



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JAMILLE PEREIRA ALMEIDA

**TRIAGEM DE ISOLADOS BACTERIANOS DE ORIGEM MARINHA
VISANDO A PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS**

Salvador

2015

JAMILLE PEREIRA ALMEIDA

**TRIAGEM DE ISOLADOS BACTERIANOS DE ORIGEM MARINHA
VISANDO A PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Salvador

2015

A447 Almeida, Jamille Pereira

Triagem de isolados bacterianos de origem marinha visando a produção de exopolissacarídeos/ Jamille Pereira Almeida. – Salvador, 2015.

69 f.

Orientador: Prof^a. Dr^a Milton Ricardo de Abreu Roque

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2015.

1.Exopolissacarídeos microbianos. 2. Sphingomonadaceae. 3. Bacillaceae. I. Roque, Milton Ricardo de Abreu. II Universidade Federal da Bahia. III. Título.


CDU 582.28





ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA PARA JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA PÓS-GRADUANDA JAMILLE PEREIRA ALMEIDA


Ao vigésimo nono dia do mês de maio do ano de dois mil e quinze, às quatorze horas, no Auditório Ophélia Gaudenzi do Instituto de Ciências da Saúde, em sessão pública, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque orientador, Dra. Janice Izabel Druzian, Dr. Phellippe Marbach e Dra. Paula Carvalhal Lage von Buettner Ristow, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de dissertação intitulado: “SELEÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS DA FAMÍLIA SPHINGOMONADACEAE VISANDO A PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS”, da pós-graduanda **JAMILLE PEREIRA ALMEIDA**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a Defesa, a Banca Examinadora concluiu que a pós-graduanda teve a sua Defesa de Dissertação de Mestrado **APROVADA**, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerrou-se a sessão, da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca Examinadora e pela mestranda. Salvador, 29 de maio de 2015.


Dr. Milton R. A. Roque
Orientadora


Dra. Janice I. Druzian
Examinadora


Dr. Phellippe Marbach
Examinador


Dra. Paula C.L.v-B. Ristow
Examinadora


MSc Jamille Pereira Almeida
Mestranda

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois tudo o que eu consegui foi graças a Ele.

Aos meus pais e a Toinho pela ajuda e torcida durante todo o período.

A minha madrinha por toda a dedicação e compreensão.

As minhas irmãs Bia e Paulinha por entenderem os momentos de ausência por causa dos estudos e a Ninha por todos os conselhos e por todas as vezes em que esteve presente.

A Thiago pela paciência, por ter sempre estado presente quando precisei e pelas vezes que ficou me fazendo companhia, nem que fosse por telefone, nos dias que ficava até tarde no laboratório.

Ao meu orientador por tantos anos de convivência, de paciência e pela confiança depositada em mim.

Às verdadeiras amizades que eu fiz no laboratório.

A Aldi que esteve presente em todos os momentos, sempre disposta a ajudar, apoiar e sempre com os melhores conselhos.

A Ina pelo carinho, atenção, cuidado e por ter tido paciência comigo nessa fase final.

A Carlichá, uma amiga sempre alegre, pela companhia, pela ajuda e por todas as vezes que esteve ao meu lado.

A Ed, Fulvinha e Luis sempre muito solícitos e preocupados.

A todos os meus colegas do Bioprospector.

A professora Janice por ter disponibilizado o laboratório para fazer algumas análises e a Denilson que me ajudou durante o processo.

Ao Laboratório de Física Nuclear da UFBA.

A todos os funcionários do Instituto de Ciências da Saúde.

A Capes pela bolsa de mestrado.

ALMEIDA, Jamille Pereira. Triagem de isolados bacterianos de origem marinha visando a produção de exopolissacarídeos. 69 f. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

RESUMO

Os polissacarídeos microbianos estão sendo muito utilizados atualmente por causa das vantagens em relação aos provenientes de outras fontes. Muitos são sintetizados por bactérias pertencentes à família Sphingomonadaceae como gelana, ramsana, welana, diutana, entre outras. Apesar da quantidade de polissacarídeos existentes, a descoberta de novos polissacarídeos microbianos é importante, tendo em vista a sua vasta aplicabilidade industrial, como espessantes, emulsificantes, estabilizantes e quelantes. Além disso, há a possibilidade de propriedades mais vantajosas e maior produção bacteriana. Este trabalho teve como objetivo selecionar linhagens bacterianas nativas de ambiente marinho produtoras de exopolissacarídeos e caracterizá-los. Neste contexto, a otimização da composição dos meios de cultivo e condições de processo podem modificar a produção, com possibilidade de aplicação industrial. Quatro bactérias foram selecionadas a partir da Coleção de Cultura Microbiana do Instituto de Ciências da Saúde pela resistência ao meio ágar nutriente contendo o antibiótico estreptomicina nas concentrações 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo posteriormente identificadas por análise molecular como pertencentes aos gêneros *Sphingomonas* sp., *Sphingobium* sp. e *Bacillus* sp. A produção dos polímeros sintetizados por essas bactérias foi realizada em meio de cultivo, com alteração da fonte de carbono (sacarose ou glicerina bruta). A quantidade dos exopolissacarídeos sintetizados pelas bactérias pertencentes aos gêneros *Sphingomonas* sp. e *Bacillus* sp foi de 0,2 g.L^{-1} independente da fonte de carbono utilizada. O polímero produzido por *Sphingobium* sp. foi de 0,1 g.L^{-1} no meio contendo sacarose e 0,2 g.L^{-1} no meio com glicerina bruta. A CCMICS SB 22 não produziu exopolissacarídeo no meio contendo sacarose, enquanto que com a glicerina bruta foi de 0,2 g.L^{-1} . As viscosidades dos exopolissacarídeos produzidos pelas quatro linhagens estudadas não apresentaram diferença entre si. A massa molecular do exopolissacarídeo produzido por *Sphingobium* sp. foi de $1,13 \times 10^3$ Daltons. Os outros polímeros não tiveram a massa molecular determinada por não apresentarem solubilidade em água.

Palavras-chave: exopolissacarídeos microbianos, Sphingomonadaceae, Bacillaceae

ALMEIDA, Jamille Pereira. Isolated bacterial screening of marine origin focused on production exopolysaccharides. 69 f. 2015. Master Dissertation – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015

ABSTRACT

The microbial polysaccharides are currently used being much because of advantages over from other sources. Most of those which are being studied are synthesized by bacteria of Sphingomonadaceae family, like gelan, rhamsan, welan, diutan, among others. Despite the amount of existing polysaccharides, the discovery of new polysaccharides is important, in view of its wide industrial applicability, such as thickeners, emulsifiers, stabilizers, and binders. Furthermore, there is the possibility of further advantageous properties and increased bacterial production. This work aimed to select native bacterial strains of exopolysaccharides-producing marine environment and characterize them. In this context, optimization of the composition of culture media and process conditions may change the production, with the possibility of industrial application. Four bacteria were selected from the Microbial Culture Collection of Sciences Institute of Health the resistance to the nutrient agar containing the antibiotic streptomycin in concentrations 100 and 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, subsequently identified by molecular analysis as belonging to the *Sphingomonas* sp., *Sphingobium* sp. and *Bacillus* sp. genres. The production of polymers synthesized by those bacteria was held in the culture medium, by changing the carbon source (sucrose or crude glycerin). The quantity of synthesized exopolysaccharides by the bacteria belonging to the *Sphingomonas* sp. and *Bacillus* sp genres was 0,2 g.L^{-1} regardless of the carbon source used. The polymer produced by *Sphingobium* sp. was 0,1 g.L^{-1} in the medium containing sucrose and 0,2 g.L^{-1} in the medium with crude glycerin. The CCMICS SB 22 produced no exopolysaccharide in the medium containing sucrose, while with crude glycerin was 0,2 g.L^{-1} . The viscosities of exopolysaccharides produced by the four strains studied did not differ among themselves. The molecular mass of the exopolysaccharide produced by *Sphingobium* sp. was $1,13 \times 10^3$ Daltons. The others polymers did not have the molecular mass determined for not showing solubility in water.

Keywords: microbial exopolysaccharides, Sphingomonadaceae, Bacillaceae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Classificação do comportamento reológico de fluidos | 23 |
| Figura 2. Estrutura da unidade repetitiva tetrassacarídica do polímero gelana em seu estado nativo | 27 |
| Figura 3. Estrutura da unidade tetrassacarídica repetitiva do polímero welana adaptada | 28 |
| Figura 4. Estrutura da unidade tetrassacarídica repetitiva de ramsana modificada | 28 |
| Figura 5. Estrutura da unidade tetrassacarídica repetitiva de diutana modificada | 29 |
| Figura 6. Estrutura da unidade tetrassacarídica repetitiva do polissacarídeo I-886 | 30 |
| Figura 7. Estrutura da unidade tetrassacarídica repetitiva do polissacarídeo PS-EDIV..... | 31 |
| Figura 8. Polímero produzido pela bactéria CCMICS 530 após a liofilização | 40 |
| Figura 9. Crescimento das bactérias CCMICS MG 58, CCMICS 531, CCMICS SB 22 e CCMICS 530 em meio contendo 100 µg/ml do antibiótico estreptomicina | 42 |
| Figura 10. Crescimento das bactérias CCMICS MG 58, CCMICS 531, CCMICS SB 22 em meio contendo 200 µg/ml do antibiótico estreptomicina | 42 |
| Figura 11. Curva de crescimento da bactéria pertencente ao gênero <i>Bacillus</i> sp. | 44 |
| Figura 12. Curva de crescimento da bactéria CCMICS SB 22 | 45 |
| Figura 13. Curva de crescimento da bactéria pertencente ao gênero <i>Sphingobium</i> sp. | 45 |
| Figura 14. Curva de crescimento da bactéria pertencente ao gênero <i>Sphingomonas</i> sp. | 46 |
| Figura 15. Polímeros sintetizados a partir das linhagens bacterianas dos gêneros <i>Sphingobium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. e <i>Sphingomonas</i> sp. utilizando sacarose como fonte de carbono | 47 |
| Figura 16. Polímeros sintetizados a partir das linhagens bacterianas dos gêneros <i>Sphingobium</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Sphingomonas</i> sp. e CCMICS SB 22 utilizando glicerina bruta como fonte de carbono | 49 |

Figura 17. Viscosidade aparente das soluções aquosas a 0,09% dos polímeros sintetizados pelas bactérias pertencentes aos gêneros *Sphingobium* sp., *Sphingomonas* sp. e *Bacillus* sp. utilizando sacarose como fonte de carbono 53

Figura 18. Viscosidade aparente das soluções aquosas a 0,09% dos polímeros sintetizados pelas bactérias pertencentes aos gêneros *Sphingobium* sp., *Sphingomonas* sp., *Bacillus* sp. e CCMICS SB 22 utilizando glicerina bruta como fonte de carbono 55

Figura 19. Análise do peso molecular por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) do polímero sintetizado pela bactéria pertencente ao gênero *Sphingobium* sp. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de biopolímeros pelas linhagens MG58, 530 e 531, em meio de cultura com as fontes de carbono sacarose e glicerina bruta, em g.L⁻¹ 50

Tabela 2. Solubilidade em água dos exopolissacarídeos sintetizados pelas bactérias dos gêneros *Sphingobium* sp., *Shingomonas* sp. e *Bacillus* sp. e CCMICS SB 22 52

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS | 15 |
| 2.2 PRODUÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS POR CULTIVO SUBMERSO | 19 |
| 2.3 RECUPERAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS | 22 |
| 2.4 VISCOSIDADE APARENTE DOS BIOPOLÍMEROS E COMPORTAMENTO | 23 |
| 2.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR | 25 |
| 2.6 EXOPOLISSACARÍDEOS DA FAMÍLIA SPHINGOMONADACEAE | 26 |
| 2.7 SPHINGOMONADACEAE | 32 |
| 3. OBJETIVOS | 35 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 35 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 35 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
| 4.1 SELEÇÃO DAS LINHAGENS PERTENCENTES À FAMÍLIA SPHINGOMONADACEAE E BACILLACEAE ATRAVÉS DE ANTIBIÓTICO | 36 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS | 36 |
| 4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS SELECIONADAS | 36 |
| 4.4 PADRÃO DE CRESCIMENTO | 37 |
| 4.5 PRODUÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS | 38 |
| 4.6 RECUPERAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS | 39 |
| 4.7 TESTE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA | 39 |
| 4.8 VISCOSIDADE APARENTE DOS EXOPOLISSACARÍDEOS | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 4.9 DIÁLISE E LIOFILIZAÇÃO | 40 |
| 4.10 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA CCMICS 530 | 40 |
| 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 41 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 41 |
| 5.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS | 41 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS | 43 |
| 5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR | 43 |
| 5.4 CURVAS DE CRESCIMENTO | 44 |
| 5.5 PRODUÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS | 46 |
| 5.6 SOLUBILIDADE EM ÁGUA | 51 |
| 5.7 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE DOS EXOPOLISSACARÍDEOS OU FRAÇÕES DOS EXOPOLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS EM ÁGUA..... | 52 |
| 5.8 MASSA MOLECULAR DO POLÍMERO PRODUZIDO PELA CCMICS 530 | 57 |
| 6. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES | 59 |
| 6.1 CONCLUSÕES | 59 |
| 6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 60 |
| 7. REFERÊNCIAS | 61 |

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos, como espécies de bactérias, fungos e algumas algas produzem polissacarídeos, que tem aplicabilidade em diversos setores industriais, como espessantes, quelantes, emulsificantes e estabilizantes. Também podem ser utilizados como agentes de suspensão, floculação e servirem para encapsular substâncias. Além disso, podem formar géis, filmes e membranas. (KUMAR *et al.*, 2007; SCHMID *et al.*, 2014).

Os exopolissacarídeos (EPS) são excretados pelos micro-organismos, enquanto os polissacarídeos capsulares encontram-se dentro da célula (MORRIS *et al.*, 2009). Grande parte desses exopolissacarídeos possuem estruturas químicas diferentes dos componentes da parede celular, mas em alguns, essas estruturas são muito semelhantes quimicamente (SUTHERLAND, 1990).

Os EPS podem ser constituídos por um só tipo de monômero ou por mais de um tipo de monômero, além da linearidade ou ramificação das cadeias. A estrutura primária desses polímeros difere quanto a composição, sequência, massa molecular, posição das ligações e densidade de cargas. Além disso, quando ocorrem alterações no seu entorno, as estruturas químicas podem variar assim como a conformação (YALPANI, 2013).

Os EPS podem ser produzidos a partir de fontes renováveis ou resíduos industriais o que torna seu uso mais atrativo para os setores industriais. Além disso, apresentam características como biocompatibilidade e biodegradabilidade e, por isso, são mais indicados para aplicações médicas e na área de alimentos (SCHMID *et al.*, 2014).

Os biopolímeros microbianos ganharam espaço por causa das propriedades físicas únicas ou mais vantajosas em relação aos polissacarídeos produzidos pelas plantas anteriormente muito utilizados (SUTHERLAND, 1998). Normalmente possuem propriedades reológicas pseudoplásticas que, na maioria das vezes, sofrem menores variações na temperatura, pH e adição de sais, o que é de suma importância para a aplicação industrial.

Os EPS utilizados em escala comercial são a dextrana, xantana, gelana, diutana e ramsana (MAUGERI, 2001; KUMAR *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2015). Porém, diversos novos polissacarídeos estão sendo descobertos e pesquisados com a finalidade de prospectar bactérias que apresentem uma maior produção, com propriedades reológicas importantes, o que ocasiona uma diminuição no custo de produção, tendo em vista que no processo de fermentação é necessário uma quantidade considerável de sacarose ou glicose como fonte de carbono o que encarece a sua síntese.

Muitos dos polissacarídeos microbianos que estão sendo pesquisados são provenientes de bactérias da família Sphingomonadaceae, como gelana (S-60), ramsana (S-194), welana (S-130), diutana (S-657), I-886, PS-EDIV, NW 11 e Ss. Essa família foi proposta recentemente compreendendo *Novosphingobium*, *Sphingopxys*, *Sphingobium* e *Sphingomonas* (TAKEUSHI *et al.*, 2001). Antes era reconhecido somente este último gênero. Ela está sendo muito estudada devido as suas aplicações biotecnológicas, como a capacidade de degradar total ou parcialmente diversos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, assim como de produzir polissacarídeos com propriedades reológicas favoráveis para o uso industrial na área de alimentos, melhoramento na recuperação de petróleo ou na indústria da construção (SCHMID *et al.*, 2014).

Podem ser encontradas nos mais variados ambientes, tais como: solo (HUANG *et al.*, 2009), sedimento marinho poluído (GILEWICZ *et al.*, 1997), águas residuais de vinícolas (MATSUYAMA *et al.*; 2003), sedimentos profundos (FREDRICKSON *et al.*, 1991), água mineral natural (LEE *et al.*, 2001), raízes de plantas (TAKEUSHI *et al.*, 1995), invertebrados marinhos (ROMANENKO *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2011), manguezais (GUO *et al.*, 2005), areia do deserto (HONGLI *et al.*, 2011) e mina de zinco e chumbo (FENG *et al.*, 2014), entre outras.

Este projeto teve como objetivo selecionar linhagens bacterianas nativas de ambiente marinho produtoras de exopolissacarídeos utilizando meio de produção contendo fontes de carbono sacarose e glicerina bruta. Os EPS foram quantificados e caracterizados quanto à viscosidade aparente e massa molecular.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Diversos micro-organismos produzem polissacarídeos, principalmente os procariontes (SUTHERLAND, 2001). Podem ser capsulares ligados à superfície da célula ou secretados para fora da célula sem ter uma forma definida (SUTHERLAND 1998). Os exopolissacarídeos (EPS) podem ser solúveis ou insolúveis (KUMAR *et al.*, 2007). O que torna grande parte deles solúveis em água são as cadeias laterais que geralmente apresentam grupamentos carregados como o ácido urônico e os piruvatos cetais (SUTHERLAND, 1994). A solubilidade é influenciada pelo pH, cátions e agentes complexantes presentes (STEPHEN *et al.*, 2006). Polímeros que são muito solúveis e flexíveis, em sua maioria, serão somente espessantes, como a xantana. Ao ser dissolvida em água, a xantana aumenta a viscosidade, sendo que esse processo pode ser dependente da temperatura (RINAUDO, 1993).

