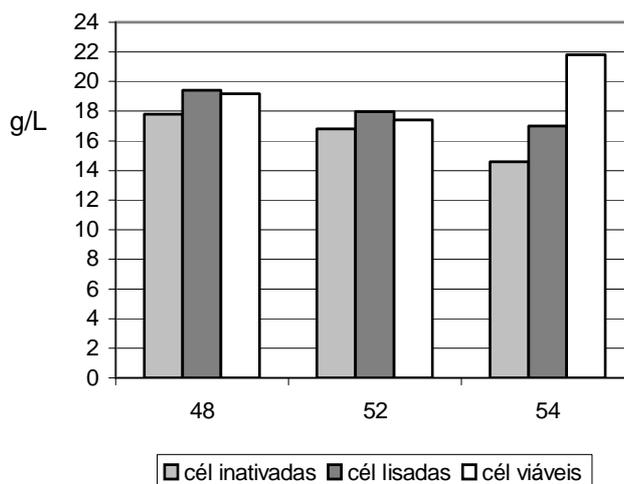


FIGURA 2. Produção de biopolímero (g/L) por células inativadas e lisadas em 46 h de cultivo e por células viáveis, retiradas em 48, 52 e 54 h.

Observou-se também, pelas *Tabelas 1 e 2* e pela *Figura 1*, que as primeiras amostras retiradas após a morte celular em 30 h (32 h), tanto por lise como por inativação celular, apresentaram maior produção de biopolímero do que os respectivos controles (com células viáveis), pois provavelmente neste período existiam mais polimerases atuando do que polissacarídeo liases. Já nas amostras tratadas em 46 h (*Figura 2*), somente as amostras produzidas com células lisadas apresentaram maior produção de polímero do que as com células viáveis (amostras retiradas em 48 e 52 h). Além disso, quase todas amostras produzidas com células lisadas com ultrassom apresentaram maior produção de biopolímero do que as inativadas por tetraciclina, sendo que a única exceção foi a amostra com células inativadas em 30 h retirada em 32 h. A amostra produzida com células lisadas em 30 h retirada em 32 h e as com células lisadas em 46 h retiradas em 48 e 52 h apresentaram maior produção do que as amostras dos respectivos horários produzidas com células viáveis.

Esses resultados sugerem que, provavelmente, a produção por *Beijerinckia* sp. 7070 seja similar a de *Xanthomonas campestris*, onde as unidades pentassacarídicas são produzidas intracelularmente, polimerizadas e excretadas para o exterior [2, 5, 6, 8, 17]. A lise celular causou a liberação dos polissacarídeos, que estavam prontos no interior da célula, para o exterior e liberação das polimerases que, provavelmente, agiram polimerizando os oligossacarídeos também liberados.

O estágio final da secreção da xantana no ambiente extracelular, ainda não é bem esclarecido, assim como o local preciso do processo de polimerização [5, 16, 17]. Segundo Köplin et al. [9], as unidades pentassacarídicas são secretadas e após polimerizadas. Então, nesse caso a lise causaria a liberação dos oligossacarídeos e estes seriam polimerizados por polimerases extracelulares.

Os resultados também sugerem que há várias enzimas envolvidas no processo de síntese e que, provavelmente, a maioria das enzimas são intracelulares e já estão ativas em 30 horas. A síntese de EPS requer, então, enzimas para produção de cada açúcar nucleotídeo precursor; glicosiltransferases para as adições dos açúcares; uma ou mais polimerases, para a polimerização dos oligossacarídeos, e proteínas envolvidas na exportação do polissacarídeo para o meio extracelular [2].

Em 46 horas, provavelmente maiores quantidades de polissacarídeos estavam prontos no interior da célula e foram liberados para o exterior pela lise, pois ocorreu uma maior produção de biopolímero por células lisadas do que por células viáveis tanto 2 horas (em 48 h) como 6 horas após a lise (52 h). E houve somente um pequeno decréscimo nessa produção após 8 horas (54 h). Esse aumento na produção pode ser devido, também, a maiores quantidades de oligossacarídeos, secretados através da lise, polimerizados pelas polimerases também liberadas.

A maior produção de polímero pela amostra produzida com células inativadas em 30 h retirada em 32 h do que pela amostra com células lisadas no mesmo período sugere que em 30 h, há uma predominância de polissacarídeo liases no interior da célula que foram liberadas pela lise e atuaram degradando o polímero produzido.

As *Figuras 3 e 4* apresentam os resultados da produtividade dos biopolímeros (g/L/h) produzidos por células inativadas e lisadas em 30 e 46 h de cultivo e por células viáveis, retiradas nos três horários diferentes.

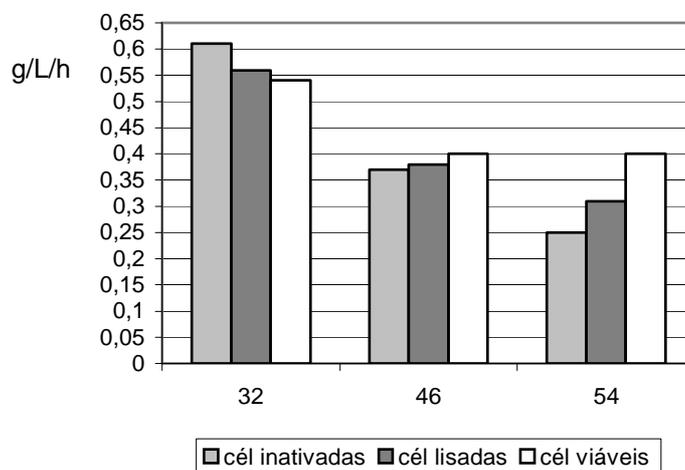


FIGURA 3. Produtividade de biopolímeros (g/L) produzidos por células inativadas e lisadas em 30 h de cultivo e por células viáveis, retiradas em 32, 46 e 54 h.

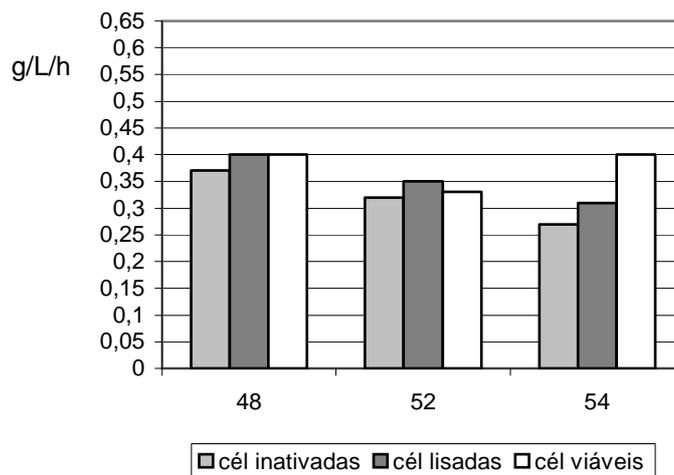


FIGURA 4. Produtividade de biopolímeros (g/L) produzidos por células inativadas e lisadas em 46 h de cultivo e por células viáveis, retiradas em 48, 52 e 54 h.

A produtividade das amostras produzidas com células viáveis apresentou um acentuado decréscimo de 32 a 46 h e permaneceu praticamente constante de 46 a 54 h, apresentando uma pequena queda em 52 h. Houve uma queda progressiva na produtividade das amostras lisadas e inativadas em 30 h e uma queda menos acentuada nas amostras tratadas em 46 h. A produtividade das amostras produzidas com células lisadas, em geral, foi maior do que a das com células inativadas (sendo menor somente na amostra tratada em 30 h retirada em 32 h) e, em alguns casos, foi maior do que a das amostras produzidas com células viáveis (32 e 52 h).

4 – CONCLUSÕES

- Os resultados sugerem que é possível produzir o biopolímero clairana® via enzimática;
- Provavelmente a maioria das enzimas responsável pela síntese do polímero é intracelular, mas deve existir polimerases extracelulares;
- As enzimas envolvidas na síntese e na degradação do biopolímero permanecem ativas no meio, após serem liberadas, mesmo sem a presença de célula bacteriana viva;

- As enzimas responsáveis pela produção e polimerização do biopolímero começam a atuar antes de 30 h de fermentação;
- Geralmente, a quantidade de polímero produzido pelo processo via enzimática através de lise celular foi maior do que a quantidade produzida por inativação e, em alguns casos, até mesmo maior do que a quantidade produzida pelo processo convencional com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. Uma explicação para esse fato seria que a lise celular causou a liberação dos polissacarídeos, que estavam prontos no interior da célula, para o exterior e liberação das polimerases que agiram polimerizando os oligossacarídeos também liberados.
- O processo utilizando células lisadas apresenta maior potencialidade para produção, pois além de apresentar maior produção de biopolímeros, não é necessário realizar centrifugação para remoção das células.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ANTUNES, G.S. **Manual de Diagnóstico Bacteriológico**. Porto Alegre: Editora da Universidade/ UFRGS, 1991. 109p.
- [2] ARGUELLO-MORALES, M., RUSSELL, R.R.B., MONCHOIS, V. Isolation of an Active Catalytic Core of *Streptococcus downei* MFE28 GTF-I Glucosyltransferase. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.7, p.2290-2292, 1999.
- [3] COPLIN, D.L. & COOK, D. Molecular Genetics of Extracellular Polysaccharide Biosynthesis in Vascular Phytopathogenic Bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.3, n.5, p.271-279, 1990.
- [4] DOLS, M., REMAUD-SIMEON, M., WILLEMOT, R.M., VIGNON, M., MONSAN, P. Characterization of the Different Dextranucrase Activities Excreted in Glucose, Fructose, or Sucrose Medium by *Leuconostoc mesenteroides* Nrrl B-1299. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.4, p. 1298-1302, 1998.
- [5] GEREMIA, R.A.E., PETRONI, A., IELPI, L., HENRISSAT, B. Towards a Classification of Glycosyltransferases Based on Amino Acid Sequence Similarities: Prokaryotic α -Mannosyltransferases. **Biochem J**, v. 318, p.133-138, 1996.

