

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIELA FEIX PEREIRA

BIOPROCESSOS DA PRODUÇÃO DE GOMA GELANA POR *Sphingomonas*
paucimobilis CCT 1899 USANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO
SUBSTRATO DE CULTIVO

Porto Alegre

2014

GABRIELA FEIX PEREIRA

BIOPROCESSOS DA PRODUÇÃO DE GOMA GELANA POR *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 USANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO DE CULTIVO

Trabalho de conclusão de curso
submetido à Universidade
Federal do Rio Grande do Sul
como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do
Grau de Bacharel em
Biotecnologia

Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub
Orientador

MSc. Sabrina Gabardo
Co-orientadora

Porto Alegre

2014

GABRIELA FEIX PEREIRA

BIOPROCESSOS DA PRODUÇÃO DE GOMA GELANA POR *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 USANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO DE CULTIVO

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia

Aprovado em 02/07/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Plinho Fransisco Hertz
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr.^a. Nicole Teixeira Sehnem
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, meu pai Ubirajara e minha mãe Lisane pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão Victor, pela amizade e compreensão em todos os momentos.

Aos meus tios Fábio e Inajara, que estavam comigo sempre que eu necessitava, dando o auxílio necessário para que este momento ocorresse.

Ao meu namorado Fernando, pelo amor, incentivo, admiração e força, mesmo quando a exaustão se mostrava forte.

A minha co-orientadora Sabrina, essencialmente pela amizade nascida e cultivada durante o período de convivência. Pelas palavras duras quando se faziam necessárias, e também pelas palavras de apoio.

Ao meu orientador Marco Antônio, por abrir as portas para que este trabalho fosse realizado, pelo auxílio e motivação.

As colegas de laboratório, que prestaram todo auxílio para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

Aos meus amigos Bianca, Julio, Patrícia e Taís, pelo companheirismo demonstrado durante a graduação, enfrentando cada dificuldade sem jamais perder as esperanças.

A toda turma 2014/2 do Bacharelado em Biotecnologia, pelo auxílio e parceria.

E a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Biopolímeros microbianos se destacam devido às suas propriedades e características funcionais, como a capacidade de espessamento, suspensão de partículas e retenção de água. Entre esses biopolímeros encontra-se a goma gelana, um hidrocoloide versátil, que é altamente estável em relação ao pH, e termoestável e termorreversível, o que possibilita sua utilização em diversas áreas, tais como na indústria alimentícia, farmacêutica e química. A produção de goma gelana a partir de resíduos industriais como o soro de queijo, o permeado de soro de queijo e o soro ácido de soja pode significar um menor custo associado à sua produção, ao mesmo tempo em que diminui o impacto ambiental causado pelo descarte incorreto destes compostos no meio ambiente. Esses substratos se caracterizam por serem fontes ricas em nutrientes, contendo quantidades apreciáveis de açúcares e proteínas, com potenciais de aplicação em diversos processos biotecnológicos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo produzir o exopolissacarídeo goma gelana em diferentes meios de cultivo, soro de queijo, permeado de soro de queijo e soro ácido de soja, através da utilização do microrganismo *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899, e comparar a quantidade de biopolímero produzida em diferentes meios sintéticos, além de analisar a viscosidade da goma obtida. As condições de cultivo utilizadas para a produção de goma gelana em agitador rotacional foram definidas como temperatura de 30°C por um período de 96 h, a uma velocidade de agitação de 250 rpm. Em comparação, os meios com maior produção de goma foram o soro de queijo, soro de queijo hidrolisado com β -galactosidase e meio sintético lactose, produzindo, respectivamente, 8,46 g L⁻¹, 8,19 g L⁻¹ e 9,87 g L⁻¹. Levando em consideração que o subproduto industrial com maior produtividade foi o soro de queijo, este foi levado a cultivo em biorreator, sob temperatura de 30°C, 400rpm e 2 vvm, por 72 h. A bioconversão em biorreator resultou em uma produção máxima de goma de 4,87 g L⁻¹. A viscosidade da goma gelana produzida a partir dos meios soro de queijo em agitador rotacional e soro de queijo em biorreator foi analisada, constatando que a goma produzida em agitador rotacional teve uma viscosidade maior do que a goma produzida por biorreator.