Os EPS podem ser muitas vezes identificados na placa pela morfologia mucóide da colônia bacteriana. No meio líquido, quando estão presentes, podem tornar o meio muito viscoso e, de forma rara, solidificá-lo (SUTHERLAND, 1990). Existem polímeros que formam complexos estáveis com corantes solúveis em água, como o azul de anilina, e, assim, pode ser também utilizado como uma ferramenta de triagem inicial (KUMAR *et al.*, 2007).

Os polissacarídeos desempenham várias funções: fazem parte da parede celular em plantas e em micro-organismos, realizam reconhecimento celular, estimulam as defesas do hospedeiro, servem como nutrientes e fonte de oligossacarídeos funcionais e protegem os micro-organismos contra a desidratação. Na indústria alimentícia são utilizados como espessantes, pois tornam os líquidos mais viscosos e, com isso, permite que os alimentos fiquem com determinada textura. Além de serem utilizados como retentores de água em alimentos processados, estabilizantes e agentes gelificantes (MISAKI, 1993; TONELI *et al.*, 2005; MORRIS *et al.*, 2009).

Os exopolissacarídeos podem estar relacionados com a patogenicidade do micro-organismo. *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, sintetiza o alginato que pode

bloquear a via respiratória do paciente. Entretanto, não existe nenhum conhecimento de problemas de toxicidade por esses polímeros. Alguns dos micro-organismos sintetizam os mesmos polissacarídeos produzidos pelas plantas, como glucanos, alginatos e celulose (MORRIS *et al.*, 2009).

Os polissacarídeos microbianos apresentam algumas vantagens em relação às gomas produzidas por outros organismos, como os alginatos, goma arábica, goma guar e goma de algaroba, pois não dependem de fatores climáticos, podendo ser produzidos em uma quantidade determinada. Assim como, sua produtividade pode ser melhorada e, às vezes, apresentar características novas que possam ser úteis para as indústrias (MAUGERI, 2001). Apesar de serem melhores em relação aos outros polímeros naturais ou sintéticos, competem com estes últimos, por serem mais caros para produzir e comercializar (SUTHERLAND, 1998).

Diversos biopolímeros microbianos são produzidos industrialmente como a xantana (sintetizada pelo gênero *Xanthomonas*), escleroglucana (produzida por várias espécies de *Sclerotium*), zanflo, gelana (a partir das *Sphingomonas* sp.), curdlana, alginato (sintetizado por bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas*), dextrana (produzida a partir da *Leuconostoc mesenteroides*), pululana (a partir de *Aureobasidiumoullulans*), celulose bacteriana e glucanas (produzidas por leveduras) (MAUGERI, 2001).

Os biopolímeros são utilizados em produtos alimentícios como agentes espessante e gelificante, geralmente em concentrações de 0,25 a 0,5% devido a sua alta capacidade de tornar a solução viscosa e de originar géis (BEMILLER *et al.*, 2010). Os diferentes polissacarídeos, quando misturados, podem apresentar interações sinérgicas favoráveis, melhorando as propriedades reológicas, o que ocasiona melhorias na qualidade do produto e, muitas vezes, diminuição no custo de produção podendo ser utilizados na indústria (WILLIAMS e PHILLIPS, 1995).

Os polissacarídeos podem ser constituídos por um só tipo de monômero ou por mais de um tipo de monômero, além de poderem ser lineares ou ramificados (YALPANI, 2013). À medida que aumenta a ramificação, ocorrem modificações nas propriedades

físicas como solubilidade em água, viscosidade e capacidade de formar géis (STEPHEN *et al.*, 2006). Podem ter moléculas muito eletronegativas ou polianiônicas, como a xantana ou serem neutros, como a dextrana (MORRIS *et al.*, 2009). As variadas estruturas de carboidratos e, principalmente, a natureza polianiônica de grande parte dos exopolissacarídeos microbianos fornece diferentes tipos de interações catiônicas e, com isso, alterações na reologia (MISAKI, 1993; SUTHERLAND, 1996).

Os polissacarídeos microbianos, exceto os alginatos, são compostos por uma estrutura primária de unidades repetitivas que irão variar de acordo com as enzimas que participam da biossíntese dessas unidades (SUTHERLAND, 1996). São formados, principalmente, por carboidratos, mas pode haver substituintes orgânicos e inorgânicos (SUTHERLAND, 1990). Esses polissacarídeos contêm, frequentemente, os monossacarídeos: D-glicose, D-galactose, D-manose, D-fucose, D-ramnose, N-acetilhexosamina-N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D e N-acetil-D-galactosamina (SUTHERLAND, 1994). Os polímeros sintetizados pelos eucariotos, em sua maioria, possuem pentoses, ao contrário dos sintetizados pelos procariotos em que a presença de pentoses não é muito comum (SUTHERLAND, 1990).

Os substituintes acil (principalmente acetato ligado a éster ou piruvato ligado a cetil) estão geralmente presentes na estrutura dos polissacarídeos (SUTHERLAND, 1994). Geralmente, os grupos acetil estão ligados a somente um açúcar, sendo que alguns deles podem possuir muitos dos monossacarídeos que fazem parte da estrutura principal acetilados. (SUTHERLAND, 1996).

O conhecimento da composição do exopolissacarídeo é um importante fator para o desenvolvimento de um processo adequado de produção. Além disso, o entendimento do seu comportamento no meio de cultura diante de variáveis que podem interferir na sua qualidade, como temperatura, variação no pH do meio e adição de sais, é necessário afim de que tais condições possam ser controladas durante a sua síntese em larga escala (SCHULTEIS *et al.*, 2009).

Os métodos geralmente utilizados para a identificação dos polissacarídeos são hidrólise ácida e análise quantitativa dos monossacarídeos e ácidos urônicos liberados

usando combinações de cromatografia gasosa - espectrometria de massa (CG-MS), cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e eletroforese capilar (STEPHEN *et al.*, 2006).

Os exopolissacarídeos microbianos tem um alto custo de produção por causa da sacarose ou glicose como fonte de carbono e, apesar das descobertas de novas gomas que estão sendo estudadas, as que dominam o mercado industrial são três: a dextrana, xantana e gelana (MAUGERI *et al.*, 2001). Entretanto, mesmo com o elevado custo de produção, são atrativos para a indústria. A xantana, por exemplo, custa cerca de US\$14 por quilo e a dextrana cíclica custa cerca de US\$ 50 por quilo e é utilizada em produtos farmacêuticos (MORRIS *et al.*, 2009).

A dextrana é produzida por *Leuconostoc mesenteroides*. Comercialmente pode ser sintetizada na presença dessa bactéria ou na sua ausência, pois a produção do biopolímero é extracelular através da enzima dextrana-sacarase. É utilizada em diversos setores industriais, tais como em indústrias farmacêutica, fotográfica, alimentícia, petrolífera e na agricultura (MAUGERI *et al.*, 2001).

A goma xantana é produzida a partir de *Xanthomonas campestris*, sendo comumente encontrada em produtos alimentícios devido a algumas de suas propriedades como: solubilidade em água sob diferentes temperaturas; viscosidade em solução, mesmo que em pequena concentração; sua viscosidade não é alterada em temperaturas que variam de 0 a 100°C; apresenta estabilidade em soluções com baixo pH; e, proporciona estabilidade a alimentos que possam ser congelados e descongelados (BEMILLER *et al.*, 2010). É um produto referência, pois há muito tempo é utilizada na indústria alimentícia e pela sua elevada conversão de substrato para polímero (60-70%), acaba sendo um produto mais econômico (SUTHERLAND, 1998). A produção está por volta de 10.000 toneladas por ano (MORRIS *et al.*, 2009).

A goma gelana é sintetizada por *Sphingomonas elodea*. Pode ser encontrada em sua forma natural, rica em grupos acil, que forma um gel macio, elástico e não quebradiço (semelhante aos géis produzidos com ágar e carragenana) ou com pequena quantidade de grupos acil que forma um gel firme, não-elástico e quebradiço

(BEMILLER *et al.*, 2010). A gelana pobre em grupos acil é muito utilizada na indústria alimentícia. Essas duas formas também podem ser misturadas originando gel com textura intermediária (BEMILLER *et al.*, 2010). O uso da gelana na indústria alimentícia foi aprovada em 1992 pela US Food and Drug Administration (PSCZOLA, 1993).

Gelrite® e Kelcogel® são duas formas da goma gelana encontradas no mercado e aprovadas nos USA e União Europeia para uso na indústria alimentícia como gelificante, estabilizante e agentes de suspensão. Podem ser encontrados sozinhos ou misturados com outros hidrocolóides (SUTHERLAND 1998). Gelrite® possui algumas características como: termorreversibilidade, formando uma solução viscosa em água fria; gel altamente resistente mesmo em baixas concentrações quando em contato com sais solúveis; pode ser submetido ao processo de autoclavagem; geralmente, não ocorre degradação por ação de enzimas; e, não sofre alterações químicas pela maioria dos aditivos utilizados nos meios de crescimento. Kelcogel® pode ser encontrada tanto com alta quantidade de grupos acil quanto com baixa quantidade. Compostos alcalinos são utilizados para desacetilar o polímero (PRAJAPATI *et al.*, 2013). A goma gelana Gel-Gro pode ser utilizada como substituto do ágar. Ela é rígida como o ágar, é estável em diferentes temperaturas, é transparente na presença de cátions e pode ser utilizada combinada com aditivos nutricionais (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

2.2 PRODUÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS POR CULTIVO SUBMERSO

Os exopolissacarídeos podem ser produzidos por micro-organismos a partir de um meio complexo ou sintético quimicamente definido (KUMAR *et al.*, 2007). Sendo que a produção é dependente das diferentes fontes de carbono e das suas concentrações, assim como das fontes de nitrogênio inorgânicas ou orgânicas (BERWANGER *et al.*, 2006; PRASERTSAN *et al.*, 2008). Além de diversos parâmetros como temperatura (MATSUYAMA *et al.*, 2003), agitação (BERWANGER *et al.*, 2006), pH e aeração (PRASERTSAN *et al.*, 2008). A quantidade de fósforo também influencia, pois o fosfato tem relação com enzimas específicas que são responsáveis pela produção de polissacarídeo. (KUMAR *et al.*, 2007, XU *et al.*, 2015). Além disso, a concentração de

íons metálicos é crucial para o crescimento dos micro-organismos e produção de metabólitos (XU *et al.*, 2015).

A produção de exopolissacarídeos fica mais fácil de ser visualizada quando a bactéria é suplementada com açúcar em abundância e com uma quantidade mínima de nitrogênio, pois este é normalmente utilizado para induzir a limitação do crescimento e estimular a síntese de polissacarídeo, assim como o sulfato também pode ser utilizado para esta finalidade (POLLOCK, 1993; SUTHERLAND, 1996). A proporção 10:1 de C/N é considerada como a mais adequada para uma produção máxima (SEO *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2007). De acordo com BAJAJ *et al.* (2006), as fontes de nitrogênio orgânicas resultam em uma menor biomassa e maior rendimento de exopolissacarídeo. Provavelmente, o motivo para esse aumento são os aminoácidos e vitaminas presentes. O mesmo não é observado para as fontes de nitrogênio inorgânicas que auxiliam na produção da biomassa, mas não interferem no rendimento. A fonte de carbono presente no meio de produção é um dos constituintes mais importantes para a construção do material celular, assim como para a produção de exopolissacarídeo (XU *et al.*, 2015).

Muitos micro-organismos sintetizam polímeros em meios tamponados a pH neutros. Além disso, uma temperatura baixa para a síntese de polissacarídeos pode levar a uma diminuição na taxa de crescimento e massa celular, o que pode provocar um aumento no tempo da fase exponencial e, com isso, a viscosidade ser maior quando comparada com temperaturas mais altas (KUMAR *et al.*, 2007).

Geralmente, a temperatura e o pH ótimos para a formação da biomassa são diferentes dos valores para a síntese de exopolissacarídeos, pois a fermentação começa com a fase de crescimento seguida pela fase de produção (DONOT *et al.*, 2012; OHNER, 2013). Além disso, alterações significativas nas propriedades reológicas acontecem durante o curso da fermentação por causa da produção de exopolissacarídeos que resulta em um caldo muito viscoso e não newtoniano que pode causar problemas de mistura, transferência de calor e fornecimento de oxigênio, assim como gerar instabilidades na qualidade final do produto (OHNER, 2013).

Fontes de carbono como sacarose, glicose, lactose, maltose, sorbitol, soro de leite, amido, açúcares concentrados (Neosorb™, Cerelose™), metanol e C₉ a C₁₆ de n-alcenos podem ser utilizadas para a produção de polímeros microbianos, sendo que a glicose sob concentrações de 2-5% (w/v) é o substrato preferido de muitas espécies bacterianas (SUTHERLAND, 1996; KUMAR *et al.*, 2007). Já as fontes de nitrogênio que estão sendo utilizadas atualmente são sulfato de amônia, peptona, nitrato de sódio, ureia e extrato de levedura (KUMAR *et al.*, 2007).

O custo com o meio de produção pode chegar a aproximadamente 30% do valor total do processo, já que meios complexos geralmente utilizados possuem muitos nutrientes caros como extrato de levedura, peptona e sais (OHNER, 2013). Por isso diversos resíduos industriais e agrícolas estão sendo utilizados como matéria-prima, a fim de baratearem esse valor total da síntese de polissacarídeos. O xarope de milho, melaço bruto ou pré-tratado, resíduo de batata, resíduos de frutas cítricas, resíduo do suco de maçã, soro de mandioca, cana-de-açúcar, soro de queijo e glicerina bruta são alguns exemplos de resíduos que podem ser utilizados como fonte de carbono em substituição à sacarose ou glicose (BILANOVIC *et al.*, 1994; FIALHO *et al.*, 1999; SAKATA *et al.*, 2003; BERWANGER *et al.*, 2006; DRUZIAN e PAGLIARINI, 2007; BRANDÃO *et al.*, 2008; BRANDÃO *et al.*, 2010; BILANOVIC *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2014). Já o bagaço de soja pode ser utilizado como fonte de nitrogênio (JIN *et al.*, 2003).

O glicerol é um subproduto significativo da produção de biodiesel. Para cada 9 kg de biodiesel produzido, aproximadamente 1 kg de glicerol bruto é formado (DASARI *et al.*, 2005; ALBARELLI *et al.*, 2011). O uso do glicerol no Brasil é de aproximadamente 13 mil toneladas por ano (ABIQUIM, 2005). Porém com a exigência do governo em adicionar 6% de glicerol no diesel convencional (MME, 2014), provavelmente a quantidade de resíduos de glicerol será maior do que a demanda atual de mercado, fazendo necessário encontrar novas formas de utilização (ALBARELLI *et al.*, 2011), para não descartá-lo no meio ambiente o que poderia causar danos. Uma alternativa interessante é o uso do glicerol, sem nenhum tipo de tratamento, para a produção de exopolissacarídeos, pois constitui uma fonte de carbono de baixo custo (ALVES *et al.*,

2010).

2.3 RECUPERAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

A primeira etapa para a recuperação dos exopolissacarídeos é a extração, que pode ser feita por centrifugação ou aquecimento térmico, caso o polímero seja estável à temperatura a que ele será submetido. A velocidade e o tempo da centrifugação depende da sua natureza e viscosidade. Para a extração do polissacarídeo ligado à célula o método geralmente utilizado é a autoclavagem, porém outros métodos como a utilização do sonificador, ebulição da suspensão celular por 15 minutos em água, aquecimento a 60° C em solução salina e aquecimento na água com fenol a 65° C também são possíveis (KUMAR *et al.*, 2007).

A segunda etapa é a separação do polímero que geralmente ocorre por utilização de solventes orgânicos polares miscíveis em água como o álcool isopropílico, etanol e acetona, que fazem com que o polímero seja precipitado a partir do sobrenadante (ASHTAPUTRE *et al.*, 1995; SEO *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2007; BRANDÃO *et al.*, 2013). O volume do solvente utilizado pode ser uma, duas ou três vezes o volume do sobrenadante, porém a proporção mais utilizada é 2:1. Os solventes orgânicos possibilitam a separação pela diminuição da solubilidade do exopolissacarídeo em água. O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e o 3,5,6 - trifenil - 2,3,5,6 tetraaza biciclo-1-hexeno (nitron) também podem ser utilizados nessa etapa da separação (KUMAR *et al.*, 2007), assim como modificação no pH (STEPHEN *et al.*, HUANG *et al.*, 2009).

Após a separação do polímero, este é centrifugado, seco em estufa, purificado e liofilizado. A purificação pode ser realizada por meio da diálise (ASHTAPUTRE *et al.*, 1995; BERWANGER *et al.*, 2006; ASSIS *et al.*, 2014). Geralmente nenhuma modificação é feita no exopolissacarídeo após a sua produção, porém eles podem ser alterados fisicamente ou quimicamente. Essas alterações interferem nas propriedades reológicas e físicas dos polímeros (ASHTAPUTRE *et al.*, 1995; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003; STEPHEN *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2007).

2.4 VISCOSIDADE APARENTE DOS BIOPOLÍMEROS E COMPORTAMENTO

A reologia é a ciência do escoamento e o fluxo da matéria. Estuda a forma como os materiais reagem a uma força aplicada sobre eles. Qualquer material tem propriedade reológica (STEFFE, 1996).

Nos fluidos newtonianos a viscosidade sofre interferência da temperatura e pressão. No escoamento desses fluidos, em regime laminar, há uma proporção entre a tensão cisalhante e a taxa de cisalhamento (MACHADO, 2002). Os fluidos que não seguem esse comportamento são denominados de fluidos não-newtonianos, no qual as propriedades de escoamento são influenciadas pela taxa de cisalhamento e o coeficiente de viscosidade é a viscosidade aparente (Rao *et al.*, 2014). A taxa de cisalhamento é a relação entre a variação da velocidade de escoamento e a distância entre camadas ou partículas discretas de fluido. Já o coeficiente de viscosidade é a resistência de um fluido contra todo tipo de alteração da sua posição (MACHADO, 2002).