- [6] HARDING, N. E., CLEARY, J. M., IELPI, L. Genetics and Biochemistry of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, L. In: HUI, Y. H., KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**, VCH. P. 495-514, 1994.
- [7] HARDING, N.E., RAFFO, S., RAIMONDI, A., CLEARY, J. M., IELPI, L. Identification, Genetic and Biochemical Analysis of Genes Involved in Synthesis of Sugar Nucleotide Precursors of Xanthan Gum. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 447-457, 1993.
- [8] KASAPIS, S., MORRIS, E.R, GROSS, M., RUDOLPH, K. Solution Properties of Levan Polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseocola*, and its Possible Primary Role as a Blocker of Recognition during Pathogenesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 55-64, 1993.
- [9] KATSEN, F. D., FERREIRO, U., ODDO, C. G., IELMINI, M. V., BECKER, A., PUHLER, A., IELPI, L. *X. campestris* pv *campestris* Gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n.7, p 1607-1617, 1998.
- [10] KÖPLIN, R., ARNOLD, W., HÖTTE, B., SIMON, R., WANG. G.E., PÜHLER, A. Genetics of Xanthan Production in *X. campestris*: the *xanA* and *xanB* Genes are Involved In UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n.1, p.191-199, 1992.
- [11] MARTINS, L., SÁ-CORREIA, I. Temperature Profiles of Gellan Gum Synthesis and Activities of Biosynthetic Enzymes. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 20, p. 385-395, 1994.
- [12] MARTINS, L.O., FIALHO, A.M., RODRIGUES, P.L., SÁ-CORREIA, I. Gellan Gum Production and Activity of Biosynthetic Enzymes in *Sphingomonas paucimobilis* Muroid and Non-Muroid Variants. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 24, p. 47-54, 1996.
- [13] PACE, G. N. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v.15, p. 41-70, 1980.
- [14] PADILHA, F. F. Estudo da compartimentalização das enzimas para produção de biopolímeros por *Beijerinckia* sp. 7070. Pelotas, 1997. Exame de Qualificação (Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

- [15] ROBYT, J.F., KIMBLE, B.K., WALSETH, T.F. The Mechanism of Dextranase Action. Direction of Dextran Biosynthesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 165, p. 634-640, 1974.
- [16] SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides - structure and function. **International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology**, v.113, p. 187-231, 1988.
- [17] SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 249-261, 1997.
- [18] SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.
- [19] VENDRUSCOLO, C.T. Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil. Campinas, 1995. Exame de Qualificação (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [20] WILLIAMS & WILKINS. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, Baltimore. 1984.

**COMPORTAMENTO REOLÓGICO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO
BIOBOLÍMERO CLAIRANA® PRODUZIDO VIA ENZIMÁTICA ATRAVÉS DE
INATIVAÇÃO E LISE CELULAR E PRODUZIDO COM CÉLULAS VIÁVEIS
DE *Beijerinckia* sp. 7070**

Ângela Nunes MOREIRA, Angelita da Silveira MOREIRA, Patrícia Silva DIAZ,
Francisco A. B. DEL PINO, Claire Tondo VENDRUSCOLO

RESUMO

Os biopolímeros são usados como agentes espessantes, gelificantes e de suspensão e podem ser produzidos utilizando enzimas purificadas (via enzimática). O objetivo desse trabalho foi estudar o comportamento reológico e a composição química do biopolímero clairana® produzido utilizando enzimas purificadas, através de inativação e lise celular, e do biopolímero produzido com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. Amostras cultivadas com a bactéria, em meio líquido, foram submetidas à morte celular por inativação e lise celular em 30 e 46 h e retiradas em períodos diferentes junto com amostras produzidas com células viáveis. Os polímeros foram recuperados, secos e hidrolisados, para determinação da composição química, e solubilizados em água a 6%, para o estudo do comportamento reológico. Com relação à composição química, todas amostras apresentaram os mesmos componentes em intensidades diferentes e, com relação ao comportamento reológico, a maior viscosidade encontrada foi a do biopolímero produzido com células lisadas em 46 h retirado em 54 h e as maiores viscosidades encontradas, em geral, foram dos polímeros obtidos com células lisadas.

Palavras-chave: biopolímeros, enzimas, síntese, comportamento reológico, composição química.

SUMMARY

REOLOGICAL BEHAVIOUR AND CHEMICAL COMPOSITION OF THE CLAIRANA® BIOPOLYMER PRODUCED BY ENZYMATIC PATHWAY THROUGH CELLULAR INACTIVATION AND LYSE AND PRODUCED WITH VIABLE CELLS BY *Beijerinckia* sp. 7070. Biopolymers are used as thickening, gelling and suspending agents and can be produced using purified enzymes (by enzymatic pathway). The aim of this work was to study the reological behaviour and the chemical composition of the clairana® biopolymer produced using purified enzymes, through cellular inactivation and lyses, and of the biopolymer produced with viable cells by *Beijerinckia* sp. 7070. Samples cultivated with bacteria, in liquid medium, were subjected to cellular death through cellular inactivation and lyses after 30 and 46 h, and were removed in different periods together with samples produced at viable cells. The polymers were recovered, dried and hydrolyzed, for determination of the chemical composition and solubilized in water at 6%, to study the reological behaviour. Regarding the chemical composition, all samples presented the same components in different intensities and, regarding the reological behaviour, the highest viscosity found was of the biopolymer produced with cells lysed in 46 h removed in 54 h and the highest viscosities found, in general, were of the polymers taken from lysed cells.

Keywords: biopolymer, enzymes, synthesis, reological behaviour, chemical composition.

1– INTRODUÇÃO

Microrganismos produzem biopolímeros com aplicações potenciais em uma série de segmentos industriais. Na indústria de alimentos, são usados como agentes espessantes, de suspensão, gelificantes e em produtos da linha diet e light (como substitutos de gorduras ou como estruturantes ou espessantes). Os polissacarídeos extracelulares são de maior interesse industrial, devido a maior facilidade de extração e purificação. Para um biopolímero ter uma boa aplicabilidade, ele deve possuir propriedades

reológicas interessantes e contínuas durante mudanças na temperatura, pH e força iônica [10]. Além disso, deve ter composição química compatível com o metabolismo humano e aprovação prévia dos órgãos competentes, através de um rigoroso controle de qualidade, para serem utilizados em produtos para consumo humano, como alimentos, fármacos e cosméticos [8, 9].

Os exopolissacarídeos (EPS) sintetizados por células microbianas variam muito em sua composição e, conseqüentemente, em suas propriedades físicas e químicas [11]. As propriedades físicas de alguns EPS microbianos dependem de sua estrutura primária, secundária e terciária e da natureza das ligações nas cadeias. Em dextranas, por exemplo, ligações $\beta(1-4)$ conferem ao polímero rigidez, e $\alpha(1-2)$ conferem flexibilidade [13].

A estrutura de muitos polissacarídeos produzidos por bactérias Gram-negativas é relativamente simples, compreendendo homopolissacarídeos que, geralmente, são polímeros compostos de D-glicose, ou heteropolissacarídeos, que, normalmente, são compostos de unidades repetitivas regulares de dissacarídeos a octassacarídeos compostos de 2 a 4 tipos de monossacarídeos e ácido glicurônico, radicais de acetato, piruvato, hidroxibutirato e succinato [11, 13].

A produção de EPS microbianos fornece uma alternativa válida para substituição das gomas comumente usadas, como o amido e outros, através do desenvolvimento de produtos com propriedades praticamente idênticas ou, com melhores características reológicas, que podem ser usados para novas aplicações. Isto é devido à variedade de polissacarídeos sintetizados por microrganismos. Embora a composição desses polímeros seja limitada a um pequeno número de monossacarídeos, outros componentes também são encontrados, como fosfato, acetato e piruvato. Além disso, a produção industrial dos biopolímeros não é vulnerável a problemas na colheita, condições climáticas ou poluição marinha [1, 4].

Modificações na composição química dos biopolímeros alteram as suas propriedades reológicas. Isso pode ser observado na produção de xantana, onde alterações no comportamento reológico desta são ocasionadas por modificações na cadeia lateral do polímero e seus substituintes acil [2] e

alterações na gelatinização são ocasionadas por modificações na relação D-manose:D-galactose [12].

As bactérias do gênero *Beijerinckia* spp. são bastonetes que possuem a capacidade de produzir biopolímeros com diferentes composições, dependendo da espécie [4]. O polímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 possui características pseudoplásticas e alta viscosidade com baixas taxas de deformação. Essa propriedade confere ao polímero excelentes características de suspensão e sensação bucal não pegajosa [16].

Os biopolímeros podem ser produzidos em meio líquido pelo processo convencional, cultivando o microrganismo no meio contendo fonte de carbono e sais minerais, ou por via enzimática, utilizando as enzimas previamente produzidas e purificadas. O processo via enzimática é utilizado na produção de dextrana, que é um homopolissacarídeo do qual são conhecidas a via metabólica e a enzima indutora do processo. Este processo apresenta vantagens, como: diminuição dos riscos de contaminação, redução dos custos industriais do processo e ainda possibilidade de obtenção de produtos com melhores características, como melhor comportamento reológico.

Na produção de EPS por bactérias Gram-positivas, como *Leuconostoc mesenteroides*, enzimas lipoprotéicas extracelulares estão envolvidas e são secretadas na superfície da célula. Já a síntese de EPS por bactérias Gram-negativas é intracelular [15] e instável em diferentes espécies bacterianas, como *Xanthomonas campestris* [7]. A biossíntese de xantana, por exemplo começa com a síntese de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples; após ocorre a transferência de monossacarídeos a partir do nucleotídeo correspondente para o lipídeo carregador localizado na membrana da célula para formar a unidade pentassacarídica repetitiva e a adição de grupos acetil e piruvato que são obtidos a partir de acetil-coA e fosfoenolpiruvato, respectivamente [1, 2, 3, 5, 6, 13]. O estágio final da secreção da xantana, a partir da membrana citoplasmática, envolvendo a passagem através do periplasma e membrana exterior e a excreção no ambiente extracelular, é pouco elucidado, assim como o local preciso do processo de polimerização [2, 12, 13]. Alguns autores consideram que primeiro ocorre a polimerização das unidades pentassacarídicas no interior da célula, e após a excreção do polissacarídeo no

exterior [1, 2, 3, 5, 13]. Já, segundo KÖPLIN et al. [6], as unidades pentassacarídicas são secretadas e após polimerizadas.