Palavras chave: *Sphingomonas paucimobilis*, goma gelana, soro de queijo, permeado de soro de queijo, soro ácido de soja, subprodutos industriais.

ABSTRACT

Microbial biopolymers present important properties and functional characteristics, such as thickening ability, suspension of particles in solutions, and water retention. Among these, gellan gum is a versatile hydrocolloid, highly stable in a wide range of pH and temperature, and thermo-reversibility, allowing its use in different areas, such as in the food, pharmaceutical, and chemical industries. Gellan gum production from industrial wastes such as whey, whey permeate and soy serum can represent lower costs associated with production, at the same time helping to reduce environmental impacts caused by improperly discarding these compounds in the environment. These substrates are characterized as rich sources of nutrients, containing substantial amounts of sugars and proteins with potential application in different biotechnological processes. In this context, this work aimed to produce the exopolysaccharide gellan gum in different culture media, whey, whey permeate, and soy serum, using *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 and compare the amount of biopolymer produced in different synthetic medium, as well as to analyze the viscosity of the gum produced from these wastes. The conditions used in the gellan gum production in shaker were temperature of 30°C in 96 h, and stirring rate of 250 rpm. The cultivation media with the highest production were whey, hydrolyzed whey and lactose synthetic medium, producing, respectively, 8.46 g L⁻¹, 8.19 g L⁻¹ and 9.87 g L⁻¹. As whey medium showed the better productivity, this was used in bioreactor cultivations, under temperature of 30°C, 400 rpm, and 2 vvm for 72 h. The production from bioreactor resulted in a maximum gum concentration of 4.87 g L⁻¹. The viscosities of gellan gum produced in whey in the shaker and in the bioreactor were analyzed. The gellan gum produced in shaker presented a higher viscosity than that produced in the bioreactor.

Keywords: *Sphingomonas paucimobilis*, gellan gum, whey, whey permeate, acid soybean serum, industrial byproducts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da goma gelana (Fonte: O'NEILL et al., 1983).....	15
Figura 2. Via proposta para a síntese de goma gelana (Fonte: Adaptado de MARTINS et al., 1991).....	19
Figura 3. Estrutura da rafinose e estaquiose e as enzimas que catalisam sua hidrólise (Fonte: LeBLANC et.al., 2004).....	25
Figura 4. Colônias de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> CCT 1899 crescidas a 30°C por 24 h em meios YPG (A) e YPL (B).	30
Figura 5. Cinética da produção de goma gelana em cultivos em agitador rotacional. (A) soro de queijo, (B) permeado de soro de queijo enriquecido com peptona e (C) soro ácido de soja. (■) lactose, (●) biomassa, (◇) goma gelana.	32
Figura 6. Cinética da produção de goma gelana em cultivos em agitador rotacional em soro de queijo hidrolisado (A), permeado de soro de queijo hidrolisado enriquecido com peptona (B). (■) lactose, (▲) galactose, (▼) glicose, (●) biomassa, (◇) goma gelana.....	36
Figura 7. Cinética da produção de goma gelana em meios semi-sintético lactose (A), YPL (B), YPG (C). (■) lactose, (▼) glicose, (●) biomassa, (◇) goma gelana.....	38
Figura 8. Aspecto do meio soro de queijo após a produção de goma gelana, em 72 h.	40
Figura 9. Cinética da produção de goma gelana em soro de queijo através de biorreator. (■) lactose, (●) biomassa, (◇) goma gelana.	41
Figura 10. Aspecto da goma gelana produzida através de (A) meio sintético lactose, (B) soro de queijo em agitador rotacional, (C) soro de queijo em biorreator.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações da goma gelana	16
Tabela 2. Composição média (%) do permeado e do soro de queijo (base seca).....	23
Tabela 3. Composição centesimal (%) do soro ácido de soja (base seca).....	24
Tabela 4. Produção de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) por <i>Sphingomonas paucimobilis</i> CCT 1899 crescida em diferentes meios de cultivo, em agitador rotacional, a 30 °C, 250 rpm.....	33
Tabela 5. Consumo de lactose, concentração de biomassa, produção de goma gelana e produtividade volumétrica em biorreator operado a 30 °C, 400 rpm, 2 vvm.	42
Tabela 6. Viscosidades nos diferentes meios de cultivo: Sintético lactose (SL), soro de queijo em agitador rotacional (SQ) e soro de queijo em biorreator (SQB).....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCT - Coleção de Culturas Tropical Fundação André Tosello

DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DQO - Demanda Química de Oxigênio

EPS - exopolissacarídeos

FEPAM - Fundação Estadual de Proteção ao Meio Ambiente

g – gramas

h- hora

L - litro

min- minutos

mL - mililitro

PS - meio permeado de soro de queijo

Q_p - produtividade volumétrica

SH - meio soro de queijo hidrolisado

SL - meio de produção industrial com lactose

SQ - meio soro de queijo

SQB – soro de queijo em biorreator

SS - meio soro ácido de soja

YPG – meio Yeast extract-Peptone-Glucose

YPL – meio Yeast extract-Peptone-Lactose

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivos gerais	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1. Goma gelana: características e aplicações na indústria	15
3.2. Biossíntese de goma gelana	18
3.3. Substratos alternativos utilizados na biossíntese de goma gelana	20
3.4. Resíduos industriais para a produção de goma gelana	21
3.4.1. Soro de queijo	22
3.4.2. Permeado de soro de queijo.....	23
3.4.3. Soro ácido de soja	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Microrganismo	26
4.2. Sistema experimental	26
4.3. Meios de cultivo	26
4.4. Produção de goma gelana em agitador rotacional	27
4.4.1. Preparo do pré-inóculo	27
4.4.2. Produção de goma gelana	27
4.5. Produção de goma gelana em biorreator	28
4.6. Recuperação e quantificação da goma	28
4.7. Métodos analíticos	29
4.8. Análise da viscosidade	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.5. Morfologia das colônias de <i>Sphingomonas paucimobilis</i> CCT 1899	30
5.6. Cinética da produção de goma gelana por <i>Sphingomonas paucimobilis</i> CCT 1899 em agitador rotacional	31
5.6.1. Subprodutos industriais	31
5.6.2. Subprodutos hidrolisados	35
5.6.3. Meios semi-sintéticos	37

5.7. Cinética da produção de goma gelana por <i>Sphingomonas paucimobilis</i> CCT 1899 em biorreator	40
5.8. Aspecto e viscosidade da goma gelana produzida por <i>Sphingomonas paucimobilis</i> CCT 1899	42
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

Biopolímeros são polissacarídeos produzidos por bactérias e outros microrganismos, sendo sua biossíntese diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio ambiente (MOREIRA, 2002). De forma geral podem ser divididos em três grandes grupos: intracelulares, integrantes da parede celular e extracelulares, também chamados de exopolissacarídeos (EPS). Caracterizados pela capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso, apresentam grande interesse industrial, sendo amplamente utilizados como espessantes, gelificantes e estabilizantes nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica. Entre estes biopolímeros, a classe dos extracelulares encontra-se como a mais amplamente empregada na indústria devido à facilidade na extração e maior rendimento. Gomas como, por exemplo, a xantana, a dextrana e a gelana são produzidas em larga escala, tendo elevada importância comercial no mercado, servindo como uma alternativa às gomas tradicionais produzidas quimicamente, visto que proporcionam uma maior especificidade durante a sua biossíntese (PACE, 1991; LIMA et al, 2001).