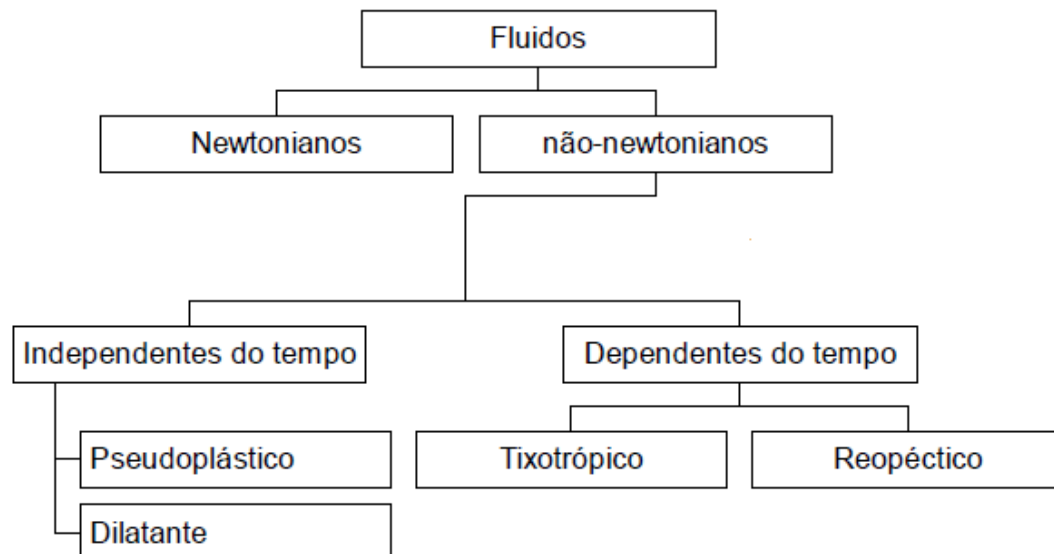


Figura 1: Classificação do comportamento reológico de fluidos

Os fluidos não newtonianos podem ser divididos em duas categorias: independentes do tempo e dependentes do tempo (Figura 1). Os primeiros só

dependem da taxa de cisalhamento, enquanto os últimos também dependem da duração do cisalhamento. O comportamento do fluxo independente do tempo pode ser dividido nas categorias pseudoplástico e dilatante, dependendo se a viscosidade aparente diminui ou aumenta, respectivamente, com um aumento na taxa de cisalhamento (RAO *et al.*, 2014).

Muitos fluidos não newtonianos exibem comportamentos pseudoplásticos, dentre eles materiais líquidos como suspensões, dispersões e emulsões, de enorme interesse industrial (MACHADO, 2002). O comportamento pseudoplástico é aquele no qual em uma taxa de cisalhamento baixa, os polímeros estão mais ligados entre si e, com isso, há uma resistência ao fluxo, o que torna a viscosidade alta. Porém, quando a taxa de cisalhamento vai aumentando, os polímeros vão ficando mais lineares e, assim, passam a se orientar na direção do fluxo, opondo resistência menor ao escoamento e, conseqüentemente, a viscosidade diminui. Em um certo momento, quando a taxa de cisalhamento é alta, as cadeias tornam-se totalmente orientadas na direção do fluxo, logo a viscosidade não mais se relaciona com a taxa de cisalhamento (AKCELRUD, 2007). Os alimentos dilatantes praticamente não são encontrados (RAO *et al.*, 2014).

A diminuição da viscosidade de grande parte dos materiais líquidos pseudoplásticos acontece de forma reversível, ou seja, eles voltam a ter uma viscosidade alta quando o cisalhamento para ou é interrompido (MACHADO, 2002)

Fluidos não newtonianos com propriedades de fluxo dependente do tempo são subdivididos em reopéticos e tixotrópicos. Nos fluidos tixotrópicos, a uma taxa de cisalhamento fixa, a viscosidade diminui com o tempo, enquanto que a viscosidade de um fluido reopético aumenta com o tempo (RAO *et al.*, 2014).

Os viscosímetros são instrumentos que medem os parâmetros viscosos do fluido, sob cisalhamento contínuo. No viscosímetro Brookfield de cilindros coaxiais, a taxa de cisalhamento é controlada e o sistema é Searle. Nesse tipo de sistema, um corpo cilíndrico interno gira, imerso em um fluido e mede o torque necessário para vencer a resistência viscosa do fluido devido ao cisalhamento provocado. A leitura da deflexão, transmitida por uma mola espiralada conectada ao corpo cilíndrico através do eixo

principal, é realizada através do painel digital. A deformação da mola é proporcional à viscosidade do fluido para uma certa velocidade de rotação do corpo imerso. Os modelos analógicos possuem diferentes letras LV, RV, HA e HB que significam, respectivamente, baixa, média, alta e ultra-alta viscosidade. O adaptador ULA deve ser utilizado quando se quer analisar os fluidos newtonianos ou não-newtonianos que tenham baixa viscosidade (MACHADO, 2002).

2.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR

Para a determinação da massa molecular utiliza-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual colunas recheadas são usadas e uma fase móvel, que é transportada pela coluna sob alta pressão. Diversos tipos de detectores como o espectrômetro de massa, índice de refração, absorvância ou emissão de luz são posicionados na saída da coluna, o que faz com que haja um registro sucessivo da composição do efluente, resultando em um cromatograma que pode ser utilizado para identificar ou quantificar os componentes da amostra (COLLINS *et al.*, 2006).

A única exigência para a realização da CLAE é que a amostra seja solúvel na fase móvel. Consequentemente, é a ferramenta utilizada para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas, assim como para diversos outros compostos de massa molar alta e/ou estabilidade térmica (COLLINS *et al.*, 2006).

A cromatografia por exclusão se baseia na separação pelo tamanho das moléculas do polímero em solução. Essa separação ocorre pela passagem da fase móvel pela fase estacionária contendo partículas porosas. As moléculas maiores presentes na fase móvel não ficam retidas nos poros da fase estacionária e assim eluem antes do que as moléculas menores que permeiam pelos poros. As moléculas de tamanho médio tem penetração parcial. É um dos mecanismos geralmente utilizados na determinação do peso molecular de polímeros (COLLINS *et al.*, 2006; AKCELRUD, 2007; RUDIM e CHOI, 2015).

A cromatografia por exclusão pode ser dividida em filtração em gel que utiliza

fases móveis aquosas e é comumente utilizada para a separação de biopolímeros solúveis em água e, permeação em gel, na qual utiliza fases móveis orgânicas (COLLINS *et al.*, 2006).

2.6 EXOPOLISSACARÍDEOS DA FAMÍLIA SPHINGOMONADACEAE

Exopolissacarídeos relacionados com gelana apresentam uma mesma estrutura básica que consiste em unidades tetrassacarídicas repetitivas compostas por (glicose – ácido glicurônico – glicose – X, sendo X L-ramnose ou L-manose), no qual diferentes grupos laterais estão ligados como L-glicerato, grupos O-acetil, sacarídeos, influenciando as suas propriedades reológicas. Nos biopolímeros gelana, ramsana, diutana e welana a quarta unidade é composta de L-ramnose. Já nos heteropolissacarídeos PS-88 e PS-198, a quarta unidade pode ser tanto L-ramnose quanto L-manose (CHOWDHURY *et al.*, 1987, JANSSON *et al.*, 1983, 1985, 1986, KUO *et al.*, 1986, CAMPANA *et al.*, 1990).

Esses exopolissacarídeos são denominados “sphingans” e as bactérias que os secretam são bacilos Gram-negativos e apresentam pigmentação amarelada. São pertencentes ao gênero *Sphingomonas*, agora referidas como Sphingomonadaceae (POLLOCK *et al.*, 1993; TAKEUSHI *et al.*, 2001). Possuem uma viscosidade estável quando em solução ao longo de uma ampla faixa de pH (2-12) e temperatura (100-150 °C), dependendo da sua estrutura química (SCHMID *et al.*, 2014).

Em 25% aproximadamente das unidades tetrassacarídicas repetitivas do polissacarídeo extracelular gelana (S-60) encontram-se grupos O-acetil ligados a uma das moléculas de glicose (JANSSON *et al.*, 1983). Também pode ser encontrado fazendo parte da cadeia lateral L-glicerato (KUO *et al.*, 1986).

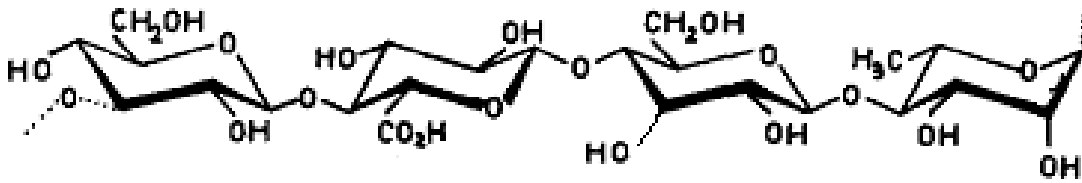


Figura 2: Estrutura da unidade repetitiva tetrassacarídica do polímero gelana em seu estado nativo (Jansson *et al.*, 1983)

A gelana pode ser comercializada em ambas as formas, com alto ou baixo conteúdo de grupos acil. Pode ser utilizada na indústria alimentícia como gelificante, por exemplo, para a produção de geleias; como agente de suspensão para uma gama de laticínios neutros e produtos a base de soja. Forma filmes e revestimentos que podem ser utilizados em pães e empanados. Além disso, o acréscimo dessa goma na superfície de produtos alimentícios facilita a adesão de temperos e sabores (SWORN *et al.*, 2009). A estabilidade dessa goma na presença de algum ácido é uma vantagem para a sua utilização em produtos à base de frutas (JIM *et al.*, 2003). Pode formar géis com texturas diferentes através da adição de sais (PRAJAPATI *et al.*, 2013).

A gelana também pode ser utilizada como substituto do ágar, pois forma um gel mais claro, possui a mesma força quando utilizada em menor quantidade e apresenta menor toxicidade para micro-organismos sensíveis (KANG e PETTIT, 1993; PRAJAPATI *et al.*, 2013). Além disso, é estável sob altas temperaturas e solidifica mais rápido do que o ágar (PRAJAPATI *et al.*, 2013). Um derivado carboxilado de gelana demonstrou ter uma alta atividade antioxidante, no qual o elevado conteúdo de ácido urônico teve um papel relevante (ELBOUTACHFAITI *et al.*, 2011).

Na cadeia lateral de welana (S-130) encontra-se em 2/3 da unidade tetrassacarídica L-ramnose ligada a um dos resíduos de glicose e 1/3 de L-manose. Enquanto que 50% aproximadamente dessas unidades contêm grupos O-acetil (JANSSON *et al.*, 1986).

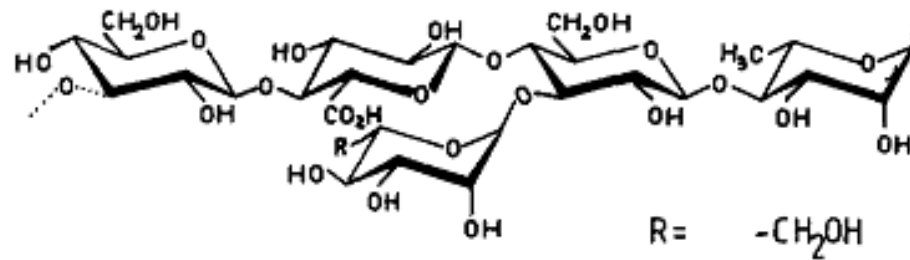


Figura 3: Estrutura da unidade tetrassacarídica repetitiva do polímero welana adaptada (Campana *et al.*, 1990)

O biopolímero “welana” possui alta viscosidade. Apresenta estabilidade na faixa de pH 2-12 e em soluções que contenham grandes quantidades de sais. Mantém ótima viscosidade em temperaturas de até 150°C. Além de possuir uma melhor estabilidade térmica quando comparada com a goma xantana (SANDFORD *et al.*, 1984, KANG e PETTIT, 1993). Pode ser utilizada em misturas injetadas sobre altas pressões para extração de petróleo e gás natural e na recuperação avançada de petróleo. Possui a propriedade de prevenir a fase de separação dos produtos à base de cimento. Apresentando potencial para construção de concreto submerso e para a cimentação de campo petrolífero (KANG e PETTIT, 1993).

Já a cadeia lateral de ramsana (S-194) é formada por duas moléculas de glicose e acetil (JANSSON *et al.*, 1986).

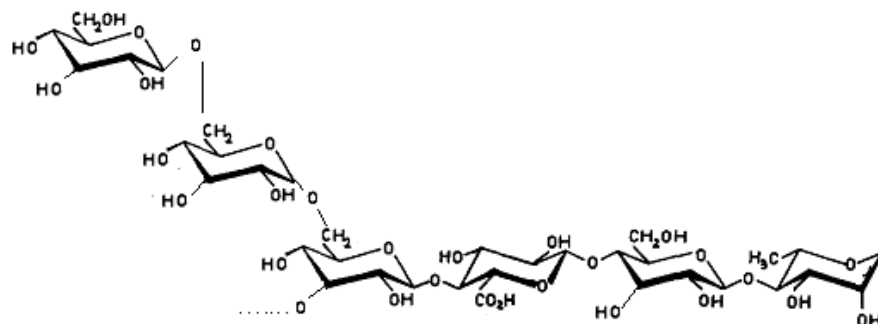


Figura 4: Estrutura da unidade tetrassacarídica repetitiva do polímero ramsana modificada (Jansson *et al.*, 1986)

A “Ramsana” possui propriedade pseudoplástica, sendo semelhante à da goma xantana. Não é formadora de gel. Além disso, sob temperaturas de até 100°C, não modificam sua viscosidade em soluções; e, a perda da viscosidade é termorreversível (SANDFORD *et al.*, 1984, KANG e PETTIT, 1993, XU *et al.*, 2015). É um eficiente agente de suspensão em fertilizantes que contenha médio a baixo nível de fosfato e elevados níveis de nitrogênio. Também é usada em tintas à base de água e revestimentos, como agente de suspensão, estabilizante e espessante (KANG *et al.*, 1993).

A diutana (S-657) é composta de duas unidades do açúcar ramnose em sua cadeia lateral (CHOWDHURY *et al.*, 1987).

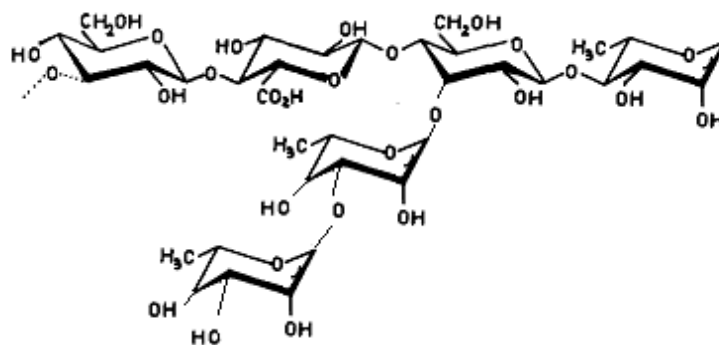


Figura 5: Estrutura da unidade tetrassacarídica repetitiva de diutana modificada (Chowdhury *et al.*, 1987)

O polímero “diutana” possui elevada viscosidade em quantidade muito pequena e em altas temperaturas, além de apresentar uma espuma estável. Por causa disso, pode ser utilizado como agentes de suspensão, de ligação, espessante, lubrificante, emulsificante, estabilizante e para a formação de filmes. Estabilidade a adição de sais também integram as suas propriedades (PEIK *et al.*, 1992). Algumas das suas utilidades são como adesivos, retentor de água em rejuntas e argamassas, produtos de limpeza, explosivos embalados, revestimentos de sementes, produção de alimentos que contenham grande quantidade de açúcar como geleias, produtos à base de laticínios como sorvete e iogurte. Uma utilidade importante encontra-se no campo do petróleo (PEIK *et al.*, 1992).

Os heteropolissacarídeos sphingans, como gelana, diutana, welana e ramsana,

31461, entretanto, depois foi encontrada a *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 que sintetiza esse mesmo exopolissacarídeo com um rendimento muito maior (MAUGERI *et al.*, 2001).

2.7 SPHINGOMONADACEAE

A família Sphingomonadaceae é composta por bacilos não formadores de esporos, estritamente aeróbios, quimioorganotróficos e que possuem glicosfingolipídeos. Os gêneros *Sphingomonas* e *Sphingobium* fazem parte dessa família (TAKEUSHI *et al.*, 2001).

O gênero *Sphingomonas* pertence à subclasse α -4 de Proteobacteria (TAKEUSHI *et al.*, 1994). Bactérias próximas filogeneticamente com as *Sphingomonas* e que não fazem parte da família Sphingomonadaceae são as pertencentes aos gêneros *Porphyrobacter*, *Erythrobacter* e *Erythrobacterium* (TAKEUSHI *et al.*, 1995; YIM *et al.*, 2010). Já o gênero *Zymomonas* pertence a essa família e também está relacionado com as *Sphingomonas* (TAHARA *et al.*, 1994).

Todos os membros de *Sphingomonas* possuem como uma característica típica a presença do ácido 2-hidroxi-14:0 (2-OH 14:0) (TAKEUSHI *et al.*, 1995). Os lipopolissacarídeos, assim como outras estruturas que são características de bactérias Gram-negativas, estão ausentes (WHITE *et al.*, 1996). Os glicosfingolipídeos apresentam uma função semelhante à desempenhada pelos lipopolissacarídeos (KAWAHARA *et al.*, 1991).

As bactérias pertencentes ao gênero *Sphingomonas* são capazes de degradar diversos poluentes orgânicos, como dibenzo-p-dioxina e dibenzofurano (WITTICH *et al.*, 1992), p-Cresol, xileno, salicilato e benzoato. Também são capazes de degradar, mas não completamente tolueno e naftaleno (FREDRICKSON *et al.*, 1995). Além de fenantreno (XIAO-HONG *et al.* 2010), carbofurano (FENG *et al.* 1997), hexaclorociclohexano (IMAI *et al.*, 1991) e pentaclorofenol (KARLSON *et al.*, 1995).

Bactérias do gênero *Sphingomonas* apresentam atividade antimicrobiana contra

cocos e bacilos Gram-positivos, como encontrado para uma nova espécie isolada de um molusco bivalve (ROMANENKO *et al.*, 2007). Além de produzir composto que tem ação anti-cianobacteriana (IMAMURA *et al.*, 2000).

Sphingomonas são Gram-negativas. O conteúdo dos nucleotídeos guanina/citosina do DNA é de 62-68%. Os polimorfismos do RNAr 16S que permite reconhecer esse gênero são encontradas nas posições 52:359 (C:G), 134 (G), 593 (G), 987:1218 (G:C) e 990:1215 (U:G) (TAKEUSHI *et al.*, 2001).