Estudos bioquímicos e fisiológicos, demonstram que a síntese de xantana é similar a biossíntese de exopolissacarídeos de outras bactérias Gram-negativas [6, 11]. A via biossintética da *Beijerinckia* sp. 7070, que é uma bactéria Gram-negativa, ainda não é conhecida.

O objetivo desse trabalho foi estudar o comportamento reológico e a composição química do biopolímero clairana® produzido por via enzimática, através de inativação e lise celular, e do biopolímero produzido convencionalmente com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070.

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 – Microrganismo

A bactéria utilizada foi a *Beijerinckia* sp. 7070, que foi isolada por VENDRUSCOLO [15] do solo de plantação de cana-de-açúcar na região de Ribeirão Preto-SP, identificada e caracterizada como produtora do biopolímero clairana®. A bactéria foi conservada por liofilização para ser utilizada durante todo o experimento.

2.2 - Produção de biopolímeros utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas

A produção de biopolímeros foi realizada por fermentação aeróbica em batelada, em incubador agitador New Brunswick Scientific, modelo Innova 4230. O inóculo de 1 mL de suspensão bacteriana com 1×10^{10} UFC/mL, preparado a partir de colônias de 24 horas de crescimento, foi acrescentado a 100 mL de meio líquido de produção YM estéril, contendo (g.L⁻¹): (1) K₂HPO₄ 2,0, MgSO₄ 7H₂O 2,7, KH₂PO₄ 13,62; (2) extrato de levedura 0,2, triptose 2,0; (3) sacarose 50,0 [20], através de metodologia de VENDRUSCOLO [16] modificada por PADILHA [9]. Em tempo zero, todas amostras contendo o meio adicionado de inóculo foram submetidas às condições de incubação: 24°C a 180 rpm. Após 30 h de incubação, parte dessas amostras foi submetida à morte celular através de lise com o uso de ultrassom (amplitude de 60 Hz e

pulso de 3 s por 10 min), e inativação celular, pela adição de 300 µg/mL do antibiótico tetraciclina. Foi adicionado ainda, em ambas amostras, azida sódica. Após, seguiu-se o processo de produção do biopolímero e amostras produzidas com células lisadas, inativadas e viáveis (controles) foram retiradas simultaneamente em três tempos diferentes: 32, 46 e 54 h. Outra parte das amostras foi submetida à morte celular, pelos mesmos procedimentos, em 46 h, sendo as amostras retiradas após em 48, 52 e 54 h. Todas amostras foram retiradas em triplicata. Os meios fermentados de cada amostra foram centrifugados, para remoção das células, a 16000 g, à temperatura de 4° a 14°C por 20 minutos em centrífuga refrigerada. Adicionou-se ao sobrenadante etanol 95%, na proporção de 1:4 (v/v), para recuperação dos biopolímeros sendo estes secos em estufa a 56°C até atingir peso constante, pesados e triturados.

2.3 - Composição química dos biopolímeros produzidos utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas

Todos os polímeros obtidos foram hidrolisados em HCl 1N (3% m/v) a 80°C por 16 horas, em banho-maria com temperatura controlada, e analisados por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa em cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ Merck, para determinação da composição química. O eluente empregado foi clorofórmio: metanol: ácido acético: água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Para revelação foi utilizado o reagente anisaldeído sulfúrico e os padrões utilizados foram: glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico.

2.4 – Comportamento reológico das soluções de biopolímeros das amostras produzidas utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas.

O comportamento reológico das soluções aquosas dos biopolímeros a 6% foi analisado no reômetro Rheo Stress 150S, utilizando sensor do tipo placa-cone. A placa utilizada foi de 100 mm de diâmetro e o rotor (cone) usado foi o PP35TI. Foi aplicada uma taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) variando de 0,01 a 150 s⁻¹ com um tempo de análise de 750 s. Esses valores foram obtidos através de uma varredura de tensão, pois acima da taxa de deformação de 150 s⁻¹ toda estrutura já havia sido destruída. Os parâmetros utilizados para varredura

foram: tensão de cisalhamento de 1 a 100 Pa com uma frequência de 1Hz e uma tomada de 120 pontos. A amostragem foi realizada em triplicata.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Composição química dos biopolímeros produzidos utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas.

O biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070 em todas amostras analisadas neste trabalho apresentaram os mesmos componentes: glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico, sendo estes componentes iguais aos dos polímeros CV-70 e OS-32 [15].

Os resultados das análises cromatográficas dos polímeros produzidos, respectivamente, com células inativadas e viáveis, e com células lisadas e viáveis, retirados em diferentes períodos, podem ser vistos nas *Figuras 1 e 2*. A mancha azul superior (Rf 0,92), representa produtos da hidrólise da glicose e a segunda (rosa, Rf 0,74), produtos da hidrólise do ácido glicurônico.

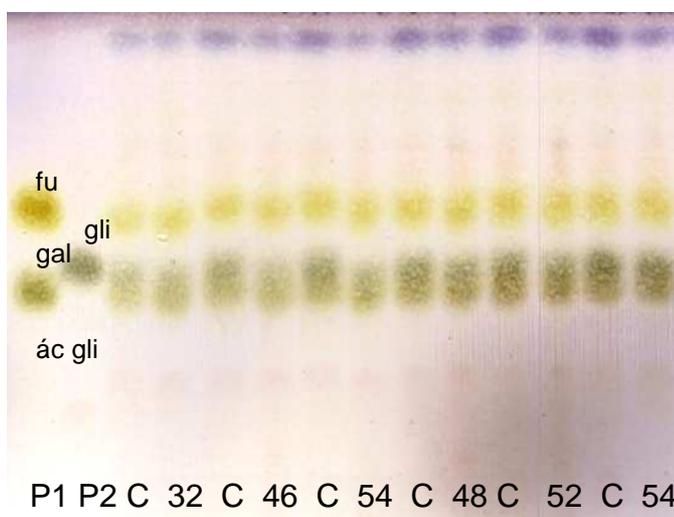


FIGURA 1. Análise cromatográfica (CCDC) das amostras de biopolímeros hidrolisados produzidos utilizando células inativadas em 30 h (retiradas em 32, 46 e 54 h) e em 46 h (retiradas em 48, 52 e 54 h) e utilizando células viáveis (C), retiradas nos respectivos tempos. Padrões: fucose e galactose (P1) e glicose e ácido glicurônico (P2). Eluente: clorofórmio: metanol: ácido acético: água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Revelador: anizaldeído sulfúrico.

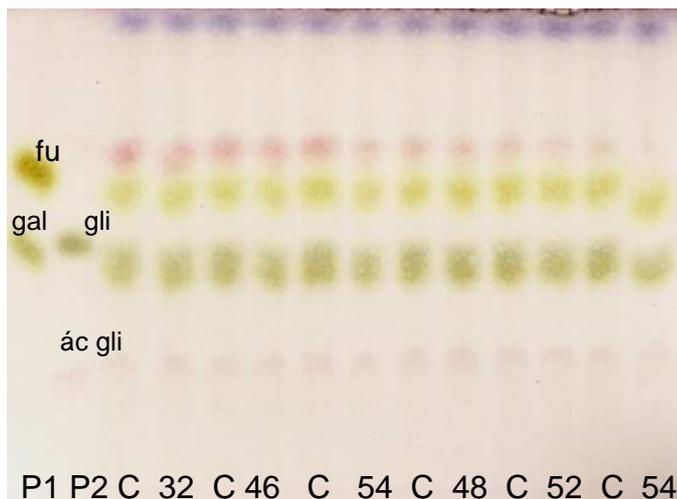


FIGURA 2. Análise cromatográfica (CCDC) das amostras de biopolímeros hidrolisados produzidos utilizando células lisadas em 30 h (retiradas em 32, 46 e 54 h) e em 46 h (retiradas em 48, 52, 54 h) e utilizando células viáveis (C), retiradas nos respectivos tempos. Padrões: fucose e galactose (P1) e glicose e ácido glicurônico (P2). Eluente: clorofórmio: metanol: ácido acético: água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico.

A avaliação de cepas e espécies de *Beijerinckia* tem revelado polissacarídeos com diferentes composições. O polímero de *B. mobilis* apresenta alto conteúdo de ácido L-glicurônico. [1]. A bactéria do solo *B. indica* produz um polissacarídeo em que glicose, ramnose e ácido glicurônico estão presentes em uma fração molar aproximada 6.6:1.5:1 [4]. O polissacarídeo CV-70 obtido por fermentação aeróbica de *Beijerinckia* contém glicose, fucose, e resíduos de galactose em uma proporção de 3:1:3, todos na forma piranosídica [10]; o polímero OS-32 produzido pela cepa 32 de *Beijerinckia* contém glicose, galactose e fucose na proporção de 3:1:3. [16] e o produzido por *Beijerinckia* sp. 7070, caracterizado por VENDRUSCOLO [16] é formado por unidades de glicose, galactose, fucose, ácido galacturônico e glicurônico, sendo o componente principal a glicose (52,8% do peso seco do polissacarídeo) [15].

Todos as amostras de polímeros produzidos com células viáveis (C) apresentaram maior quantidade de glicose (Rf 0,54) do que os das amostras produzidas com células inativadas e lisadas. Essa diferença foi mais acentuada

com relação ao método que utilizou células inativadas, demonstrando que os polímeros obtidos pela produção utilizando células inativadas apresentam menor quantidade de glicose do que os produzidos com células lisadas.