A goma gelana é extremamente versátil e forma um gel que solidifica em concentrações muito baixas, a partir de 0,1% (fração mássica). É conhecida por ser um gel muito resistente, com excelente estabilidade e alta eficiência, que pode ser utilizado na produção de inúmeros produtos, onde pode exercer várias funções, desde estabilizante em produtos químicos à revestimento comestível em alimentos, e por esse motivo apresenta um alto valor comercial. A produção da goma gelana a partir de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 é realizada industrialmente em meios sintéticos contendo glicose como fonte de carbono (VARTAK et al., 1995). Contudo, outras fontes de açúcares vêm sendo recentemente estudadas. A lactose pode ser empregada de forma viável para a produção de goma gelana, e, por isso, meios de fermentação como o soro de queijo e o permeado apresentam boas perspectivas relacionadas à produção da goma. Além destes subprodutos, o soro ácido de soja é proposto como uma alternativa, devido à alta concentração em carboidratos.

O soro de queijo é o principal subproduto proveniente da indústria de laticínios, mais especificamente da produção de queijos, e é conhecido por seu alto potencial poluidor quando descartado inadequadamente em cursos hídricos, em decorrência da elevada carga orgânica e do grande volume gerado. Caracterizado por elevados valores de demanda bioquímica de

oxigênio (DBO, 30-50 g L⁻¹), apresenta potencial poluidor aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico (SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010). A produção mundial de soro de queijo é estimada em 10⁸ toneladas por ano, sendo que o Brasil contribui com aproximadamente 6 % desse total. A produção de queijos no Brasil tem aumentado nos últimos anos, como em 2009, ano em que a geração de soro de queijo ultrapassou os 5,5 milhões de toneladas. Entre 2009 e 2010 o estado do Rio Grande do Sul contribuiu com cerca de 5 % na geração desse resíduo. Esses dados apresentam uma importância aumentada, visto que, no Brasil, a maior parte das indústrias produtoras de queijo é de pequeno e médio porte, o que favorece o descarte irregular desse subproduto devido à falta de recursos econômicos e tecnológicos, gerando danos ambientais.

Apesar do soro de queijo ser aproveitado em 50 % na indústria de produtos alimentícios e farmacêuticos, o restante do volume excedente é suficientemente grande para poder ser aplicado em outros processos tecnológicos. Uma alternativa é a sua valorização, visto que apresenta alto valor nutricional, sendo constituído principalmente por lactose (45-50 g L⁻¹), proteínas solúveis (6-8 g L⁻¹), lipídeos (4-5 g L⁻¹) e sais minerais (8-10 % do extrato seco) (SGARBIERI, 1996; SISO, 1996; GUIMARÃES et al., 2010). Alternativas de aproveitamento do soro de queijo utilizadas pela indústria incluem a recuperação de proteínas por um processo de ultrafiltração. Esse método gera grandes volumes de um produto remanescente rico em lactose, denominado permeado. A carga poluente do permeado é comparável a do soro, pois retém mais de 70 % dos sólidos. Desse modo, o permeado apresenta problemas de disposição similares aos do soro de queijo (SISO, 1996; DOMINGUES et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2010).

O soro ácido de soja é o subproduto da produção de proteína concentrada de soja. É considerado um resíduo problemático e que gera altos gastos em tratamento, devido a sua elevada carga orgânica. Apresenta altas quantidades de carboidratos, sendo, assim, um potencial meio para aproveitamento biotecnológico (WEBER, 2008).