A detecção das *Sphingomonas* no solo pode ser realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um conjunto de primers específicos para o gênero (LEUNG *et al.*, 1999). A hibridização fluorescente in situ (FISH) também pode ser utilizada para identificar *Sphingomonas* em culturas puras e mistas e também em amostras ambientais, mas não é totalmente eficaz porque a sonda de oligonucleotídeos usada para esse gênero também é capaz de hibridizar bactérias do gênero *Zymomonas* (NEEF *et al.* 1999).

A utilização de um meio seletivo com uma fonte de carbono específica e/ou um determinado antibiótico é uma forma prática de avaliar a presença de grupos bacterianos específicos em amostras ambientais (VANBROEKHOVEN *et al.*, 2004). Apesar das bactérias pertencentes ao gênero *Sphingomonas* terem diversas aplicações, ainda não é encontrado no mercado nenhum meio específico para este grupo (VANBROEKHOVEN *et al.*, 2004; YIM *et al.*, 2010).

O antibiótico estreptomicina adicionado há um meio pode ser usado para selecionar *Sphingomonas*. Porém, outras bactérias, grande parte da classe α -Proteobacteria, também apresentam resistência. O uso do antibiótico estreptomicina em adição a observação da cor amarelada que a maioria das *Sphingomonas* possuem pode ser utilizada como um método rápido de verificação da presença e quantidade de bactérias pertencentes a esse gênero (VANBROEKHOVEN *et al.*, 2004).

Um meio semi-seletivo para este grupo utilizando piperacilina e estreptomicina e um conjunto de primers que foram desenhados de acordo com as duas regiões conservadas do gene serina palmitoil-transferase das *Sphingomonadaceae*, que é

indispensável para a via de biossíntese de esfingolípídios, se mostrou eficaz para o crescimento, isolamento e identificação das bactérias pertencentes ao gênero *Sphingomonas* a partir de diversos ambientes (YIM *et al.*, 2010).

Sphingobium são Gram-negativas, medem 0,3-0,7 x 1-3,5µm. O ácido graxo dominante é 18:1. O conteúdo dos nucleotídeos guanina/citosina é de 62-67%. Os polimorfismos do rRNA 16S que permite reconhecer esse gênero são encontradas nas posições 52:359 (U:A), 134 (G), 593 (U), 987:1218 (A:U) e 990:1215 (U:G) (TAKEUSHI *et al.*, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

A partir de isolados bacterianos de ambiente marinho, selecionar os pertencentes à família Sphingomonadaceae e Bacillaceae que produzam exopolissacarídeos. Quantificar e caracterizar os exopolissacarídeos quanto à viscosidade aparente e massa molecular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e caracterizar linhagens bacterianas de Sphingomonadaceae e Bacillaceae;
- Comparar o efeito da composição do meio, mais especificamente da fonte de carbono, na produção e propriedades dos exopolissacarídeos resultantes;
- Determinar a viscosidade aparente dos biopolímeros;
- Determinar a massa molecular dos biopolímeros produzidos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DAS LINHAGENS PERTENCENTES À FAMÍLIA SPHINGOMONADACEAE E BACCILACEAE ATRAVÉS DE ANTIBIÓTICO

Uma forma de triagem inicial para os isolados pertencentes à família Sphingomonadaceae e Bacillaceae foi realizada através do meio ágar nutriente contendo 100 µg/mL de estreptomicina. Bactérias pertencentes à Coleção de Cultura do Instituto de Ciências da Saúde (CCMICS) (SB 21, SB 22, SB 40, SB 45, SB 46, SB 47, SB 48, SB 57, MG 51, MG 52, MG 58, MG 59, MG 64, MG 65, MG 66, MG 67, MG106, SM 30, SM 38, SM 39, SM 43, SM 101) que foram isoladas dos sedimentos das praias Maragogipe (MG), Saubara (SB) e Salinas das Margaridas (SM) utilizando o meio Zobbel foram testadas quanto ao crescimento. Além disso, mais duas bactérias (530 e 531) também pertencentes à CCMICS e que foram isoladas do trato gastrointestinal de poliquetas em Madre de Deus foram testadas quanto a capacidade de crescimento em meio de cultura suplementado com o antibiótico estreptomicina.

Quatro isolados (CCMICS 530, CCMICS 531, CCMICS MG 58, CCMICS SB 22) que cresceram em meio ágar nutriente contendo 100 µg/mL do antibiótico estreptomicina também foram testados em relação ao crescimento em meio ágar nutriente contendo 200 µg/mL do mesmo antibiótico. A *Staphylococcus aureus* que é resistente ao antibiótico foi utilizada em ambas as concentrações de estreptomicina como controle (YIM *et al.*, 2012).

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

A fim de verificar algumas características morfológicas das colônias, foram realizados ensaios de coloração de Gram e semeaduras em estrias, em ágar nutriente.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS SELECIONADAS

A extração de DNA das 4 linhagens bacterianas selecionadas (CCMICS 530,

CCMICS 531, CCMICS MG 58 e CCMICS SB 22) foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Posteriormente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi feita utilizando o primer específico para bactéria 8F 5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3' e o primer universal 1391R 5' – GACGGGCGGTGWGTRCA – 3' (LEY *et al.*, 2006). Para cada reação de PCR, 1 µL do DNA extraído foi utilizado em um volume total de 25 µL, sendo 2,5 µL do tampão 10X, 2 µL do dnTP, 1 µL de cada primer, 0,1 µL da Taq DNA polimerase e o restante de água. As reações de PCR foram realizadas no aparelho ABI 7500 da Applied Biosystems utilizando os seguintes parâmetros: desnaturação a 95° C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos sendo 45 segundos a 95° C, 45 segundos a 59° C e 1 minuto a 72° C e, uma extensão final a 72° C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram purificados com Exosap, incubando a 37 ° C por 15 minutos e 80° C por 15 minutos e então sequenciados na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). A identificação molecular foi feita a partir da similaridade entre sequências descritas em bancos de dados públicos, como o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.4 PADRÃO DE CRESCIMENTO

Para estudar o comportamento quanto ao crescimento das linhagens testadas, 100 µL das bactérias CCMICS MG 48 e CCMICS SB 22 foram reativadas em 10 ml de YM (Yeast Malt) contendo (gL⁻¹): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0 glicose 10,0; e incubadas em estufa a 30° C. Após 12 horas de crescimento, 800 µL dos inóculos foram aliquotados em 70 ml do meio YM e incubadas em agitador orbital (Shaker – Tecnal TE 420) com temperatura controlada de 28°C ± 2°C e rotação de 120 rpm para o início do monitoramento do padrão de crescimento.

As bactérias CCMICS 530 e CCMICS 531 foram reativadas, aliquotando 500 µL em 50 mL de caldo nutriente e incubadas em agitador orbital (Shaker – Tecnal TE 420) com temperatura controlada de 30°C ± 2°C e rotação de 150 rpm. Após 16 horas de crescimento, 1 mL dos inóculos foram aliquotados em 70 ml de caldo nutriente e incubadas em agitador orbital com temperatura controlada de 30°C ± 2°C e rotação de

150 rpm para o início do monitoramento do padrão de crescimento.

A absorvância foi monitorada, em comprimento de onda 560 nm, utilizando o espectrofotômetro SP-22 Bioespectro. Alíquota de 1 mL de cada amostra foi sendo retirada a cada 2-4 horas para avaliar através da densidade ótica (D.O.) e a cada 6 horas para plaqueamento em ágar nutriente, após a diluição seriada, sendo que os intervalos do plaqueamento obedeceram também a leitura da densidade ótica. Os valores obtidos a partir da absorvância e contagem total foram utilizados para a construção das curvas.

4.5 PRODUÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

As bactérias CCMICS 530 e CCMICS 531 foram reativadas em 50 mL do meio caldo nutriente, alíquotando 500 μ L, e incubadas em agitador orbital (Shaker – Tecnal TE 420) com temperatura controlada de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e rotação de 150 rpm. Após 12 horas de crescimento, foi produzido o inóculo, alíquotando 1 mL em 70 mL de caldo nutriente e incubadas em agitador orbital nas mesmas condições descritas anteriormente.

Já as CCMICS SB 22 e CCMICS MG 58 foram reativadas em 10 ml de YM e incubadas em estufa a 30°C . Após 16 horas de crescimento, foi feito o inóculo, alíquotando 800 μ L em 70 ml de YM e incubadas em agitador orbital (Shaker – Tecnal TE 420) com temperatura controlada de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e rotação de 120 rpm.

Após 15 horas de crescimento das CCMICS 530 e 531 e 8 e 10 horas, respectivamente, de crescimento das CCMICS SB 22 e CCMICS MG 58 que corresponde ao momento ótimo da fase log da curva de crescimento dessas bactérias, 10 mL foram retirados e inoculados em 90mL do meio de produção em frascos tipo Erlenmeyrs de 250 mL e incubadas em agitador orbital a 180 rpm, 30°C , por 72 horas. O meio de produção de biopolímero utilizado contém por litro: 40 g de sacarose, 1 g de KNO_3 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,1 g de CaSO_4 , 0,05 g de NaMoO_4 , pH 7,2 com variação de 0,2 para mais ou para menos (ASHTAPUTRE *et al*, 1995;

BERWANGER *et al.*, 2006). O experimento foi realizado em triplicata.

Após uma nova reativação das bactérias CCMICS 530, CCMICS 531, CCMICS SB22 e CCMICS MG 58 e inóculo seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente para a produção de EPS, 10 ml foram retirados e inoculados no mesmo meio de produção anteriormente citado com a diferença da sacarose que foi substituída por 2% (m/v) de glicerina bruta, em frascos tipo Erlenmeyers de 250 ml e incubadas em agitador orbital a 180 rpm, 28°C, por 72 horas. O experimento foi também realizado em triplicata.

4.6 RECUPERAÇÃO DOS BIOPOLÍMEROS

Para a sedimentação das células, foi realizada uma centrifugação do caldo de cultivo a 5000 rpm, por 30 minutos à 4°C. Após o sobrenadante ser transferido para outro tubo, foi adicionado álcool etílico na proporção 1:3 (v/v) e mantido sobre refrigeração durante 12 horas. As amostras foram novamente centrifugadas a 5000 rpm, 30 minutos à 4°C, a fim de recuperar o polímero precipitado, que foi separado e seco em estufa (30°C durante 24 horas), pesado por gravimetria e armazenado (BERWANGER *et al.*, 2006). O cálculo da produção do EPS foi em gL^{-1} de meio de cultivo.

4.7 TESTE DE SOLUBILIDADE EM ÁGUA

Os exopolissacarídeos foram testados quanto à solubilidade em água destilada, misturando uma pequena fração dos EPS a 1 mL de água destilada.

4.8 VISCOSIDADE APARENTE DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Os exopolissacarídeos foram dissolvidos em água deionizada, concentração de 0,09% (m/v) para análise de viscosidade aparente, a temperatura de 25°C. A parte do

EPS utilizada para a análise foi a solúvel em água. O aparelho utilizado foi o reômetro digital da marca Brookfield, modelo LV, spindle ULA. A taxa de cisalhamento variou de 5 a 150 s^{-1} , em 30 ciclos, com intervalo de 5 segundos. A viscosidade aparente máxima foi considerada a partir de um torque acima de 10%, por recomendação do fabricante.

A determinação da massa molecular dos exopolissacarídeos das CCMICS MG 58 e CCMICS 531 não foi realizado porque são insolúveis em água e a CCMICS SB 22 não produziu polímero.

4.9 DIÁLISE E LIOFILIZAÇÃO

A diálise do EPS foi realizada durante 48 horas. O biopolímero seco produzido pela CCMICS 530, que foi o único EPS totalmente solúvel em água, foi diluído em água deionizada e colocado em uma membrana e submetido a agitação durante todo o tempo da diálise, sendo que a água foi trocada seis vezes, periodicamente a cada 8 horas.

Posteriormente, o biopolímero em solução aquosa foi retirado e colocado em um frasco próprio para liofilização, sendo realizado no Laboratório de Física Nuclear da Universidade Federal da Bahia.



Figura 8: Polímero produzido pela bactéria CCMICS 530 após liofilização

4.10 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DA CCMICS 530

O peso molecular do biopolímero produzido pela CCMICS 530 no meio de produção utilizando sacarose foi estimado pela cromatografia por exclusão de tamanho (sistema GPC HPLC, PerkinElmer Série 200, Shelton, U.S.A) com colunas em série Shodex OHpak SB 803, 804, 805, 806 (Kawasaki-ku, Japan), usando 50 mM NaNO₃ como eluente a uma taxa de fluxo de 1 mL·min⁻¹ no laboratório Laboratório de Pescados e Cromatografia Aplicada (Lapesca) da Universidade Federal da Bahia. O detector usado foi um Índice de refração (RI) PerkinElmer Série 200 (Shelton, U.S.A.). A calibração da coluna foi feita com padrões de dextrana (peso molecular entre 1.02 x 10⁵ Da e 5.9 x 10⁶ Da) (American Polymer Standards, U.S.A.). Uma alíquota de 80 µL (0.3% m/v) dos padrões da dextrana de diferentes massas moleculares e da goma da CCMICS 530 em solução aquosa foram injetados nas mesmas condições cromatográficas.

A determinação da massa molecular da CCMICS 530 foi realizada utilizando uma curva de calibração log MM (massas moleculares dos padrões de dextrana) × RT (tempo de retenção).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e o teste de contraste utilizado foi o teste de tukey (5% de probabilidade), utilizando o software Assistat versão 7.7 (2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS BACTERIANOS

As bactérias CCMICS MG 58, CCMICS SB 22, CCMICS 530 e CCMICS 531 foram as únicas resistentes a 100 µg/ml do antibiótico estreptomicina dos 24 isolados (SB 21, SB 22, SB 40, SB 45, SB 46, SB 47, SB 48, SB 57, MG 51, MG 52, MG 58, MG 59, MG 64, MG 65, MG 66, MG 67, MG106, SM 30, SM 38, SM 39, SM 43, SM 101, CCMICS

530 e CCMICS 531) testados (Figura 8). *Staphylococcus aureus* foi utilizada como controle.

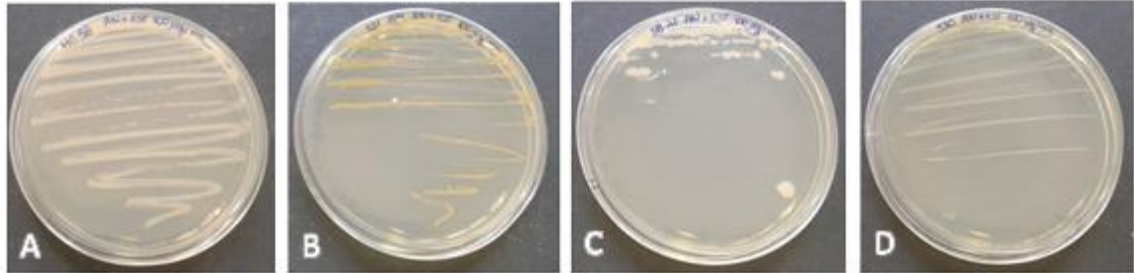


Figura 9: Crescimento em meio ágar nutriente contendo 100 µg/ml do antibiótico estreptomicina das bactérias A: CCMICS MG 58, B: CCMICS 531, C: CCMICS SB 22, D: CCMICS 530.

As CCMICS MG58, SB 22, 531 e 530 foram testadas quanto ao crescimento em meio ágar nutriente contendo 200 µg/ml de estreptomicina, mas somente as três primeiras apresentaram crescimento (Figura 9).

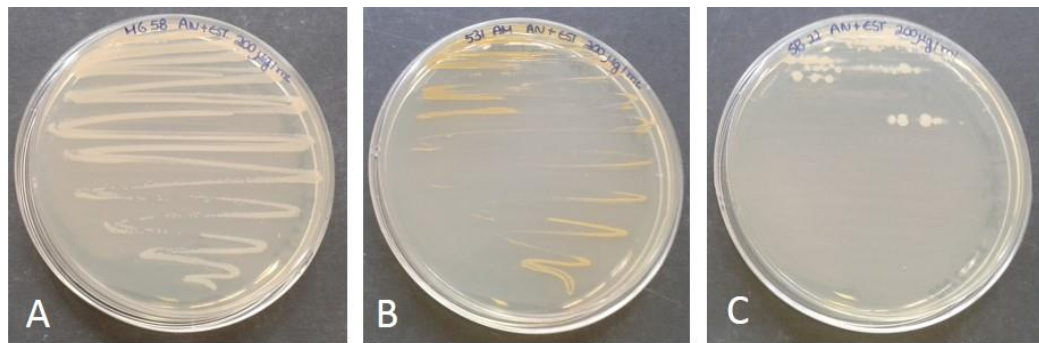


Figura 10: Crescimento em meio ágar nutriente contendo 200 µg/ml do antibiótico estreptomicina das bactérias A: CCMICS MG 58, B: CCMICS 531, C: CCMICS SB 22.

VANBROEKHOVEN *et al.*, 2004 testou 17 espécies do gênero *Sphingomonas* e 28 bactérias não pertencentes a esse gênero em um meio contendo concentrações distintas do antibiótico estreptomicina (2, 5, 10, 15, 20, 50, 100, 150 e 200 µg/ml) e quase todas as espécies do gênero *Sphingomonas* apresentaram crescimento até a concentração máxima de 200 µg/mL do antibiótico, com exceção da *Sphingomonas ursincola* que teve uma tolerância até 50 µg/mL. Enquanto que das 28 bactérias testadas não pertencentes ao gênero *Sphingomonas*, somente 4 α -Proteobacterias

creceram em 200 µg/mL de estreptomicina.

YIM *et al.* (2012) também testou algumas concentrações do antibiótico estreptomicina (50, 100 e 200 µg/mL) misturado com 50 µg/mL do antibiótico piperacilina para verificar a resistência de bactérias isoladas de uma indústria e todas as *Sphingomonas* cresceram em 100 µg/ml do antibiótico estreptomicina e, a maioria, também cresceu em 200 µg/ml do antibiótico. As bactérias não pertencentes ao gênero *Sphingomonas* não resistiram a 100 e 200 µg/ml de estreptomicina em conjunto com 50 µg/ml de piperacilina.