Observa-se pelas *Figuras 1 e 2* que todas amostras apresentaram aumento na quantidade de galactose (Rf 0,50), glicose (Rf 0,53) e fucose (rf 0,64) com o passar do tempo, sendo que estas prevaleceram nas amostras submetidas à morte celular em 46 h, retiradas em 48, 52 e 54 h.

A quantidade de ácido glicurônico (Rf 0,33) foi maior nos polímeros das amostras produzidas com células lisadas, e esta quantidade diminuiu com o passar do tempo, prevalecendo, então, nas amostras lisadas em 30 h de cultivo, retiradas em 32, 46 e 54 h. Essas amostras também apresentaram maior quantidade de galactose, em relação à glicose. Já as amostras de biopolímeros obtidos por inativação celular apresentaram maior teor de glicose em relação à galactose.

3.2 - Comportamento Reológico das soluções de biopolímeros das amostras produzidas utilizando-se células viáveis, inativadas e lisadas

As soluções aquosas a 6% de todas amostras apresentaram comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade aparente de todas amostras decresceu de maneira substancial à medida que a taxa de deformação aumentou.

As *Tabelas 1 e 2* apresentam as médias das viscosidades, em Pas, de todos biopolímeros produzidos, na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹.

TABELA 1. Viscosidade (em Pas) das amostras de biopolímeros produzidos com células inativadas e lisadas em 30 h, e das amostras de polímeros produzidos com células viáveis retiradas em 32, 46 e 54 h, na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹.

	Viscosidade (Pas) dos biopolímeros		
	cél. inativadas	cél. lisadas	cél. viáveis
32 h	15,5	35	17,5
46 h	14,7	28,9	33,6
54 h	16,3	29,4	39,1

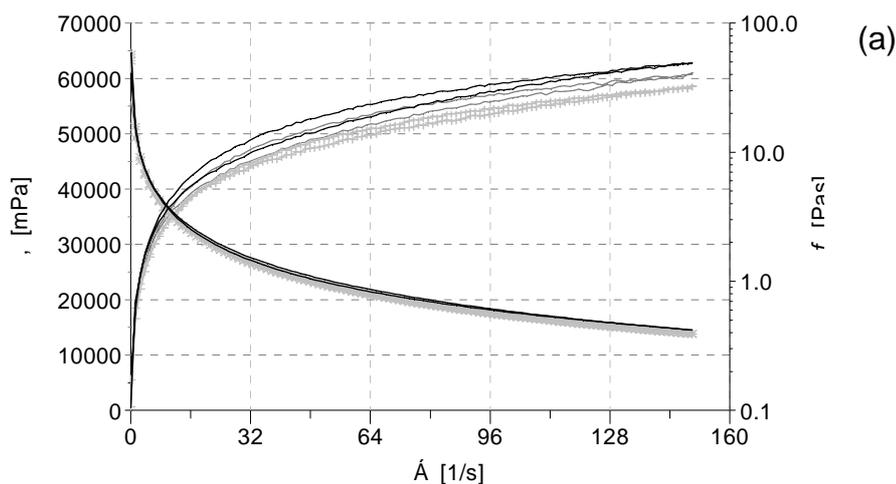
TABELA 2. Viscosidade (em Pas) das amostras de biopolímeros produzidos com células inativadas e lisadas em 46 h, e das amostras de polímeros produzidos com células viáveis retiradas em 48, 52 e 54 h, na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹.

	Viscosidade (Pas) dos biopolímeros		
	cél. inativadas	cél. lisadas	cél. viáveis
48 h	42,9	61,3	49,3
52 h	41,9	56	42,1
54 h	28,3	68,4	39,1

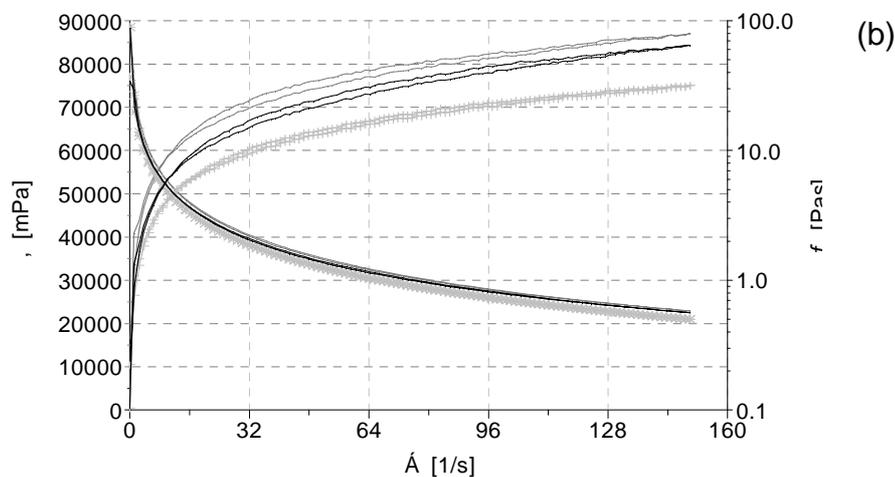
A *Figura 3* apresenta o comportamento reológico das soluções de biopolímeros das amostras produzidas com células inativadas (a), lisadas (b) e viáveis (c), respectivamente, em 30 horas, retiradas em 32, 46 e 54 h.

Todos os gráficos relacionam a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$) em 1/s com a viscosidade (η) em Pas e com a tensão de cisalhamento (τ) em Pa.

cél. inativadas 32, tixotropia
 —, $\tau = f(\dot{\gamma})$
 —, $f = f(\dot{\gamma})$
 cél. inativadas 46, tixotropia
 +, $\tau = f(\dot{\gamma})$
 *, $f = f(\dot{\gamma})$
 cél. inativadas 54, tixotropia
 —, $\tau = f(\dot{\gamma})$
 —, $f = f(\dot{\gamma})$



cél. lisadas 32, tixotropia
 $\sigma = f(\dot{\gamma})$
 $f = f(\dot{\gamma})$
 cél. lisadas 46, tixotropia
 $\sigma = f(\dot{\gamma})$
 $f = f(\dot{\gamma})$
 cél. lisadas 54, tixotropia
 $\sigma = f(\dot{\gamma})$
 $f = f(\dot{\gamma})$



cél. viáveis 32, tixotropia
 $\sigma = f(\dot{\gamma})$
 $f = f(\dot{\gamma})$
 cél. viáveis 46, tixotropia
 $\sigma = f(\dot{\gamma})$
 $f = f(\dot{\gamma})$
 cél. viáveis 54, tixotropia
 $\sigma = f(\dot{\gamma})$
 $f = f(\dot{\gamma})$

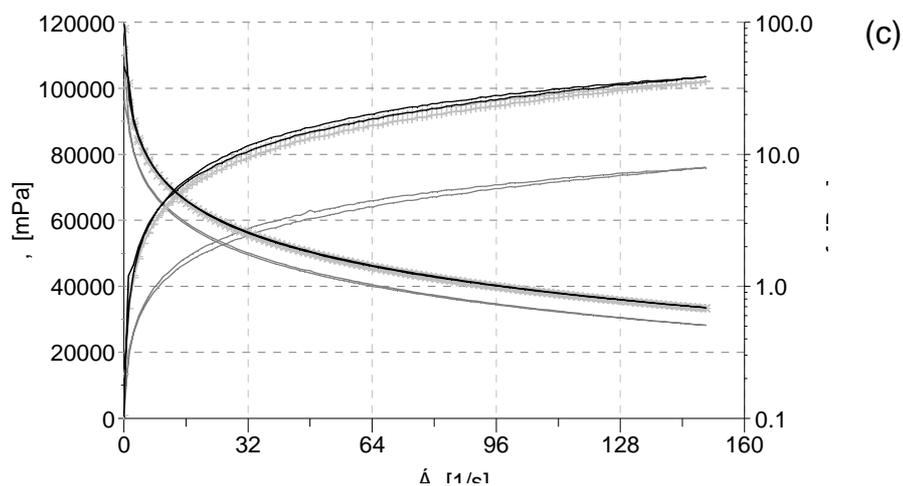
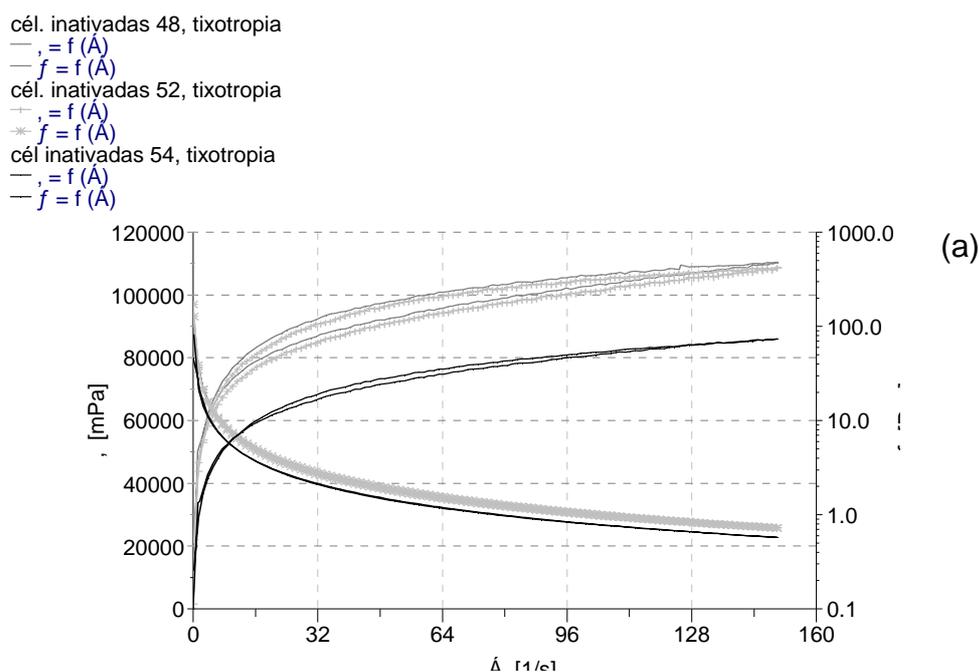