Embora o soro de queijo e o permeado de soro de queijo sejam subprodutos ricos em nutrientes, o aproveitamento em novos processos produtivos ainda não é uma realidade a nível mundial (GABARDO, 2009). Além disso, o soro ácido de soja, apesar de apresentar um excelente potencial como substrato, até o momento não é reconhecido como tal. A disponibilidade desses subprodutos com baixo valor comercial no Brasil fortalece a

viabilidade da utilização em bioprocessos para produção de metabólitos de interesse como a goma gelana.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Analisar a produção do biopolímero goma gelana pelo cultivo da bactéria *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 a partir de diferentes subprodutos industriais e bioprocessos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Analisar a produção de goma gelana por *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em meio semi-sintético utilizado industrialmente e meio YPL, contendo lactose como fonte de carbono, e também meio YPG contendo glicose como fonte de carbono, em agitador rotacional;

2.2.2. Analisar a produção de goma gelana por *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em três subprodutos industriais: soro de queijo e permeado de soro de queijo contendo lactose como fonte de carbono, e soro ácido de soja contendo principalmente sacarose, rafinose e estaquiose como fontes de carbono, como também em soro de queijo hidrolisado e permeado de soro de queijo hidrolisado;

2.2.3. Comparar a produção de goma gelana obtida nos distintos meios de cultivo;

2.2.4. Analisar a produção de goma gelana a partir do melhor meio definido anteriormente, em biorreator;

2.2.5. Analisar a viscosidade das gomas produzidas nos diferentes meios.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Goma gelana: Características e aplicações na indústria

A goma gelana é um heteropolissacarídeo de cadeia linear constituído por uma estrutura formada por unidades de repetição de β -1,3-D-glicose, β -1,4-D-ácido glucurônico, β -1, 3-D-glicose e α -1,4-L-ramnose, seguidas de dois grupos acil, acetato e glicerato, ligando à glicose o resíduo adjacente de ácido glucurônico. Em relação a grupos acil, a goma gelana é classificada em gelana com maior grau de acetilação e gelana com menor grau de acetilação. A gelana altamente acetilada é a forma natural do biopolímero, e tem comprimento mais curto comparado à forma menos acetilada, resultante da quantidade de ligações de hidrogênio (O'NEILL et al., 1983). A sua estrutura pode ser observada na Figura 1.

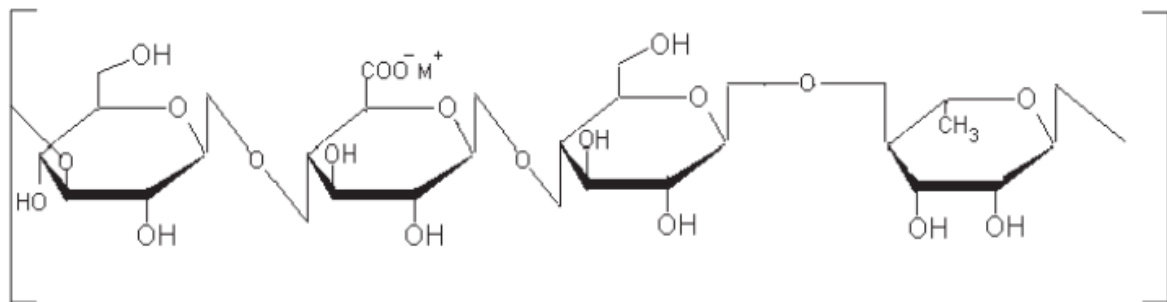


Figura 1. Estrutura da goma gelana (Fonte: O'NEILL et al., 1983).

Apesar de existirem em grande número, poucos EPS são produzidos em larga escala e liberados para comercialização, como a goma gelana (SUTHERLAND, 1998). Esta é atualmente produzida no Japão e Estados Unidos pela empresa C.P. Kelco, e comercializada com quatro nomes diferentes: Kelcogel, Gelrite, Phytigel e Gel-Gro. Kelcogel é amplamente utilizado na indústria de alimentos como espessante e agente de gelificação, enquanto que Gelrite, Fitigel e Gel-Gro são utilizados como agente solidificante, substituindo o ágar, para o crescimento microbiano e cultura de tecidos vegetais (KELCO, 2014). As propriedades da goma gelana estão descritas na Tabela 1.