A partir do exposto acima, pode-se concluir que mesmo a CCMICS 530 não apresentando resistência a 200 µg/ml do antibiótico estreptomicina, apresentou resistência a 100 µg/ml, indicando pertencer ao gênero *Sphingomonas*.

5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS

A partir dos ensaios de coloração de Gram e plaqueamento da cultura em ágar nutriente, pode-se observar que as CCMICS 530 e 531 são bacilos Gram-negativos com aspecto mucóide e de coloração amarelada. Segundo VANBROEKHOVEN *et al.*, 2004, das 37 bactérias pertencentes à família Sphingomonadaceae estudadas, apenas 7 não possuem coloração amarelada. TAKEUSHI *et al.*, 2001, caracterizou os gêneros *Sphingomonas* e *Sphingobium* como bacilos Gram-negativos. As CCMICS SB 22 e MG 58 são bacilos Gram-positivos, com esporos, aspecto mucóide e coloração creme.

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

O sequenciamento do gene rRNA 16S das linhagens bacterianas desse estudo indicou os seguintes resultados considerando 100% de cobertura: em relação à CCMICS SB 22 não foi possível obter o resultado do sequenciamento, CCMICS MG 58 apresentou identidade de 99% para o gênero *Bacillus* sp., CCMICS 530 obteve identidade de 99% para *Sphingobium* sp. e CCMICS 531 apresentou identidade de 100% para o gênero *Sphingomonas* sp.

Logo, a partir dos resultados do sequenciamento, pode-se concluir que o antibiótico estreptomicina nas concentrações 100 e 200 µg/mL não é eficaz para

selecionar somente bactérias da família Sphingomonadaceae, tendo em vista que o gênero *Bacillus* sp. também foi resistente. De acordo com BAUTISTA *et al.* (2012), *Bacillus thuringiensis* é resistente ao antibiótico estreptomicina. LUNA *et al.* (2007) testou 5 espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, incluindo *Bacillus thuringiensis*, e todas foram suscetíveis à concentração do antibiótico estreptomicina utilizada. Pode-se perceber que a resistência das bactérias aos antibióticos depende muito da concentração testada. Apesar disso, o antibiótico estreptomicina nas concentrações 100 e 200 µg/mL pode ser utilizado em uma triagem inicial, já que não há ainda no mercado nenhum meio seletivo para esta família e esse antibiótico é fácil de ser encontrado, além de ter um custo acessível.

5.4 CURVAS DE CRESCIMENTO

Os resultados da curva de crescimento mostraram que a bactéria pertencente ao gênero *Bacillus* sp. apresentou a fase lag de 0 a 4 horas, fase log até 12 horas e, a partir deste ponto a fase estacionária, que persiste até 24 horas (Figura 11).

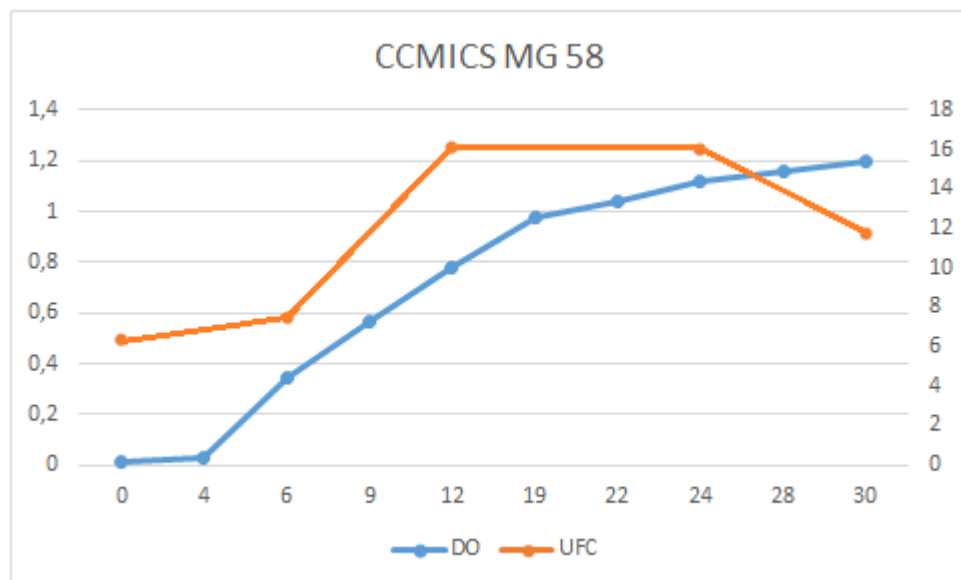


Figura 11: Curva de crescimento microbiano da bactéria pertencente ao gênero *Bacillus* sp.

A CCMICS SB 22 também apresentou a fase lag de 0 a 4 horas, fase log até 9 horas, seguida pela fase estacionária (Figura 12).

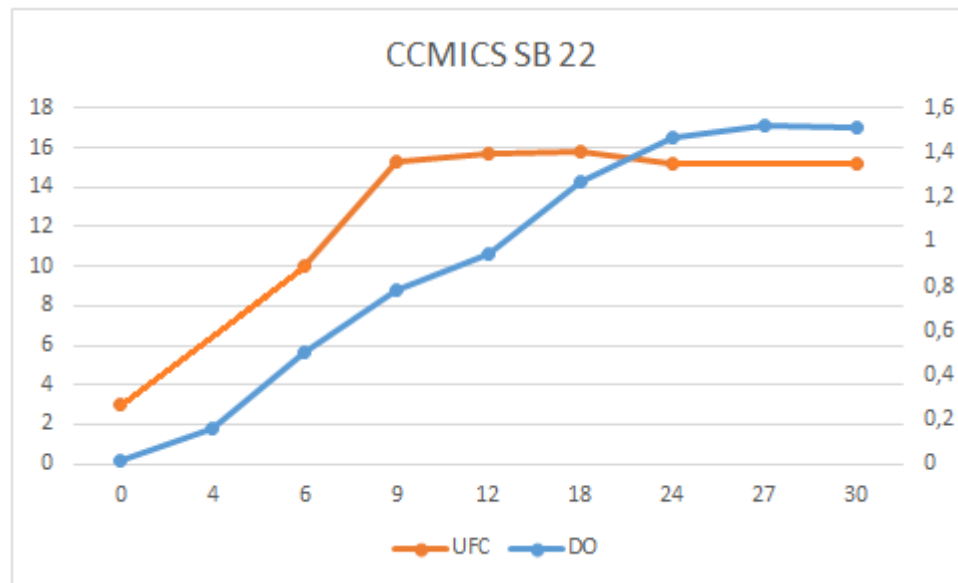


Figura 12: Curva de crescimento microbiano da bactéria CCMICS SB 22

De acordo com os resultados da curva de crescimento da bactéria do gênero *Sphingobium* sp., pode-se verificar que a fase lag dura 4 horas, seguida pela fase log até 19 horas e depois ocorre a fase estacionária (Figura 13).

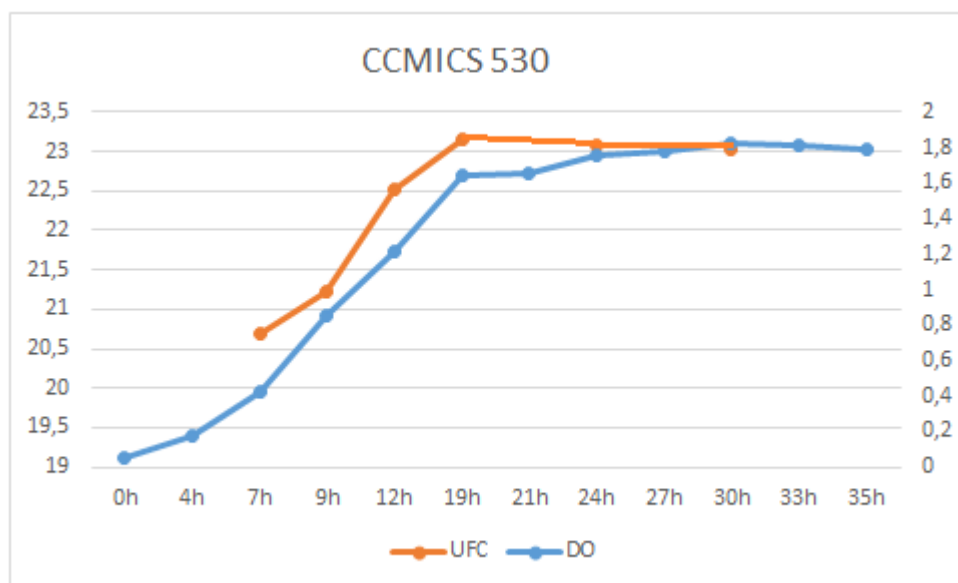


Figura 13: Curva de crescimento microbiano da bactéria pertencente ao gênero *Sphingobium* sp.

A partir da curva de crescimento da bactéria pertencente ao gênero

Sphingomonas sp., pode-se concluir que a fase lag ocorre entre 0 e 4 horas, fase log até 19 horas, seguida pela fase estacionária (Figura 14).

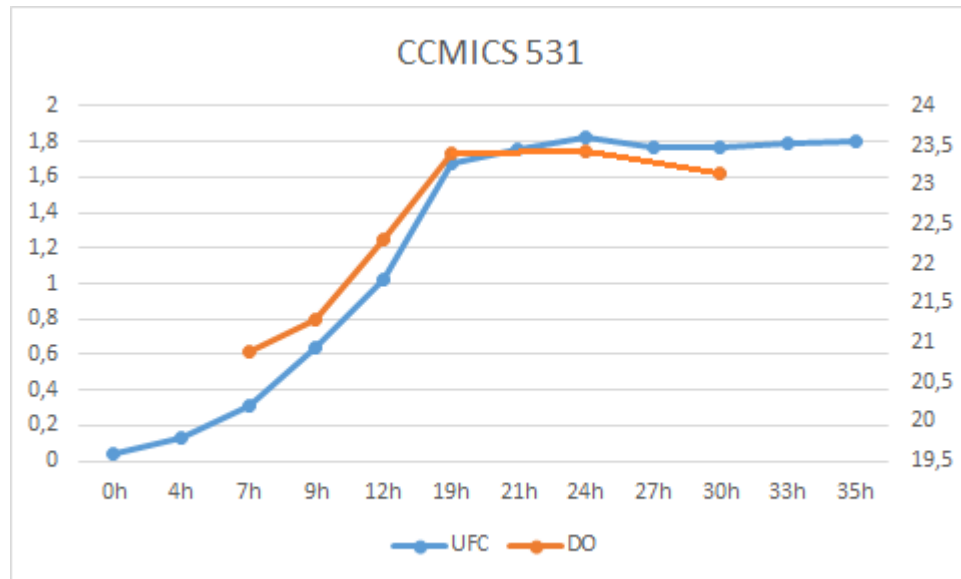


Figura 14: Curva de crescimento microbiano da bactéria pertencente ao gênero *Sphingomonas* sp.

A partir dos resultados das curvas de crescimento foi possível saber, em uma faixa de absorvância de 560 nm, qual o momento ótimo da fase log e a sua concentração celular, podendo assim, padronizar os inóculos das bactérias CCMICS 530, CCMICS 531, CCMICS MG 58 e CCMICS SB 22 para a produção de exopolissacarídeos, que resultará em produções com menor desvio padrão entre as triplicatas, e com isso, maior precisão.

5.5 PRODUÇÃO DOS EXOPOLISSACARÍDEOS

Os exopolissacarídeos sintetizados pelas bactérias pertencentes aos gêneros *Sphingobium* sp. (CCMICS 530), *Bacillus* sp. (CCMICS MG 58) e *Sphingomonas* sp. (CCMICS 531) utilizando a fonte de carbono sacarose no meio de cultivo resultaram em uma produção de 0,1 g/L; 0,2 g/L; e, 0,2 g/L. CCMICS SB 22 não produziu exopolissacarídeo (Figura 14).

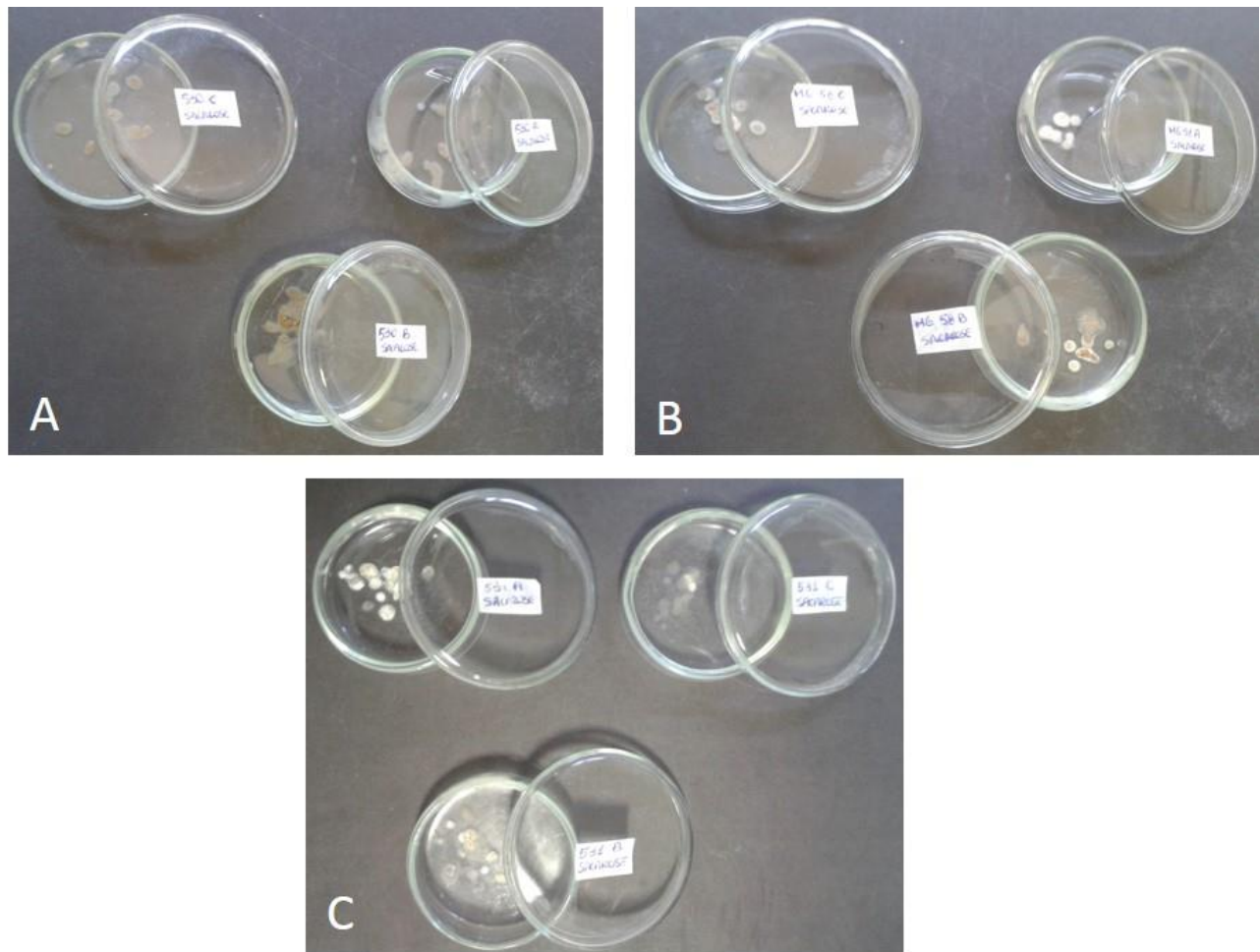


Figura 15: Polímeros sintetizados utilizando sacarose como fonte de carbono a partir das linhagens bacterianas dos gêneros - A: *Spingobium* sp., B: *Bacillus* sp., C: *Spingomonas* sp.

ASHTAPUTRE *et al.* (1995) trabalhando com *Spingomonas paucimobilis* obteve 6,5 g/L do biopolímero usando o mesmo meio de produção deste trabalho, mas com a fermentação em bioreator de 2 litros. BERWANGER *et al.* (2006) utilizou a bactéria *Spingomonas capsulata* que produziu 1,1 g/L de exopolissacarídeo, utilizando também as mesmas condições deste trabalho, diferindo somente na temperatura.

SEO *et al.* (2004) trabalhando com *Spingomonas* sp. CS101 obteve um produção de 17,2 g/l. NAMPOOTHIRI *et al.* (2003) utilizando a bactéria *Spingomonas paucimobilis* encontrou uma produção de 12,6 g/L. MATSUYAMA *et al.* (2003) observou

uma produção a partir da *Novosphingobium rosa* de 2,7 g/L do polímero presente no sobrenadante e 0,6 g/L do polímero precipitado. Logo, é possível perceber que a produção de polissacarídeos varia muito a depender do gênero ou espécie que está sendo utilizada. Mesmo em uma única linhagem podem haver variações consideráveis a depender dos parâmetros (temperatura, agitação, pH e aeração) e o meio de produção utilizados para a síntese de polissacarídeos. HUANG *et al.* (2012) ao utilizar concentrações diferentes de glicose, extrato de levedura, fosfato de potássio, nitrato de sódio, carbonato de cálcio, sulfato de ferro, cloreto de sódio e sulfato de magnésio para a produção de exopolissacarídeo percebeu uma diferença de 12,4 a 16,2 g/L.

As quantidades dos polímeros produzidos pelas linhagens trabalhadas foram baixas quando comparadas com as encontradas na literatura, porém uma otimização do processo de produção pode fazê-la aumentar. Segundo KUMAR *et al.* (2007), a quantidade e a qualidade do exopolissacarídeo microbiano são muito afetadas pelas condições nutricionais e ambientais e uma maior produção do polímero é possível por manipulação das condições da cultura. HUANG *et al.* (2012) ao otimizar a produção do polímero sintetizado por *Sphingomonas sanxanigenens* obteve 17,5 g/L, que foi 25% maior do que a obtida pelo meio original. Assim como XU *et al.* (2015), que obteve uma produção 42% maior ao otimizar a produção da goma ramsana. ZHU *et al.* (2013) ao otimizar a síntese da goma gelana conseguiu uma produção 35,7% maior do que a obtida com a melhor produção convencional em batelada.