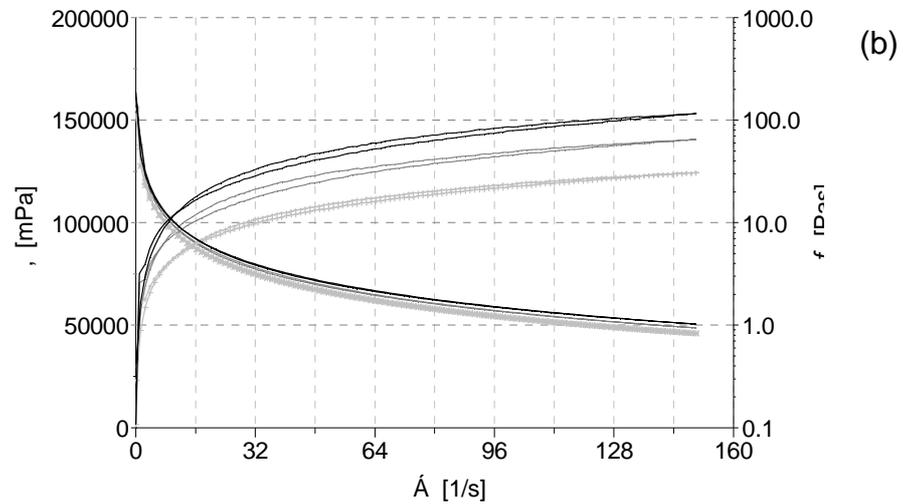
FIGURA 3. Comportamento reológico das soluções aquosas de biopolímeros a 6%, a 25° C, obtidos através da produção com células inativadas (a), lisadas (b) e viáveis (c) em 30 h, retiradas em 32, 46 e 54 h.

Observa-se pela *Tabela 1 e 2* e pelas *Figuras 3 (a), (b) e (c)* que a maior viscosidade encontrada entre as amostras produzidas com células inativadas em 30 h foi a da amostra retirada em 54 h (16,3 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹), seguido da retirada em 32 h (15,5 Pas) e da retirada em 46 h (14,7 Pas). As viscosidades dessas amostras foram muito semelhantes. As soluções de polímeros das amostras obtidas por células lisadas (b) em 30 h retiradas em 46 h também apresentaram menor viscosidade (28,9 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹), mas a maior viscosidade foi obtida pela amostra retirada em 32 h seguida pela retirada em 54 h (35 e 29,4 Pas, respectivamente). Já as soluções de polímeros obtidos com células viáveis (c) apresentaram um aumento progressivo na viscosidade, ou seja, de 32 para 46 h (17,5 a 33,6 Pas) e de 46 a 54 h (33,6 a 39,1 Pas). Esse aumento da viscosidade dos polímeros produzidos com células viáveis em função do tempo se deve, provavelmente, ao aumento da produção e polimerização do biopolímero ao longo do tempo, o que ocasiona aumento das interações na dispersão, e conseqüentemente, maior viscosidade.

A *Figura 4* apresenta o comportamento reológico das soluções de biopolímeros das amostras produzidas com células inativadas (a), lisadas (b) e viáveis (c), respectivamente, em 48 horas, retiradas em 48, 52 e 54 h.



cél. lisadas 48, tixotropia
 $\text{—}, = f(\dot{\gamma})$
 $\text{—} f = f(\dot{\gamma})$
 cél. lisadas 52, tixotropia
 $\text{+}, = f(\dot{\gamma})$
 $\text{*} f = f(\dot{\gamma})$
 cél lisadas 54 tixotropia
 $\text{—}, = f(\dot{\gamma})$
 $\text{—} f = f(\dot{\gamma})$



cél. viáveis 48, tixotropia
 $\text{—}, = f(\dot{\gamma})$
 $\text{—} f = f(\dot{\gamma})$
 cél. viáveis 52, tixotropia
 $\text{+}, = f(\dot{\gamma})$
 $\text{*} f = f(\dot{\gamma})$
 cél viáveis 54, tixotropia
 $\text{—}, = f(\dot{\gamma})$
 $\text{—} f = f(\dot{\gamma})$

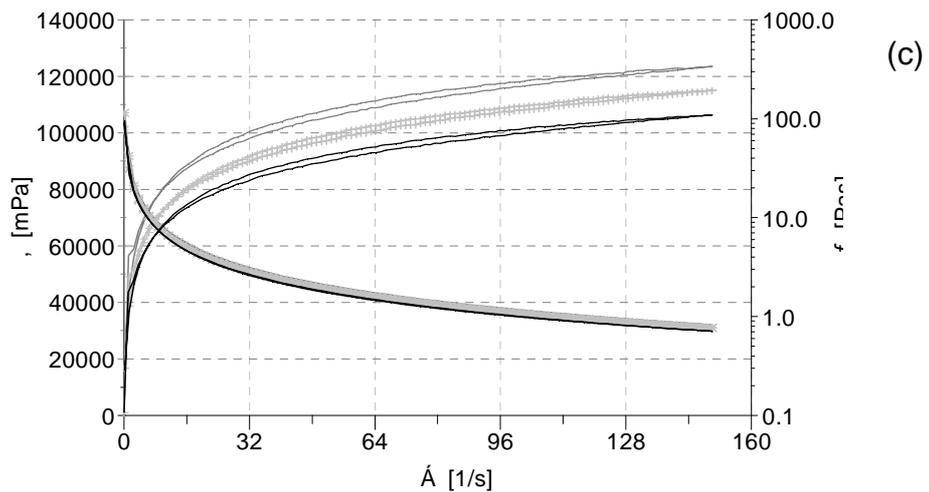
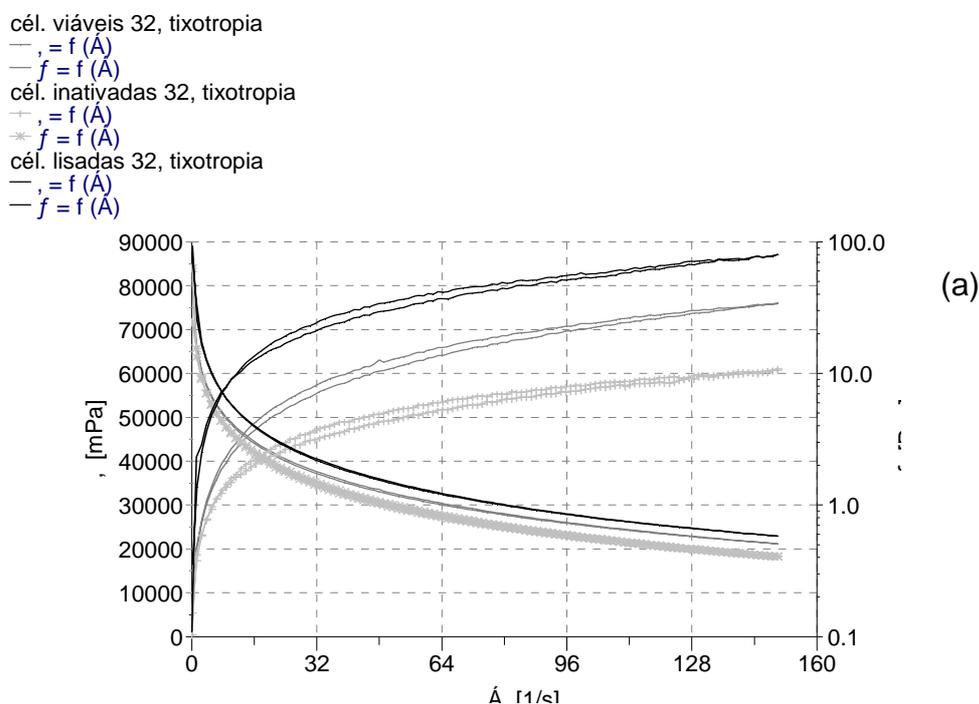


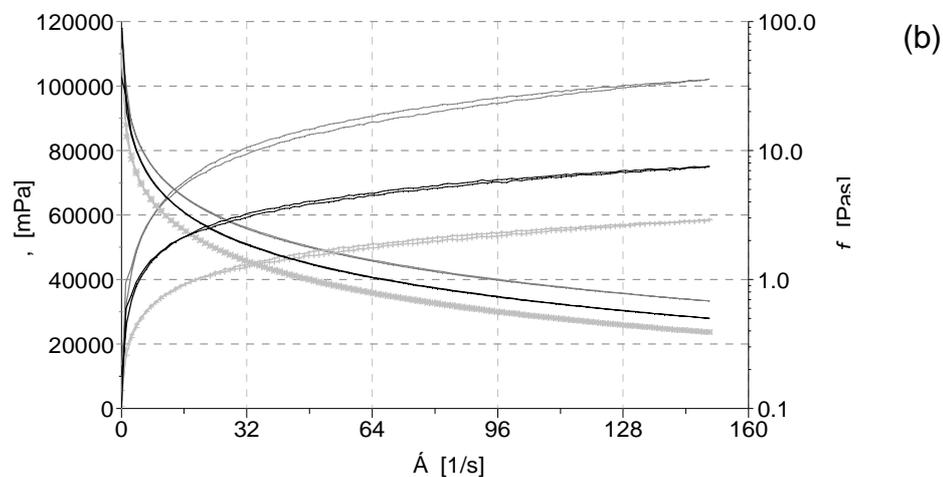
FIGURA 4. Comportamento reológico das soluções aquosas de biopolímeros a 6%, a 25° C, obtidos através da produção com células inativadas (a), lisadas (b) e viáveis (c) em 46 h, retiradas em 48, 52 e 54 h.