BAJAJ *et al.* (2006) ao variar as fontes de nitrogênio inorgânicas (cloreto de amônio, sulfato de amônio, nitrato de sódio, nitrato de potássio e nitrato de amônio) utilizadas em um meio de produção basal observou que o sulfato de amônio foi responsável por uma maior produção da goma gelana, enquanto que o nitrato de potássio, que foi a fonte de nitrogênio utilizada no meio de produção deste trabalho, foi o que resultou em um dos menores rendimentos.

XU *et al.* (2015), ao variar as concentrações da fonte de fosfato (K_2HPO_4), observou que houve um aumento na produção da goma ramsana com um aumento na concentração de fosfato. A quantidade de fosfato utilizada neste trabalho foi baixa quando comparada aos valores usados por XU *et al.* (2015), com isso, pode-se concluir

que esse pode ser um dos motivos para uma menor produção dos polímeros.

Os polímeros sintetizados pelas bactérias dos gêneros *Sphingobium* sp. (CCMICS 530), *Bacillus* sp. (CCMICS MG 58), *Sphingomonas* sp. (CCMICS 531) e CCMICS SB 22 utilizando meio de produção contendo glicerina bruta resultaram em uma produção aproximada de 0,2 g/L.

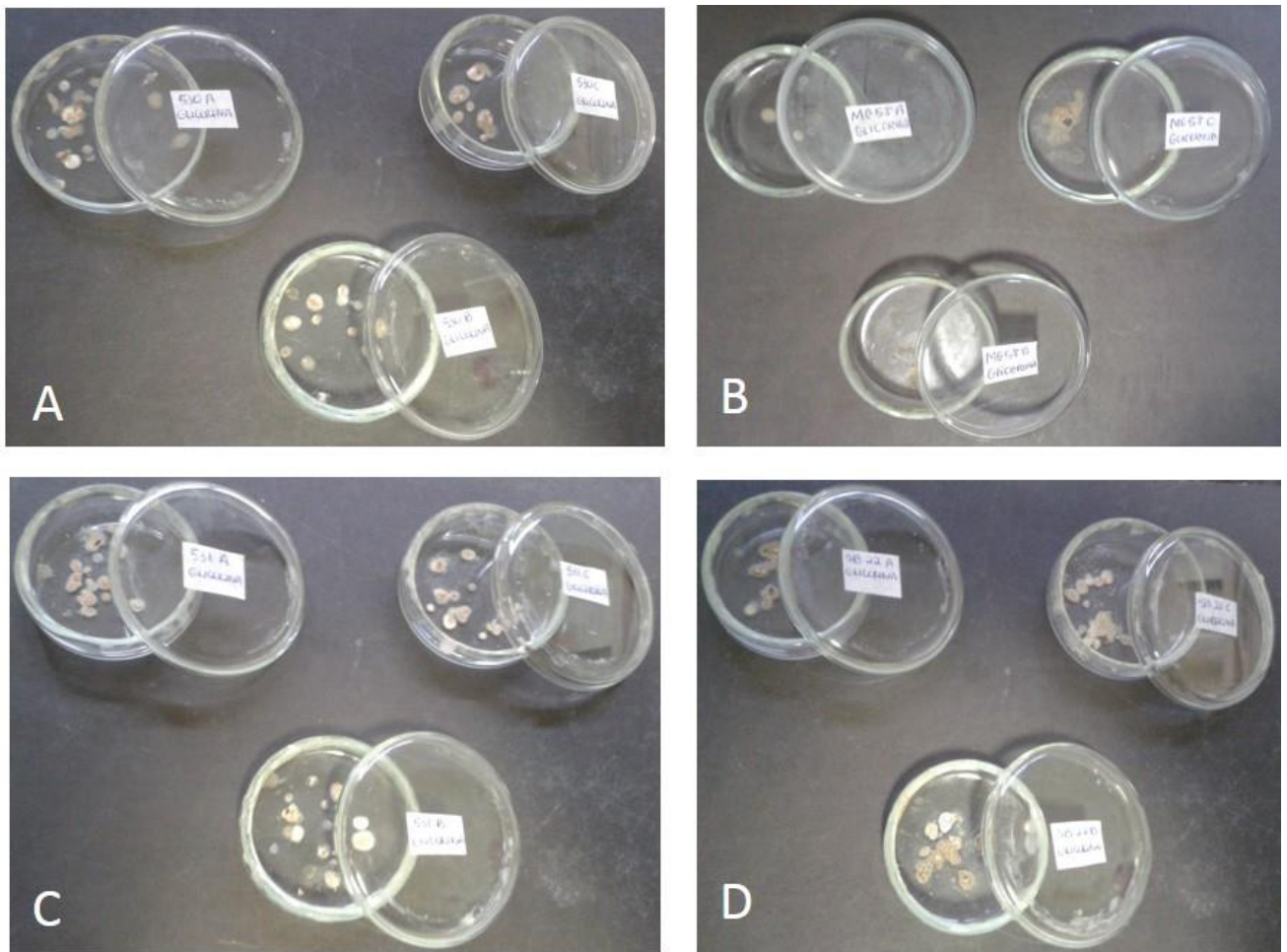


Figura 16: Polímeros sintetizados utilizando glicerina bruta como fonte de carbono a partir das bactérias pertencentes aos gêneros – A: *Sphingobium* sp., B: *Bacillus* sp., C: *Sphingomonas* sp., D: CCMICS SB 22.

Tabela 1. Produção de biopolímeros pelas linhagens MG58, 530 e 531, em meio de cultura com as fontes de carbono sacarose e glicerina bruta, em g.L⁻¹.

| Fonte de carbono | Produção de exopolissacarídeo (g.L ⁻¹) | | |
|------------------|--|------------------------|-------------------------|
| | <i>Bacillus</i> sp. | <i>Sphingobium</i> sp. | <i>Sphingomonas</i> sp. |
| Sacarose | 0,17Aba | 0,11Bb | 0,21Aa |
| Glicerina Bruta | 0,16Aa | 0,19Aa | 0,16Aa |

Letras maiúsculas representam as diferenças nas linhas (entre as linhagens bacterianas) e letras minúsculas representam a análise nas colunas (sacarose X glicerina bruta). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si.

Pode-se constatar na Tabela 1 que as linhagens bacterianas pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp. e *Sphingomonas* sp. não apresentaram diferença estatisticamente significativa na produção de exopolissacarídeo ao substituir a sacarose por glicerina bruta como fonte de carbono. Resultado similar foi observado por PAPANIKOLAU *et al.* (2002) que obteve a mesma quantidade de ácido cítrico sintetizada pela levedura *Yarrowia lipolytica* ao utilizar glicerina bruta ou sacarose.

De acordo com DASSY *et al.* (1991), o rendimento do polissacarídeo capsular sintetizado pela *Staphylococcus aureus* variou a depender do meio utilizado, mas não variou significativamente ao utilizar diferentes fontes de carbono (glicose, lactose, galactose, sacarose, maltose, manose, manitol, glicerol, citrato de sódio, piruvato de sódio e ácido glutâmico) em um mesmo meio basal.

A produção de exopolissacarídeo sintetizado pela bactéria do gênero *Sphingobium* sp., apresentou diferença significativa ao substituir a sacarose por glicerina bruta, sendo a produção maior (Tabela 1). Pode-se constatar também na Tabela 1 que não houve diferença significativa na produção de exopolissacarídeos sintetizados pelas bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp., *Sphingobium* sp. e *Sphingomonas* sp. ao utilizar glicerina bruta como fonte carbono no meio de cultivo, enquanto que ao utilizar sacarose, a bactéria pertencente ao gênero *Sphingomonas* sp. foi a que produziu uma maior quantidade de EPS, enquanto que a bactéria pertencente ao gênero *Sphingobium* sp. foi a que produziu uma menor quantidade. CCMICS SB 22 só produziu polímero com o meio de produção à base de glicerina bruta.

BRANDÃO *et al.* (2013) obteve uma produção 70% maior da goma xantana ao utilizar o resíduo de glicerina bruta como fonte de carbono ao invés da sacarose sob as mesmas condições.

BAJAJ *et al.* (2006) ao variar as fontes de carbono (glicose, sacarose, lactose, frutose, maltose e amido solúvel) utilizando o mesmo meio constatou que houve diferença na produção da goma gelana. NAMPOOTHIRI *et al.* (2003) também testou diferentes fontes de carbono e obteve diferenças significativas na produção da goma gelana. O mesmo foi observado por XU *et al.* (2015) que ao variar as fontes de carbono (glicose, sacarose, frutose, maltose, lactose, amido solúvel, e glicerol) obteve diferenças na produção da goma ramsana.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a sacarose pode ser substituída pela glicerina bruta como fonte de carbono. Desta forma ao utilizar sacarose no meio de produção o custo é de R\$ 1,00/L de meio, enquanto que com a glicerina bruta o custo é R\$ 0,0018/L de meio, portanto, o uso da glicerina bruta para produção dos polímeros sintetizados nesse trabalho reduz o custo, além de evitar danos ambientais pelo descarte deste produto no meio ambiente.

5.6 SOLUBILIDADE EM ÁGUA

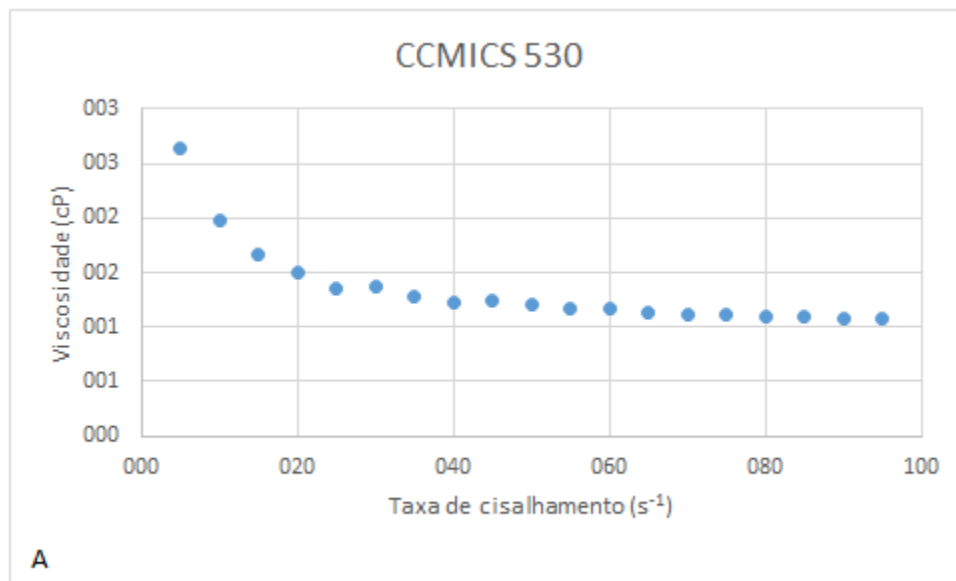
Os exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias pertencentes aos gêneros *Sphingomonas* sp. e *Bacillus* sp., assim como da CCMICS SB 22 possuem uma pequena fração solúvel em água, conseqüentemente, apenas a parte solúvel em água foi utilizada para a determinação da viscosidade aparente (Tabela 2).

O exopolissacarídeo produzido pela *Sphingobium* sp. é totalmente solúvel em água (Tabela 2) e, por isso, foi o único exopolissacarídeo que teve a massa molecular determinada.

Tabela 2 – Solubilidade em água dos exopolissacarídeos sintetizados pelas bactérias dos gêneros *Sphingobium* sp., *Shingomonas* sp. e *Bacillus* sp. e CCMICS SB 22

| Linhagens selecionadas | Solubilidade em água |
|--------------------------------------|----------------------|
| CCMICS SB 22 | Solúvel em parte |
| <i>Sphingobium</i> sp. (CCMICS 530) | Totalmente solúvel |
| <i>Sphingomonas</i> sp. (CCMICS 531) | Solúvel em parte |
| <i>Bacillus</i> sp. (CCMICS MG 58) | Solúvel em parte |

5.7 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE APARENTE DOS EXOPOLISSACARÍDEOS OU FRAÇÕES DOS EXOPOLISSACARÍDEOS SOLÚVEIS EM ÁGUA



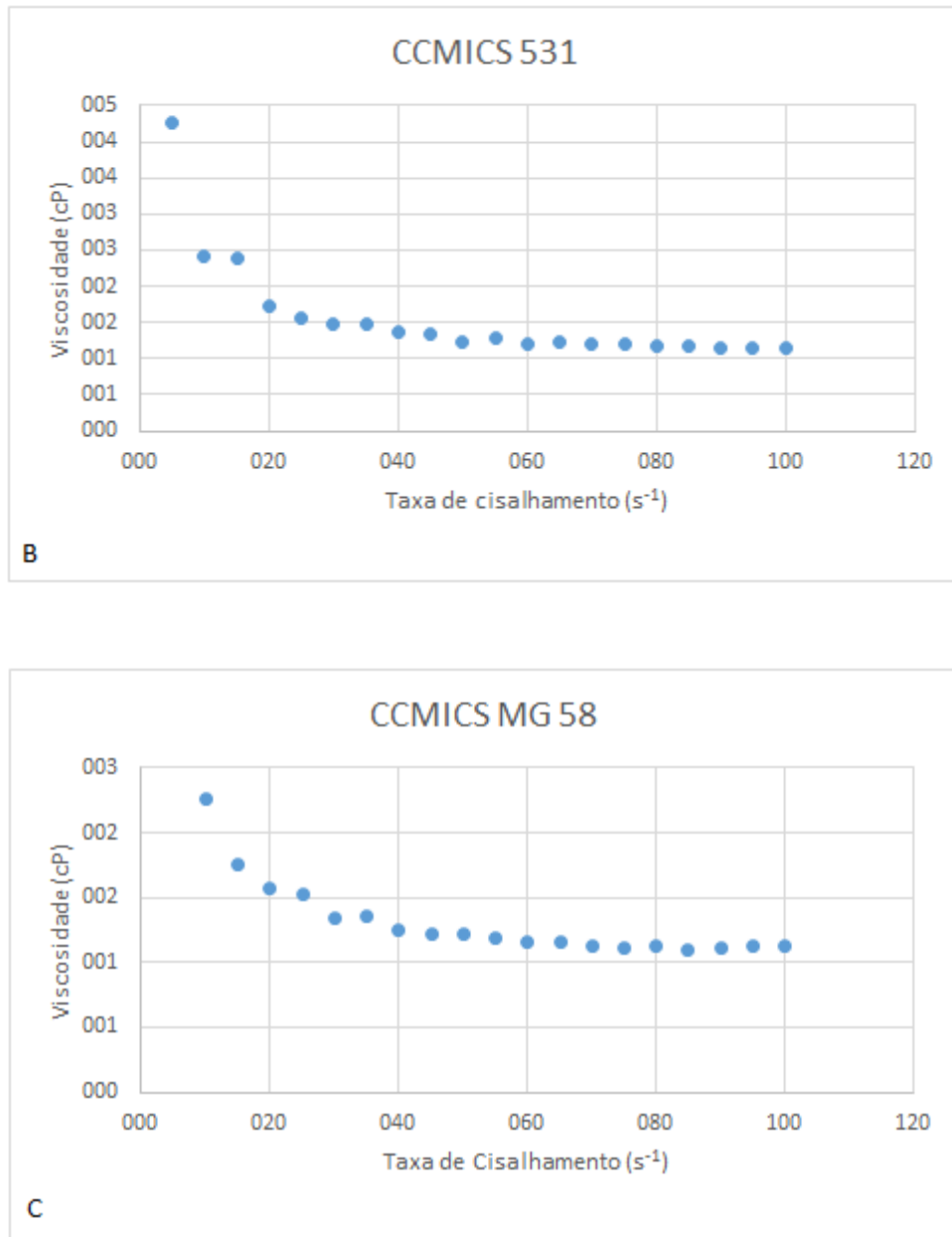
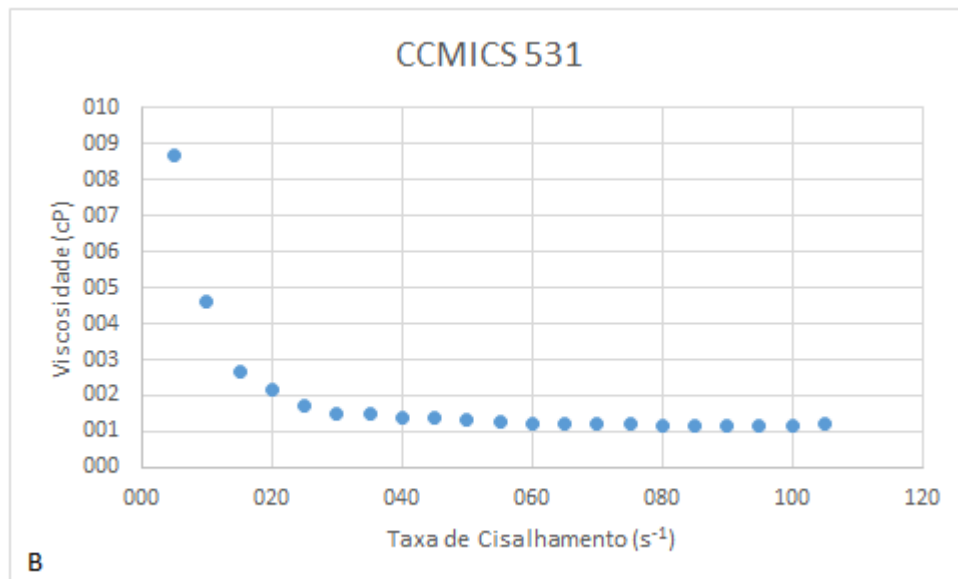
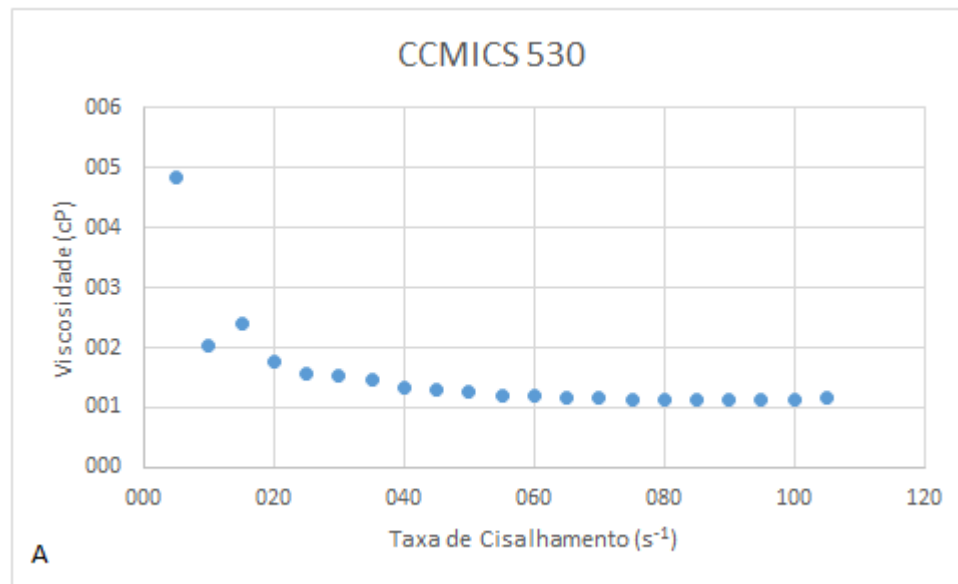


Figura 17: Viscosidade aparente utilizando sacarose como fonte de carbono das frações solúveis em água a 0,09% (m/v) dos polímeros sintetizados pelas bactérias pertencentes aos gêneros – A: *Sphingobium* sp., B: *Sphingomonas* sp., C: *Bacillus* sp.

Os exopolissacarídeos produzidos com sacarose pelas bactérias pertencentes aos gêneros *Sphingobium* sp., *Sphingomonas* sp. e *Bacillus* sp. apresentaram uma viscosidade aparente máxima de 1,13 centiPoise (cP), 1,23 cP, 1,17 cP, respectivamente, da fração aquosa solúvel a 0,09% (m/v) e temperatura de 25°C, a uma taxa de cisalhamento 65 s^{-1} (Figura 17).



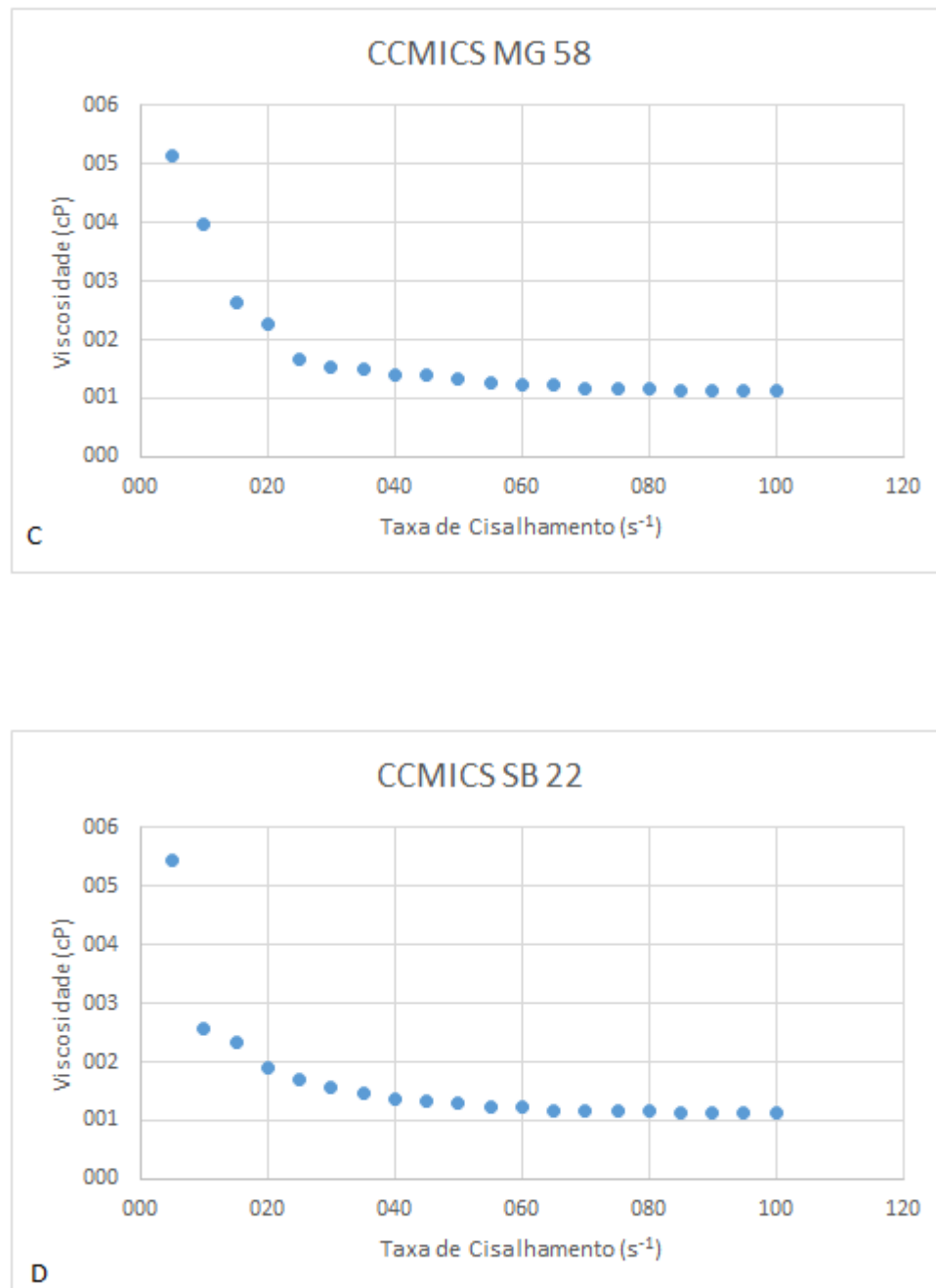


Figura 18: Viscosidade aparente utilizando glicerina bruta como fonte de carbono das frações solúveis em água a 0,09% (m/v) dos polímeros sintetizados pelas bactérias pertencentes aos gêneros – A: *Sphingobium* sp., B: *Sphingomonas* sp., C: *Bacillus* sp., D: CCMICS SB 22 .

Os exopolissacarídeos produzidos com glicerina bruta pelas bactérias

pertencentes aos gêneros *Sphingobium* sp., *Sphingomonas* sp., *Bacillus* sp. e CCMICS SB 22 apresentaram uma viscosidade aparente máxima de 1,17 cP, 1,22 cP, 1,23 cP e 1,22 Cp, respectivamente, da fração aquosa solúvel a 0,09% e temperatura de 25°C, a uma taxa de cisalhamento 65 s⁻¹ (Figura 18).

Todos os exopolissacarídeos produzidos independentemente da bactéria ou fonte de carbono apresentaram comportamento não-newtoniano, com característica pseudoplástica, na qual a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Não houve diferença na viscosidade ao substituir a sacarose por glicerina bruta, logo pode ser utilizada no meio de produção como única fonte de carbono disponível.

ASHTAPUTRE *et al.* (1995) obteve uma viscosidade de 4,2 centiPoise (Cp) a 30°C, para EPS produzido pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis* utilizando o mesmo meio de cultivo desse trabalho contendo sacarose. BERWANGER *et al.* (2006) obteve uma viscosidade aparente média de 176 Cp em solução aquosa a 3% e temperatura de 25°C, para EPS produzido por *Sphingomonas capsulata*, também utilizando o mesmo meio de cultivo deste trabalho com sacarose como fonte de carbono. HUANG *et al.* (2012) observou uma viscosidade de aproximadamente 6000 cP em solução aquosa a 0,4% e temperatura de 25°C, para EPS sintetizado por *Sphingomonas sanxanigenens*.

Uma viscosidade 30% maior foi obtida para a goma xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* ao utilizar glicerina bruta ao invés da sacarose como fonte de carbono no meio de produção (BRANDÃO *et al.*, 2013).

O aumento da viscosidade em solução aquosa do exopolissacarídeo depende da sua concentração e seu peso molecular ou sua viscosidade inerente (RINAUDO, 1993; HUANG *et al.*, 2012). Como a concentração dos polímeros em solução aquosa foi de 0,09% (m/v), muito menor do que a concentração utilizada por outros autores, já era esperado que as suas viscosidades seriam mais baixas (ASHTAPUTRE *et al.*, 1995; BERWANGER *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2012).

Alterações significativas na viscosidade aparente acontecem durante o curso da fermentação por causa da produção de exopolissacarídeos que resulta em um caldo

muito viscoso e não newtoniano que pode dificultar a transferência de calor e fornecimento de oxigênio, assim como gerar instabilidades na qualidade final do produto (OHNER, 2013). Logo, polímeros com uma viscosidade menor como os encontrados neste trabalho são mais fáceis de produzir em escala comercial, podendo ser utilizados como aditivos com outras finalidades que não seja aumentar a viscosidade do produto. Além disso, podem ser misturados com outras gomas a fim de aumentar a viscosidade.

5.8 MASSA MOLECULAR DO POLÍMERO PRODUZIDO PELA CCMICS 530

As propriedades físicas e químicas dos polissacarídeos são fortemente determinadas pelas condições de cultivo, logo uma caracterização precisa dos exopolissacarídeos é muito importante (OHNER, 2013).

A curva de calibração de \log MM (massa molecular) x RT (tempo de retenção) foi linear: \log MM = $-0,295 \times$ RT + 30,83 com um coeficiente de correlação $R^2 = 0,99$.

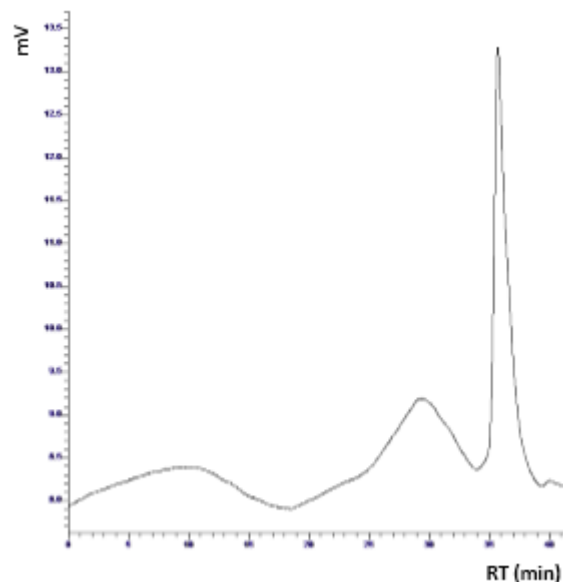


Figura 19: Cromatograma CLAE-GPC-IR do exopolissacarídeo totalmente solúvel em água sintetizado pela bactéria pertencente ao gênero *Sphingobium* sp. utilizando sacarose como fonte de carbono com tempo de retenção de 37,97 minutos e o caldo coletado após 120 horas de fermentação em agitador

orbital.

A massa molecular do exopolissacarídeo produzido pela *Sphingobium* sp. foi de $1,13 \times 10^3$ Daltons (Da) (Figura 18). SEO *et al.* (2004) analisou o exopolissacarídeo sintetizado pela *Sphingomonas* sp. CS101 e obteve a massa molecular de $4,2 \times 10^5$ Da. A goma gelana tem uma massa molecular média de $4,5$ a 6×10^5 Da (YAPANI, 2013). Dois exopolissacarídeos foram produzidos por *Novosphingobium* rosa, sendo que um tem massa molecular de 2×10^5 Da enquanto o outro possui massa molecular entre 1×10^5 Da e $1,5 \times 10^6$ Da (MATSUYAMA *et al.*, 2003). A massa molecular do exopolissacarídeo produzido por *Sphingomonas pituitosa* é de aproximadamente $4,2 \times 10^5$ Da (DENNER *et al.*, 2001). De acordo com SUTHERLAND (1994), as cadeias poliméricas geralmente tem elevada massa molecular. Além disso, segundo SCHMID *et al.* (2012), os exopolissacarídeos que fazem parte do grupo “sphingans” possuem uma massa molecular na faixa de 7×10^4 a 5×10^6 Da.

O valor da massa molecular do exopolissacarídeo produzido pela bactéria pertencente ao gênero *Sphingobium* sp. utilizando sacarose como fonte de carbono obtido nesse trabalho é pequeno quando comparado com outros polissacarídeos sintetizados pelo gênero *Sphingomonas* e *Novosphingobium*, provavelmente porque o tempo de produção não foi suficiente para as bactérias consumirem toda a sacarose presente no meio e converter em mais exopolissacarídeo. Além disso, segundo KUMAR *et al.*, 2007, o tamanho do exopolissacarídeo pode variar com a fonte de carbono utilizada, assim como com a bactéria e condições de cultivo empregada.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6.1 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- Isolados bacterianos pertencentes às famílias Sphingomonadaceae e Bacillaceae apresentaram crescimento em meio ágar nutriente contendo o antibiótico estreptomicina nas concentrações 100 e 200 µg/ml;
- Os polímeros sintetizados pelas bactérias dos gêneros *Sphingobium* sp. e *Sphingomonas* sp. nativas de ambiente marinho ainda não tinham sido citados na literatura;
- É possível produzir exopolissacarídeos a partir de *Bacillus* sp., *Sphingobium* sp. e *Sphingomonas* sp. utilizando sacarose ou glicerina bruta como fonte de carbono;
- A produção de exopolissacarídeos a partir de *Sphingobium* sp. e CCMICS SB 22 foi significativamente maior ao utilizar glicerina bruta como fonte de carbono;
- Todos os polímeros estudados apresentaram comportamento pseudoplástico, sendo que a viscosidade foi praticamente a mesma para os polímeros sintetizados por *Bacillus* sp., *Sphingobium* sp. e *Sphingomonas* sp. ao substituir a sacarose por glicerina bruta;
- A viscosidade aparente dos exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias foi menor do que os valores de exopolissacarídeos do mesmo gênero de bactérias relatados na literatura, logo não tem muita aplicabilidade como espessantes, mas podem ser utilizados para outros fins industriais, assim como podem ser misturados a outras gomas a fim de aumentar a sua viscosidade;
- A massa molecular do exopolissacarídeo produzido por *Sphingobium* sp. foi menor do que os valores de EPS relatados na literatura para este gênero de bactéria, provavelmente porque a bactéria não consumiu toda a sacarose presente no meio como substrato para a conversão em mais exopolissacarídeo;
- As produções e viscosidades podem ser potencializadas se a composição do meio de

cultivo e condições de processo forem otimizadas.

6.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar a nível de espécie as bactérias dos gêneros *Sphingomonas* sp., *Sphingobium* sp. utilizando primers específicos para esses gêneros, além do uso de outras ferramentas como hibridização DNA-DNA;
- Identificar por meio do sequenciamento do gene rRNA 16S da bactéria CCMICS SB 22;
- Otimizar as condições do processo de produção dos polímeros produzidos pelas bactérias utilizadas nesse trabalho, através de variações de parâmetros como temperatura e agitação e também por utilização de outros meios a base de glicerina bruta como fonte de carbono;
- Caracterizar a estrutura dos exopolissacarídeos por meio de técnicas cromatográficas;
- Prospecção de patente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKCELRUD, L., Reologia In: **Fundamentos da ciência dos polímeros**, 1^o ed., Barueri, SP: Manole Ltda, 2007.
- ALBARELLI, J. Q., SANTOS, D. T., HOLANDA, M. R. Energetic and economic evaluation of waste glycerol cogeneration in Brazil. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 28, 691-698, 2011.
- ALVES, V. D., FREITAS, F., COSTA, N., CARVALHEIRA, M., OLIVEIRA, R., GONÇALVES, M. P., REIS, M. A. M. Effect of temperature on the dynamic and steady-shear rheology of a new microbial extracellular polysaccharide produced from glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, 79, 981-988, 2010.
- Anuário da Indústria Química Brasileira, ABIQUIM, São Paulo, 2005.
- ASHTAPUTRE, A. A., SHAH, A. K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(3), 1159-1162, 1995.
- ASSIS, D.J., BRANDÃO, L. V., COSTA, L. A. S., FIGUEIREDO, T. V. B., SOUSA, L. S., PADILHA, F. F., DRUZIAN, J. I. A Study of the Effects of Aeration and Agitation on the Properties and Production of Xanthan Gum from Crude Glycerin Derived from Biodiesel Using the Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 172, 2769-2785, 2014.
- BAJAJ I. B., SAUDAGAR P. S., SINGHAL R. K., PANDEY A. Statistical approach to optimization of fermentative Production of Gellan Gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 102(3), 150-156, 2006.
- BAUTISTA J. R., AMORADO F. B., ORBITA M. L. S., TEVES F. G. Antibiotic susceptibility testing of isolated *Bacillus thuringiensis* from three soil types around Iligan City, Philippines. **Global Journal of Science Frontier Research Biological Sciences**, 12(8), 21-25, 2012.
- BEMILLER J. N., HUBER K. C., Carboidratos. In: DAMODARAN S., PARKIN K. L., FENNEMA O. R. **Química de alimentos**. Editora Artmed, 4^o ed., 2010.
- BERWANGER A. L. S., DOMINGUES N. M., VANZO L. T., LUCCIO M., TREICHEL H., PADILHA F. F., SCAMPARINI A. R. P. Production and rheological characterization of biopolymer of *Sphingomonas capsulata* ATCC 14666 using conventional and industrial media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 129-132, 2006.
- BILANOVIC, D, SHELEF, G, GREEN, M. Xanthan fermentation of citrus wastes. **Bioresource Technology**, 48, 169-172, 1994.
- BILANOVIC, D., CHANG, F., ISOBAEV, P., WELLW, P. Lactic acid and xanthan fermentations on an alternative potato residues media e Carbon source costs. **Biomass**

e **Bioenergy**, 35, 2683-2689, 2011.

BRANDÃO, L. V., NERY, T. B. R., MACHADO, B. A. S., ESPIRIDIÃO, M. C. A., DRUZIAN, J. I. Production of xanthan gum obtained from sugarcane. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28, 217-222, 2008.

BRANDÃO, L. V., ESPIRIDIÃO, M. C. A., DRUZIAN, J. I. Use of the cassava serum as fermentative substrate in xanthan gum biosynthesis: apparent viscosity and production. **Polímeros**, 20, 175-180, 2010.

BRANDÃO, L. V., ASSIS, D. J., LÓPEZ, J. A., ESPIRIDIÃO, M. C. A., ECHEVARRIA, E. M., DRUZIAN, J. I. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 30(4), 737-746, 2013.