Observa-se pelas *Tabelas 1 e 2* e pelas *Figuras 4 (a), (b) e (c)* que a viscosidade das soluções aquosas de biopolímeros a 6%, a 25° C, obtidos através da produção com células inativadas em 46 h, diminuiu com o tempo, sendo que as viscosidades dos retirados em 48 e 52 h foram muito semelhantes (42,9 e 41,9 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹) e a do retirado em 54 h foi acentuadamente menor (28,3 Pas). Já a viscosidade das soluções de polímeros obtidos por células lisadas (b) retirados em 54 h foi maior (68,4 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹) do que do retirado em 48 h (61,3 Pas) e em 52 h (56 Pas). As soluções de polímeros produzidos com células viáveis (c) apresentaram viscosidades decrescentes de 48 a 52 h (49,3 a 42,1 Pas) e de 52 a 54 h (42,1 a 39,1 Pas).

A *Figura 5* mostra os resultados da comparação entre as viscosidades das soluções das amostras de polímeros obtidos com células inativadas e lisadas em 30 h e com células viáveis, retiradas simultaneamente em 32 h (a), 46 h (b) e 54 h (c) de produção.



cél. viáveis 46, tixotropia
 \square , $\tau = f(\dot{A})$
 \square , $f = f(\dot{A})$
 cél. inativadas 46, tixotropia
 \square , $\tau = f(\dot{A})$
 \square , $f = f(\dot{A})$
 cél. lisadas 46, tixotropia
 \square , $\tau = f(\dot{A})$
 \square , $f = f(\dot{A})$



cél. viáveis 54, tixotropia
 \square , $\tau = f(\dot{A})$
 \square , $f = f(\dot{A})$
 cél. inativadas 54, tixotropia
 \square , $\tau = f(\dot{A})$
 \square , $f = f(\dot{A})$
 cél. lisadas 54, tixotropia
 \square , $\tau = f(\dot{A})$
 \square , $f = f(\dot{A})$

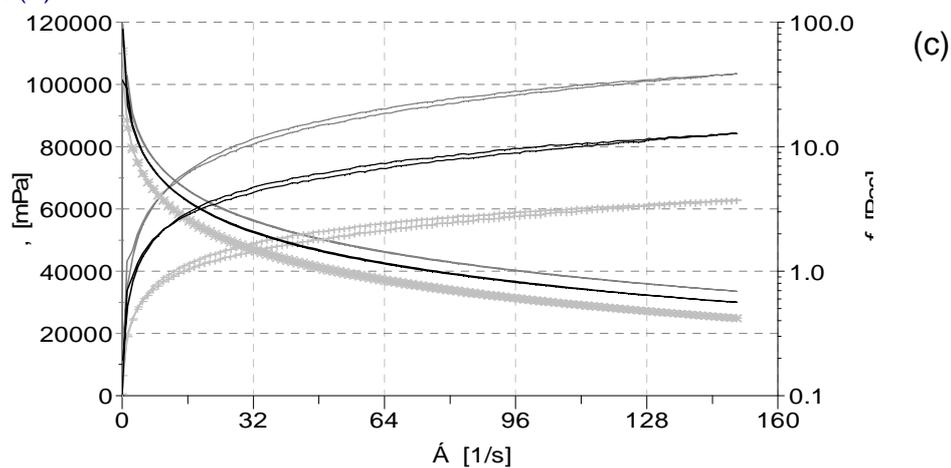
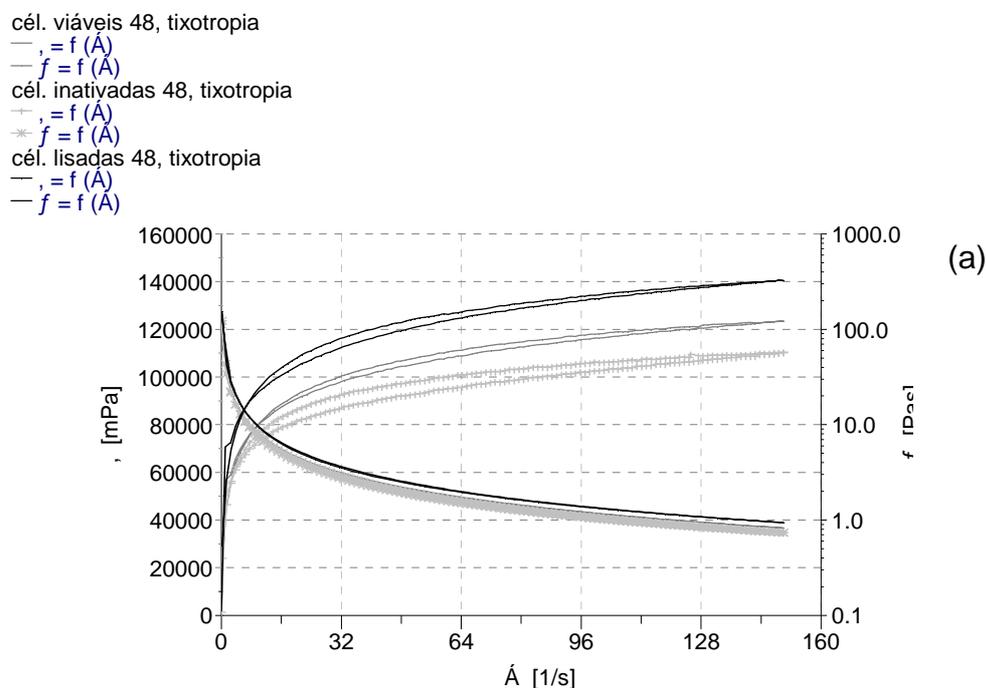


FIGURA 5. Comportamento reológico das soluções aquosas de biopolímeros a 6%, a 25° C, obtidos através da produção com células inativadas e lisadas em 30 h, e de células viáveis, retiradas simultaneamente em 32 h (a), 46 h (b) e 54 h (c).

Observa-se, pelas *Tabelas 1 e 2* e pelas *Figuras 5 (a), (b) e (c)* que a viscosidade da solução da amostra retirada em 32 h obtida com células lisadas (35 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹) foi bem maior do que a da amostra obtida com células viáveis (17,5 Pas) e esta maior do que a obtida com células inativadas (15,5 Pas). Já em 46 h (b), a viscosidade das amostras com células lisadas (28,9 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹) foi menor do que a com células viáveis (33,6 Pas) mas maior do que a com células inativadas (14,7 Pas). O mesmo comportamento foi observado na *Figura 5 (c)*, em amostras retiradas em 54 h, onde as viscosidades das amostras com células lisadas, viáveis e inativadas foram respectivamente de 29,4; 39,1 e 16,3 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹.

A *Figura 6* mostra os resultados da comparação entre as viscosidades das soluções das amostras de polímeros obtidos com células inativadas e lisadas em 46 h e com células viáveis, retiradas simultaneamente em 48 h (a), 52 h (b) e 54 h (c) de produção.



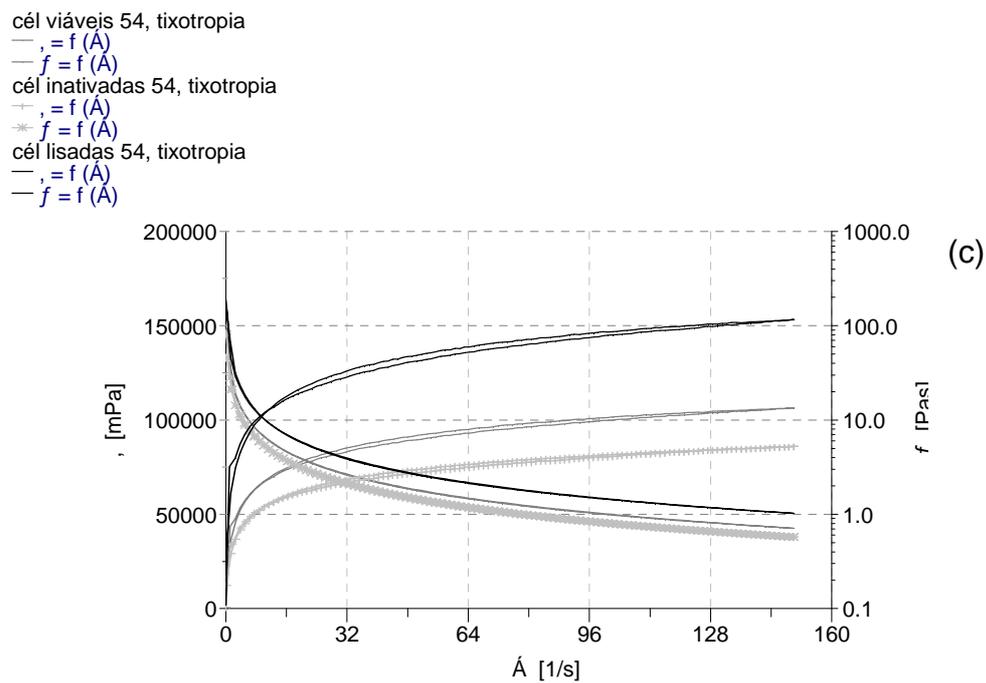
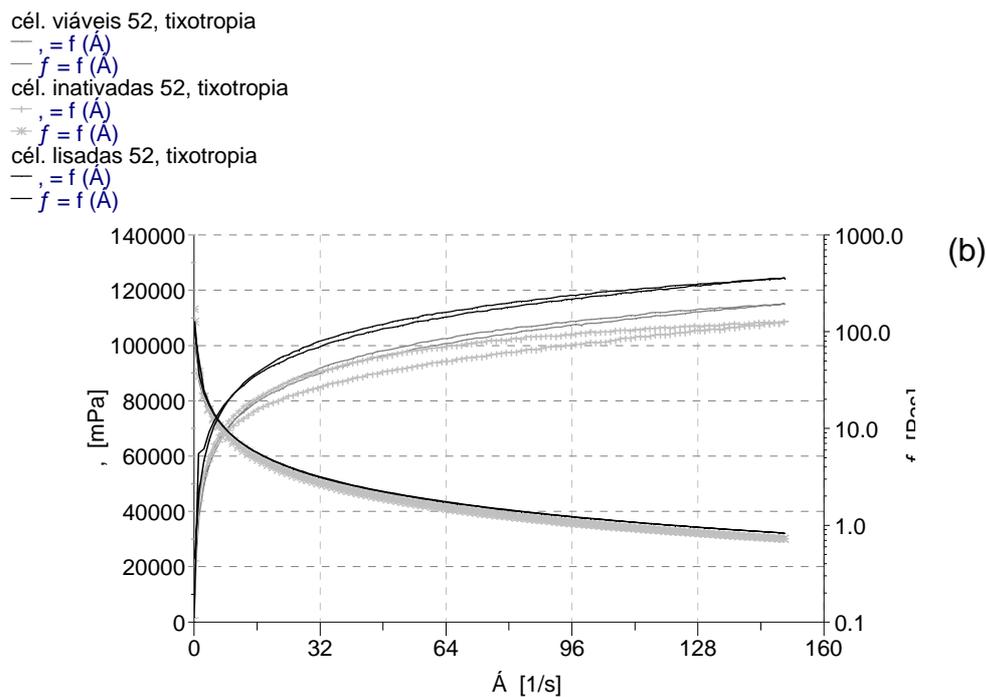


FIGURA 6. Comportamento reológico das soluções aquosas de biopolímeros a 6%, a 25° C, obtidos através da produção com células inativadas e lisadas em 46 h, e de células viáveis, retiradas simultaneamente em 48 h (a), 52 h (b) e 54 h (c).

Observa-se pelas *Tabelas 1 e 2* e pelas *Figuras 6 (a), (b) e (c)*, que as viscosidades das soluções de polímeros de amostras obtidas através de células lisadas foram maiores do que as das obtidas por células viáveis e ainda maiores do que as com células inativadas nos três tempos (48, 52 e 54 h).

A maior viscosidade encontrada foi a do biopolímero produzido com células lisadas em 46 h retirado em 54 h (68,4 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹). Em todo experimento, as maiores viscosidades foram de amostras de polímeros produzidos com células lisadas. Estas apresentam maior quantidade de ácido glicurônico e de glicose do que as com células inativadas. A viscosidade das amostras produzidas com células viáveis, que apresentam maior quantidade de glicose, foi maior somente nas amostras retiradas em 46 e 54 h.

Todos esses resultados sugerem que, provavelmente, a via de síntese de clairana® seja semelhante à de xantana. A lise celular liberou os polissacarídeos produzidos intracelularmente para o exterior e estes e oligossacarídeos também liberados continuaram sendo polimerizados por polimerases extracelulares. O alongamento da cadeia de polissacarídeo fez com que aumentasse o número de interações na dispersão, ou seja, as interações entre cadeias próximas, produzindo um polímero com melhor comportamento reológico devido a maior viscosidade..

Segundo KANG & McNEELY [4], a viscosidade de soluções aquosas do polissacarídeo produzido por *Beijerinckia* spp. pode ser maior que a de soluções similares de xantana e a viscosidade é estável a uma série de temperaturas, bem como a pH de 3-12. As soluções são pseudoplásticas e a presença de sais eleva a viscosidade.

A viscosidade aparente da solução do biopolímero B-27 a 6% na taxa de deformação de 0,3 s⁻¹ foi de 78 Pas [16] e das soluções a 3% do biopolímero clairana® obtido por PADILHA [9] em 24 e 36 h de fermentação, na mesma taxa de deformação foram , respectivamente, de 50 e 55 Pas.

Com relação às tensões de cisalhamento, menores tensões indicam que uma menor taxa de deformação é capaz de destruir a estrutura do gel, ou seja, o gel é mais frágil e apresenta menor viscosidade do que outro gel com maior tensão aplicada.

4 – CONCLUSÕES

- A composição química foi a mesma para todas as amostras. Os componentes são: glicose, galactose, fucose e ácido glicurônico. As amostras de polímeros produzidos com células viáveis apresentaram maior quantidade de glicose do que as produzidas com células lisadas e estas maior do que as produzidas com células inativadas. A quantidade de galactose, glicose e fucose aumentou com o passar do tempo, e a quantidade de ácido glicurônico foi maior nos polímeros das amostras produzidas com células lisadas, principalmente nas lisadas em 30 h de cultivo. Essas amostras também apresentaram maior quantidade de galactose, em relação à glicose e as com células inativadas apresentaram maior teor de glicose em relação à galactose.
- A maior viscosidade encontrada foi a do biopolímero produzido com células lisadas em 46 h retirado em 54 h (68,4 Pas na taxa de deformação de 1,0 a 1,2 s⁻¹).
- As amostras de polímeros obtidos com células lisadas apresentaram maiores viscosidades em geral. As amostras com células viáveis somente apresentaram maior viscosidade quando retiradas em 46 (33,6) e 54 h (39,1).
- A síntese de clairana®, provavelmente, seja semelhante à de xantana pois provavelmente a lise celular tenha liberado os polissacarídeos produzidos intracelularmente para o exterior e melhorado o comportamento reológico destes.
- O processo utilizando células lisadas apresenta maior potencialidade para produção, pois além dos polímeros apresentarem maiores viscosidades, não é necessária a etapa de centrifugação para remoção das células.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COOKE, A. A., PERCIVAL, E. Structural investigation of the extracellular polysaccharides elaborated by *Beijerinckia mobilis*. **Carbohydrate Research**, v. 43, p.117-132, 1975.
- [2] HARDING, N. E., CLEARY, J. M., IELPI, L. Genetics and Biochemistry of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, L. In: HUI, Y. H., KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**, VCH. P. 495-514, 1994.
- [3] HARDING, N.E., RAFFO, S., RAIMONDI, A., CLEARY, J. M., IELPI, L. Identification, Genetic and Biochemical Analysis of Genes Involved in Synthesis of Sugar Nucleotide Precursors of Xanthan Gum. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 447-457, 1993.
- [4] KANG, K. S. & McNEELY, W. PS-7 – A new bacterial heteropolysaccharide, L. In: SANDFORD, P. A. & LASKIN, A. (Ed) **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington: D. C. American Chemical Society, P.220-230, 1977.
- [5] KATSEN, F. D., FERREIRO, U., ODDO, C. G., IELMINI, M. V., BECKER, A., PUHLER, A., IELPI, L. *X. campestris* pv *campestris* Gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence **Journal of Bacteriology**, v. 180, n.7, p 1607-1617, 1998.
- [6] KÖPLIN, R., ARNOLD, W., HÖTTE, B., SIMON, R., WANG. G.E., PÜHLER, A.Genetics of Xanthan Production in *X. campestris*: the *xanA* and *xanB* Genes are Involved In UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n.1, p.191-199, 1992.
- [7] MARTINS, L.O., FIALHO, A.M., RODRIGUES, P.L., SÁ-CORREIA, I. Gellan Gum Production and Activity of Biosynthetic Enzymes in *Sphingomonas paucimobilis* Mucoïd and Non-Mucoïd Variants. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 24, p. 47-54, 1996.
- [8] MOREIRA, A. S., SOUZA, A. S., VENDRUSCOLO, C. T. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia e camada delgada: metodologia. **Agrociência**, v.3, p. 222-224, 1998.

- [9] PADILHA, F. F. Estudo da compartimentalização das enzimas para produção de biopolímeros por *Beijerinckia sp.* 7070. Pelotas, 1997. Exame de Qualificação (Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).
- [10] SCAMPARINI, A.; MARIUZZO, D.; FUJIHARA, H.; JACOBUSI, R.; VENDRUSCOLO, C. Structural studies of CV-70 polysaccharide. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 115-121, 1997.
- [11] SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides - structure and function. **International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology**, v.113, p. 187-231, 1988.
- [12] SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 249-261, 1997.
- [13] SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 249-261, 1997.
- [14] SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.
- [15] VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. Gellan gum – production and properties. In: NISHINARI, K.; DOI, E. (Ed) **Food hydrocolloids**, New York: Plenum Press, 1993.
- [16] VENDRUSCOLO, C.T. Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia sp* isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil. Campinas, 1995. Exame de Qualificação (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

5. CONCLUSÕES GERAIS

- A maior produção total de biopolímero ocorreu em 30 e 72 h, sendo que a produção de polímeros de fibra longa aumentou com o tempo, possivelmente pela ação de enzimas que foram polimerizando esses fragmentos, e a de fibra curta diminuiu. Em 30 h ocorreu um equilíbrio entre a quantidade de fibras longas e curtas produzidas. A maior produtividade encontrada foi após 48 h de fermentação. Em 72 h de fermentação foi encontrada a maior viscosidade e o polímero foi de fibra longa. Em geral, os polímeros que apresentaram maior viscosidade foram os de fibra longa, e a viscosidade dos de fibra curta permaneceu praticamente estável ao longo do tempo. A viscosidade destes foi igual em 30 h de cultivo. Os biopolímeros de 16 a 36 h apresentaram comportamento praticamente newtoniano e os de 48, 72 e 96 h, comportamento pseudoplástico. Todos os biopolímeros apresentaram os mesmos componentes: glicose, fucose, galactose e ácido glicurônico, mas com intensidades diferentes e todos os de fibra curta apresentaram maior teor de glicose. Os biopolímeros de fibra longa apresentaram, geralmente, maior teor de ácido glicurônico. Foi observado também que o teor de fucose e galactose influenciou na viscosidade.
- Os resultados sugerem que é possível produzir o biopolímero clairana® via enzimática; e que a síntese, provavelmente, seja semelhante à de xantana;
- Provavelmente parte das enzimas responsáveis pela síntese do polímero sejam intracelulares, e algumas polimerizantes extracelulares;