CAMPANA, S., ANDRADE, C., MILAS, M., RINAUDO, M. Polyelectrolyte and rheological studies on the polysaccharide welan. **International Journal of Biological Macromolecules**, 12, 379-384, 1990.

CHOWDHURY, T. F., LINDBERG, B., LINDQUIST, U. Structural studies of an extracellular polysaccharide (S-198) elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31853. **Carbohydrate Research**, 161, 127-132, 1987.

CHOWDHURY, T. F., LINDBERG, B., LINDQUIST, U. Structural studies of an extracellular polysaccharide, S-657, elaborated by *Xanthomonas* ATCC 53159. **Carbohydrate Research**, 164, 117-122, 1987.

COLEMAN, R. J., PATEL, Y. N., HARDING, N. E. Identification and organization of genes for diutan polysaccharide synthesis from *Sphingomonas* sp. ATCC 53159. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35, 263-274, 2008.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**, Campinas: UNICAMP, 2006

DASARI, M. A., KIATSIMKUL, P., SUTTERLIN, W. R., SUPPES, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General** 281, 225-231, 2008.

DASSY, B., STRINGFELLOW, W. T., LIEB, M., FOURNIER, J. M. Production of type 5 capsular polysaccharide by *Staphylococcus aureus* grown in a semi-synthetic medium. **Journal of General Microbiology**, 137, 1155-1162, 1991.

DENNER, E. B. M., PAUKNER, S., KAMPFER, P., MOORE, E. R. B., ABRAHAM, W., BUSSE, H., WANNER, G., LUBITZ, W. *Sphingomonas pituitosa* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium that secretes an unusual type of sphingan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51: 827-841, 2001.

DONOT, F., FONTANA, A., BACCOU, J. C., SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction.

Carbohydrates Polymers, 87, 951-962, 2012.

DRUZIAN, J. I., PAGLIARINI, A. P. Xanthan gum production by fermentation from residue of apple juice. **Science and Food Technology**, Campinas, 27, 26-31, 2007.

ELBOUTACHFAITI, R., EMMANUEL, P., MICHELLE, P., BERNARD, C., JOSIANE, C., CÉDRIC, D. Evaluation of antioxidant capacity of ulvan-like polymer obtained by regioselective oxidation of gellan exopolysaccharide. **Food Chemistry**, 127, 976-983, 2011.

FALK, C., JANSSON, P., RINAUDO, M., HEYRAUD, A., WIDMALM, G., HEBBAR, P. Structural studies of the exocellular polysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* strain I-886. **Carbohydrate Research**, 285, 69-79, 1996.

FENG, X., OU, L., OGRAM, A. Plasmid-mediated mineralization of carbofuran by *Sphingomonas* sp. Strain CF06. **Applied and Environmental Microbiology**, 63 (4), 1332-1337, 1997.

FENG, G., YANG, S., WANG, Y., ZHAO, G., DENG, M., ZHU, H. *Sphingomonas gimensis* sp. nov., a novel Gram-negative bacterium isolated from abandoned lead-zinc ore mine. **Antonie van Leeuwenhoek**, 105, 1091-1097, 2014.

FIALHO, A. M., MARTINS, L. O., DONVAL, M., LEITÃO, J. H., RIDOUT, M. J., JAY, A. J., MORRIS, V. J., SÁ-CORREIA, I. Structures and Properties of Gellan Polymers Produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from Lactose Compared with Those Produced from Glucose and from Cheese Whey. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(5), 2485-2491, 1999.

FREDRICKSON, J. K., BALKWILL, D. L., DRAKE, G. R., ROMINE, M. F., RINGELBERG, D. B., WHITE, D. C. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. **Applied and Environmental Microbiology**, 65(6), 1917-1922, 1995.

GILEWICZ, M., NI'MATUZAHROH, NADALIG, T., BUDZINSKI, H., DOUMENQ, P., MICHOTÉY, V., BERTRAND, J. C. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. **Applied Microbiology Biotechnology**, 48, 528-533, 1997.

GUO, C. L., ZHOU, H. W., WONG, Y. S., TAM, N. F. Y. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. **Marine Pollution Bulletin**, 51, 1054-1061, 2005.

HARDING, N. E., PATEL, Y. N., COLEMAN, R. J. Organization of genes required for gellan polysaccharide biosynthesis in *Sphingomonas elodea* ATCC 31461. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 31, 70-82, 2004.

HONGLI, A., XU, M., DAI, J., WANG, YANG., CAI, F., QI, H., PENG, F., FANG, C. *Sphingomonas xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert sand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 61, 1865-1869, 2011.

- HUANG, H., WANG, W., MA, T., LI, G., LIANG, F., LIU, R. *Sphingomonas sanxanigenens* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, 59, 719-723, 2009.
- HUANG, H. D., WANG, W., MA, T., LI, Z. Y., LIANG, F. L., LIU, R. L. Analysis of molecular composition and properties of a novel biopolymer. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 30, 324–327, 2009.
- HUANG, H., MA, T., LI G., WANG, W., LIANG, F., LIU, R. Medium optimization and properties of biopolymer Ss from *Sphingomonas sanxanigenens*. **African Journal of Microbiology Research**, 6(7), 1423-1429, 2012.
- IMAI, R., NAGATA, Y., FUKUDA, M., TAKAGI, M., YANO, K. Molecular cloning of a *Pseudomonas paucimobilis* gene encoding a 17-kilodalton polypeptide that eliminates HCl molecules from γ -hexachlorocyclohexane. **Journal of Bacteriology**, 173(21), 6811-6819, 1991.
- IMAMURA, N., MOTOIKE, M., NODA, K., ADACHI, A., KONNO, A., FUKAMI, H. Argimicin A, a novel anti-cyanobacterial compound produced by an algae-lysing bacterium. **The Journal of Antibiotics**, 53, 1317-1319, 2000.
- JANSSON, P., LINDBERG, B., SANDFORD, P. A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, 124, 135-139, 1983.
- JANSSON, P., LINDBERG, B., WIDMALM, G., SANDFORD, P. A. Structural studies of an extracellular polysaccharide (S-130) elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31555. **Carbohydrate Research**, 139, 217-223, 1985.
- JANSSON, P., KUMAR, N. S., LINDBERG, B. Structural studies of a polysaccharide (S-88) elaborated by *Pseudomonas* ATCC 31554. **Carbohydrate Research**, 156, 165-172, 1986.
- JIN, H., LEE, N., SHIN, M., KIM, S., KAPLAN, D. L., LEE, J. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK 2000 with soybean pomace. **Biochemical Engineering Journal**, 16, 357-360, 2003.
- KANG, K. S., PETTIT, D. J. Xanthan, gellan, welan, and rhamsan, In: Whistler R. L., BEMILLER J. N., **Industrial gums: polysaccharides and their derivatives**, 3. Ed, Academic Press, New York, 1993: 341-398.
- KARLSON, U., ROJO, F., ELSAS, J. D. V., MOORE, E. Genetic and serological evidence for the recognition of four pentachlorophenol-degrading bacterial strains as a species of the genus *Sphingomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, 18(4), 539-548, 1995.
- KAWAHARA, K., SEYDEL, U., MATSUURA, M., DANBARA, H., RIETSCHER, E. T., ZHRINGER, U. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. **Elsevier Science Publisher**, 292(12), 107-110, 1991.

KUMAR, A. S., MODY, K., JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, 47, 103-117, 2007.

KUO, M., MORT, A. J., DELL, A. Identification and location of L-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum, **Carbohydrate Research**, 156, 173-187, 1986.

LEE, J., SHIN, Y K., YOON, J., TAKEUSHI, M., PYUN, Y., PARK, Y. *Sphingomonas aquatilis* sp. nov., *Sphingomonas koreensis* sp. nov. and *Sphingomonas taejonensis* sp. nov. yellow-pigmented bacteria isolated from natural mineral water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 1491-1498, 2001.

LEUNG, K. T., CHANG, Y. J., GAN, Y. D., PEACOCK, A., MACNAUGHTON, S. J., STEPHEN, J. R., BURKHALTER, R. S., FLEMMING, C. A., WHITE, D. C. Detection of *Sphingomonas* spp in soil by PCR and sphingolipid biomarker analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 23, 252-260, 1999.

LEY R. E., HARRIS J. K., WILCOX J., SPEAR J. R., MILLER S. R., BEBOUT B. M., MARESCA J. A., BRYANT D. A., SOGIN M. L., PACE N. R. Unexpected diversity and complexity, of the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. **Applied and Environmental Microbiology**, 72(5), 3685-3695, 2006.

LUNA V. A., KING D. S., GULLEDGE J., CANNONS A. C., AMUSO P. T., CATTANI J. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensitrew automated microbroth dilution and Etestw agar gradient diffusion methods. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 60, 555-567, 2007.

MACHADO J. C. V. **Reologia e escoamento de fluidos**, Rio de Janeiro: editora Interciência, 2002.

MATSUYAMA, H., KAMESAKI, T., SASAKI, R., MINAMI, H., YUMOTO, I. Production of two types of exopolysaccharide by *Novosphingobium rosa*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 95(2),152-156, 2003.

MAUGERI, F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA U. A., AQUARONE E., BORZANI W., SCHMIDELL W., **Biociencia industrial**, vol 3, Processos fermentativos e enzimáticos. Editora Edgard Blucher, 2001.

MISAKI, A. Structural aspects of some functional polysaccharides. In: NISHINARI K., DOI E. **Food hydrocolloids: structures, properties and functions**. Editora Springer Science & Business Media, 1993.

MME, Ministério de Minas e Energia, 2014.

MORRIS, G., HARDING, S. Polysaccharides, Microbial. **Applied Microbiology: Industrial**, 482-494, 2009.

NAMPOOTHIRI K. M., SINGHANIA R. R., SABARINATH C., PANDEY A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, 38, 1513-1519, 2003.

NEEF, A., WITZENBERGER, R., KAMPFER, P. Detection of sphingomonads and in situ identification in activated sludge using 16S RNA-targeted oligonucleotide probes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 23, 261-267, 1999.

NOHYNEK, L. J., NURMIAHO-LASSILA, E., SUHONENE, L., BUSSE, H., MOHAMADDI, M., HANTULA, J., RAINEY, F., SALKINOJA-SALONEN, M. S. Description of chlorophenol –degrading *Pseudomonas* sp. Strains KF1^T, KF3 and NFK1 as a new species of the genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subartica* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1042-1055, 1996.

OHNER, E. T. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. In: FANG Z., Pretreatment Techniques for Biofuels and Biorefineries, **35 Green Energy and Technology**, 2013.

PAPANIKOLAOU, S., MUNIGLIA, L., CHEVALOT, I., AGGELIS, G., MARC, I. Yarrowia lipolytica as a potential producer of citric acid from raw glycerol. **Journal Applied Microbiology**, 92(4), 737-744, 2002.

PARK, S., YOKOTA, A., ITOH, T., PARK, J. *Sphingomonas jejuensis* sp. nov., isolated from marine sponge *Hymeniacidon flavia*. **The Journal of Microbiology**, 49(2), 238-242, 2011.

PEIK, J. A., STEENBERGEN, S. M., VEEDER, G. T. **Heteropolysaccharide S-657**, US Patent Number 5, 175, 278, 1992.

POLLOCK, T. J. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. **Journal of General Microbiology**, 139, 1939-1945, 1993.

PRAJAPATI, V.D., JANI, G. K., ZALA, B. S., KHUTLIWALA, T. A. An insight into the emerging exopolysaccharide gellan gum as a novel polymer. **Carbohydrate Polymers**, 93, 760-678, 2013.

PRASERTSAN, P., WICHENCHOT, S., DOELLE, H., KENNEDY, J. F. Optimization for biopolymer production by *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, 71, 468–475, 2008.

PSZCZOLA, D. E. Gellan gum wins IFT's Food technology and industrial achievement awards. **Food Technology**, 47, 94–96, 1993.

RAO, M. A. **Rheological properties of fluid foods** In: RAO, M. A., RIZVI, S. S. H., DATTA, A. K., AHMED J., 4 ed., CRC Press, 2014.

RINAUDO, M. On the relation structure-properties of some polysaccharides used in the food industry. In: NISHINARI K., DOI E. **Food hydrocolloids: structures, properties and functions**. Editora Springer Science & Business Media, 1993.

ROMANENKO, L. A., UCHINO, M., FROLOVA, G. M., TANAKA, N., KALINOVSKAYAN, I., LATYSHEV, N., MIKHAILOV, V. V. *Sphingomonas molluscorum* sp. nov., a novel marine isolate with antimicrobial activity. **International Journal of Systematic and**

Evolutionary Microbiology, 57: 358-363, 2007.

RUDIM, A., CHOI P. **Ciência e engenharia de polímeros**, 3° ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

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

SCHMID, J., SPERL, N., SIEBER, V. A comparison of genes involved in sphingan biosynthesis brought up to date. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98, 7719-7733. 2014.

SCHULTHEIS, E., DREGER, M. A., NIMTZ, M., WRAY, V., HEMPEL, D. C., NORTEMANN, B. Structural characterization of the exopolysaccharide PS-EDIV from *Sphingomonas pituitosa* strain DSM 13101. **Applied Microbial and Cell Physiology**, 78, 1017-1024, 2008.

SCHULTEIS, E. DREGER, M. A., MUNOS-VILLEGAS, J. M., ESCALANTE, J. I., FRANCO-LARA, E., NORTEMANN, B. Rheological characterization of culture broth containing the exopolysaccharide PS-EDIV from *Sphingomonas pituitosa*. **Biochemical Engineering Journal**, 47, 116-121, 2009.

SEO E., YOO S., OH K., CHA J., LEE H. J., PARK C. Isolation of an Exopolysaccharide-producing Bacterium, *Sphingomonas* sp. CS101, Which Forms an Unusual Type of Sphingan. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68(5), 1146-1148, 2004.

SHAPOVALOV, A., PENA, A., LUNGWITZ, B., SCHUURMAN, R. **Using recyclable-viscosity fluids containing at least a sphingan heteropolysaccharide (gellan gum, welan gum, diutan gum and rhamosan gum) and an optional salt, performing wellbore cleanout operation; reduce pumping frictional pressure**, US Patent Number 7776796 B2, 2010.

STEFFE, J. F. **Rheological Methods in Food Process Engineering**. 2° ed., Freeman Press, p. 418, 1996.

STEPHEN, A. M., CHURMS, S. C. Introduction. In: STEPHEN A. M., PHILIPS G. O., WILIANS P. A. **Food polysaccharides and Their Applications**, Taylor & Francis, 2 ed., 2006.

SUTHERLAND, I. W. Introduction and definition. **Biotechnology of microbial exopolysaccharides**, Cambridge University Press, 1990.

SUTHERLAND I. W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, 12, 393-448, 1994.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polymers from agricultural products: production and potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 249-261, 1996.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides.

Trends in Biotechnology, 16, 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal** 11, 663-674, 2001.

SWORN, G., FRANCE, D. Gellan gum. In: Phillips G. O., Williams P. A., **Handbook of hydrocolloids**, 2° ed., 2009.

TAHARA, Y., KAWAZU, M. Isolation of glucuronic acid-containing glycosphingolipid from *Zymomonas mobilis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 58, 586-587, 1994.

TAKEUSHI, M., SAWADA, H., OYAZU, H., YOKOTA, A. Phylogenetic evidence for *Sphingomonas* and *Rhizomonas* as nonphotosynthetic members of the alpha-4 subclass of the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, 308-314, 1994.

TAKEUSHI, M., SAKANE, T., YANAGI, M., YAMASOTO, K., HAMANA, K., TOKOTA, A. Taxonomic study of bacteria isolated from plants: proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., *Sphingomonas asaccharolytica* sp. nov. and *Sphingomonas mali* sp. nov., **International Journal of Systematic Bacteriology**, 334-341, 1995.

TAKEUSHI, M., HAMANA, K., HIRAISHI, A. Proposal of the genus *Sphingomonas* sensu stricto and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 51, 1405-1417, 2001.

TONELI J. T. C. L., MURR F. E. X., PARK K. J. Estudo na reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 7(2), 181-204, 2005.

VANBROEKHOVEN, K., RYNGAERT, A., BASTIAENS, L., WATTIAU, P., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., DE MOT, R., SPRINGAEL, D. Streptomycin as a selective agent to facilitate recovery and isolation of introduced and indigenous *Sphingomonas* from environmental samples. **Environmental Microbiology**, 6(11), 1123-1136, 2004.

WHITE, D. C., SUTTON, S. D., RINGELBERG, D. B. The genus *Sphingomonas*: physiology and ecology. **Current Opinion in Biotechnology**, 7, 301-306, 1996.

WILLIAMS P. A., PHILLIPS G. O. Interactions in mixed polysaccharide systems. In: STEPHEN A. M., **Food polysaccharides and their applications**, New York: Marcel Dekker, 1995.

WITTICH, R., WILKES, H., SINNELL, V., FRANCKE, W., FORTNAGEL, P. Metabolism of dibenzo-p-dioxin by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. **Applied and Environmental Microbiology**, 58(3), 1005-1010, 1992.

XIAO-HONG, P., XIN-HUA, Z., SHI-MEI, W., YU-SUO, L., LI-XIANG, Z. Effects of a biosurfactant and a synthetic surfactant on phenanthrene degradation by a *Sphingomonas* strain. **Pedosphere**, 20(6), 771-779, 2010.

XU X., DONG S., LI S., CHEN X., WU D., XU H. Statistical experimental design optimization of rhamosan gum production by *Sphingomonas* sp. CGMCC 6833. **Journal of Microbiology**, 53(4), p. 272-278, 2015.

YABUUCHI E., YANO I., OYAIZO H., HASHIMOTO Y., EZAKI T., YAMAMOTO H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulate* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. **Microbiology and Immunology**, 34(2), 99-119, 1990.

YALPANI, M. Polysaccharides: Syntheses, Modifications and Structure / Property Relations. **Elsevier**, 2013.

YIM, M., YAU, Y. C. W., MATLOW, A., SO, J., ZOU, J., FLEMMING, C., SCHRAFT, H., LEUNG, K. T. A novel selective growth medium-PCR assay to isolate and detect *Sphingomonas* in environmental samples. **Journal of Microbiology Methods**, 82: 19-27, 2012.

ZHU G., SHENG L., TONG Q. A new strategy to enhance gellan production by two-stage culture in *Sphingomonas paucimobilis*. **Carbohydrate Polymers**, 98, 829-834, 2013.