- As enzimas envolvidas na síntese e na degradação do biopolímero permanecem ativas no meio, após serem liberadas, mesmo sem a ação de célula bacteriana e começam a atuar antes de 30 h de fermentação;
- Com relação à produção, a quantidade de polímero produzido pelo processo via enzimática através de lise celular foi maior do que a quantidade produzida por inativação e até mesmo maior do que a quantidade produzida pelo processo convencional com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. Uma explicação para esse fato seria que a lise celular causa a liberação dos polissacarídeos, que estavam prontos no interior da célula, para o exterior e liberação das polimerases que agem polimerizando os oligossacarídeos também liberados.
- Com relação à composição química, todas amostras analisadas apresentaram os mesmos componentes. As amostras de polímeros produzidos com células viáveis apresentaram maior quantidade de glicose do que as produzidas com células lisadas e estas maior do que as produzidas com células inativadas. A quantidade de galactose, glicose e fucose aumentou com o passar do tempo, e a quantidade de ácido glicurônico foi maior nos polímeros das amostras produzidas com células lisadas, principalmente nas lisadas em 30 h de cultivo. Essas amostras também apresentaram maior quantidade de galactose, em relação à glicose e as com células inativadas apresentaram maior teor de glicose em relação à galactose.
- Com relação ao comportamento reológico, a maior viscosidade encontrada foi a do biopolímero produzido com células lisadas em 46 h retirado em 54 h (68,4 Pas). As amostras de polímeros obtidos com células lisadas apresentaram maiores viscosidades, em geral, sendo na amostra lisada em 30 h retirada em 32 h (35 Pas) e em todas lisadas em 46 h (61,3; 56 e 68,4 Pas). As amostras com células viáveis somente apresentaram maior viscosidade quando retiradas em 46 (33,6) e 54 h (39,1).
- O processo utilizando células lisadas apresenta maior potencialidade para produção, pois além de apresentar maior produção de biopolímeros e com maiores viscosidades, não é necessária a etapa de centrifugação para remoção das células.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGUELLO-MORALES, M., RUSSELL, R.R.B., MONCHOIS, V. Isolation of an Active Catalytic Core of *Streptococcus downei* MFE28 GTF-I Glucosyltransferase. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.7, p.2290-2292, 1999.
- BECKER, A., KATSEN, F., PÜHLER, A., IELPI, L Xanthan Gum Biosynthesis and Application: a Biochemical and Genetic Perspective. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.50, p. 145-152, 1998.
- COOKE, A. A. & PERCIVAL, E. Structural investigation of the extracellular polysaccharides elaborated by *Beijerinckia mobilis*. **Carbohydrate Research**, v. 43, p.117-132, 1975.
- COPLIN, D.L. & COOK, D. Molecular Genetics of Extracellular Polysaccharide Biosynthesis in Vascular Phytopathogenic Bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.3, n.5, p.271-279, 1990.
- DLAMINI, A.M. & PEIRIS, P.S. Production of Exopolysaccharide by *Pseudomonas* sp ATCC 31461 (*Pseudomonas elodea*) using Whey as Fermentation Substrate. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 47, p. 52-57, 1997.
- DOLS, M., REMAUD-SIMEON, M., WILLEMOT, R.M., VIGNON, M., MONSAN, P. Characterization of the Different Dextranucrase Activities Excreted in Glucose, Fructose, or Sucrose Medium by *Leuconostoc mesenteroides* Nr1 B-1299. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.4, p. 1298-1302, 1998.
- DOLS, M., REMAUD-SIMEON, M., WILLEMOT, R.M., VIGNON, M., MONSAN, P.F. Characterization of Dextranucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 62, p. 47-59, 1997.

- GEREMIA, R.A.E., PETRONI, A., IELPI, L., HENRISSAT, B. Towards a Classification of Glycosyltransferases Based on Amino Acid Sequence Similarities: Prokaryotic α -Mannosyltransferases. **Biochem J**, v. 318, p.133-138, 1996.
- HARDING, N. E., CLEARY, J. M., IELPI, L. Genetics and Biochemistry of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, L. In: HUI, Y. H., KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**, VCH. P. 495-514, 1994.
- HARDING, N.E., RAFFO, S., RAIMONDI, A., CLEARY, J. M., IELPI, L. Identification, Genetic and Biochemical Analysis of Genes Involved in Synthesis of Sugar Nucleotide Precursors of Xanthan Gum. **Journal of General Microbiology**, v.139, p. 447-457, 1993.
- HETTWER, U., GROSS, M., RUDOLPH, K. Purification and Characterization of an Extracellular Levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n.10, p. 2834-2839, 1995.
- IELPI, L., COUSO, R.O., DANKERT, M.A. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 2490-2500.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides. New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, p. 34-39, may, 1974.
- KANG, K. S. & McNEELY, W. PS-7 – A new bacterial heteropolysaccharide, L. In: SANDFORD, P. A. & LASKIN, A. (Ed) **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington: D. C. American Chemical Society, 1977. P.220-230.
- KASAPIS, S., MORRIS, E.R, GROSS, M., RUDOLPH, K. Solution Properties of Levan Polysaccharide from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseocola*, and its Possible Primary Role as a Blocker of Recognition during Pathogenesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 55-64, 1993.
- KATSEN, F. D., FERREIRO, U., ODDO, C. G., IELMINI, M. V., BECKER, A., PUHLER, A., IELPI, L. *X. campestris* pv *campestris* Gum Mutants: Effects on Xanthan Biosynthesis and Plant Virulence **Journal of Bacteriology**, v. 180, n.7, p 1607-1617, 1998.
- KENNEDY, L. & SUTHERLAND, I.W. Gellan Lyases-Novel Polysaccharide Lyases. **Microbiology**, v. 140, p. 3007-3013, 1994.
- KITAOKA, M. & ROBYT, J.F. Mechanism of the Action of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMC Dextranucrase: Kinetics of the Transfer of D-Glucose to Maltose and the Effects of Enzyme and Substrate Concentrations. **Carbohydrate Research**, v. 320, p. 183-191, 1999.
- KÖPLIN, R., ARNOLD, W., HÖTTE, B., SIMON, R., WANG. G.E., PÜHLER, A. Genetics of Xanthan Production in *X. campestris*: the *xanA* and *xanB* Genes are Involved In UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n.1, p.191-199, 1992.

- LÓPEZ, R. & BACKING, J.H. Polysaccharide Production by *Beijerinckia* and *Azotobacter*. **Microbial Espãn.**, v. 21, P. 53-75, 1968.
- LOPRETTI, M., MARTINEZ, E., TORRES, L., PERDOMO, R., SANTOS, M., RODRIGUES, A.E. Influence of Nitrogen/Carbon Ratio and Complementary Sugars on Dextranucrase Production by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512. **Process Biochemistry**, v.34, p. 879-884, 1999.
- MALDONADE, I.R. Contribuição ao estudo dos parâmetros de fermentação por *Beijerinckia* sp. Campinas, 1996. Exame de Qualificação (Mestre em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- MARTINS, L. & SÁ-CORREIA, I. Temperature Profiles of Gellan Gum Synthesis and Activities of Biosynthetic Enzymes. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 20, p. 385-395, 1994.
- MARTINS, L.O., FIALHO, A.M., RODRIGUES, P.L., SÁ-CORREIA, I. Gellan Gum Production and Activity of Biosynthetic Enzymes in *Sphingomonas paucimobilis* Muroid and Non-Muroid Variants. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 24, p. 47-54, 1996.
- MILLER, A.W., EKLUND, S.H., ROBYT, J.F. Milligram to Gram Scale Purification and Characterization of Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. **Carbohydrate Research**, v. 147, p.119-133, 1986.
- MONCHOIS, V., WILLEMOT, R.M., MONSAM, P. Glucanases: Mechanism of Action and Structure-Function Relationships. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p.131-151, 1999.
- MOREIRA, A. S., SOUZA, A. S., VENDRUSCOLO, C. T. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia e camada delgada: metodologia. **Agrociência**, v.3, p. 222-224, 1998.
- PACE, G. N. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v.15, p. 41-70, 1980.
- PADILHA, F. F. Estudo da compartimentalização das enzimas para produção de biopolímeros por *Beijerinckia* sp. 7070. Pelotas, 1997. Exame de Qualificação (Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).
- ROBYT, J.F., KIMBLE, B.K., WALSETH, T.F. The Mechanism of Dextranucrase Action. Direction of Dextran Biosynthesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 165, p. 634-640, 1974.
- SANTOS, M., TEIXEIRA, J., RODRIGUES, A. Production of Dextranucrase, Dextran and Fructose from Sucrose using *Leuconostoc Mesenteroides* Nrnl B512(f). **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, p. 177-188, 2000.
- SCAMPARINI, A.; MARIUZZO, D.; FUJIHARA, H.; JACOBUSI, R.; VENDRUSCOLO, C. Structural studies of CV-70 polysaccharide. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, v. 21, p. 115-121, 1997.

- SHEPHERD, R., ROCKEY, J., SUTHERLAND, I. W., ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995.
- SU, D & ROBYT, J. F. Control of the Synthesis of Dextran and Acceptor-Products by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM Dextranase. **Carbohydrate Research**, v. 248, p. 339-348, 1993.
- SU, D.& ROBYT, J. F. Determination of the Number of Sucrose and Acceptor Binding Sites for *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM Dextranase, and Confirmation of the Two-Site Mechanism for Dextran Synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, n.2, pp. 308, 1994.
- SUTHERLAND, I. Biofilm Exopolysaccharides: a Strong and Sticky Framework. **Microbiology**, v.147, p. 3-9, 2001.
- SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides - structure and function. **International Review of Cytology-a Survey of Cell Biology**, v.113, p. 187-231, 1988.
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of Microbial Exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**. Edinburgh, 1982. Cap.23, p. 79-106.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 249-261, 1997.
- VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. Gellan gum – production and properties. In: NISHINARI, K.; DOI, E. (Ed) **Food hydrocolloids**, New York: Plenum Press, 1993.
- VENDRUSCOLO, C.T. Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil. Campinas, 1995. Exame de Qualificação (Doutor em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).