Exopolissacarídeos microbianos têm encontrado uma ampla gama de aplicações em diversas áreas industriais devido à suas estruturas físicas e propriedades, por serem versáteis e se adequarem aos mais diversos usos (FRANÇOIS, et al., 1985). Esses biopolímeros estão ganhando mercado rapidamente e tornando-se economicamente competitivos com as gomas

naturais produzidas a partir de algas-marinhas ou outras plantas. São solúveis em água e tem unidades de repetição regulares em sua cadeia molecular.

Tabela 1. Especificações da goma gelana

Propriedade	Valor
Massa molecular	~ 500.000 Da
Aparência	Pó esbranquiçado
Solubilidade	Solúvel em água, formando solução viscosa; insolúvel em etanol
Nitrogênio	Não mais do que 3 %

Fonte: JECFA, 1996

As aplicações industriais da goma gelana vão desde as mais simples, até as mais complexas. Na indústria de alimentícia a goma é aplicada principalmente em alimentos que requerem uma estrutura gelificada. Em alguns produtos pode ser necessário o uso de combinações de diferentes gomas para que se tenha a estabilidade e textura adequadas. A goma gelana pode atuar ainda substituindo a pectina em doces e geleias, onde é eficaz concentrações de aproximadamente 0,4% (DURAN et al., 1994). Em produtos como o queijo, as interações da goma gelana com as proteínas de leite, particularmente a caseína e a lactoglobulina, aumentam o rendimento total de queijo e reduzem a perda de sólidos (principalmente em proteínas) no soro de queijo. Além disso, a retenção de água durante a produção de queijo é melhorada após a adição de gelana ao leite. A concentração de goma utilizada neste caso é novamente muito baixa, de 250-750 ppm (SANDERSON, 1983).

A eficácia da goma gelana na liberação controlada de drogas e adsorção no estômago foi testada e se mostrou semelhante a métodos já utilizados para este fim (WATARU et al., 2003). A goma gelana foi avaliada como um agente de ligação de comprimidos à base de lactose contendo metronidazol ou paracetamol e os resultados indicaram que embora a dureza dos comprimidos que contêm goma gelana foi inferior aos que contêm gelatina, a goma gelana pode ser empregada na formulação, apresentando dureza moderada e boa desintegração (IKE-UNOR et al., 2006).

Na engenharia de tecidos, a goma gelana está sendo estudada como novo biomaterial para suporte de cartilagens. Discos de hidrogel de goma gelana foram caracterizados em termos de propriedades mecânicas e estruturais, revelado um arranjo de cadeia muito homogênea e

viscoelástico. A avaliação do desempenho biológico da goma gelana como suporte de cartilagens mostrou que as substâncias liberadas pela goma não são citotóxicas, tendo assim, uma boa perspectiva para uso na engenharia de tecidos (OLIVEIRA et al., 2010).

Além de aplicações industriais, a goma gelana permite uma série de usos científicos como um potencial agente de substituição ao ágar em meios de cultura e em géis para eletroforese, resistindo a vários ciclos de autoclave e também a uma variedade de enzimas (KANG et al., 1982; COLE, 2000). A imobilização de microrganismos com goma gelana, que oferece uma matriz mecanicamente estável para esse tipo de processo, apresentou alta eficiência (WENRONG et al., 2000).

A goma gelana é um EPS excretado por microrganismos do gênero *Sphingomonas*, mais precisamente pela espécie *Sphingomonas paucimobilis* (POLLOCK, 2002; YABUUCHI et al., 1990). Apesar de a goma gelana ser um polissacarídeo há tempos descoberto, ainda hoje sua produção não foi completamente estudada. Fatores como o meio de crescimento, pH, temperatura e agitação influenciam de forma importante o desempenho do microrganismo e, com isso, estudos buscando otimizar o processo de produção de goma gelana têm sido realizados.

Em relação à temperatura ótima de produção, estudos têm demonstrado que esta se situa em 30 °C. A produção de goma gelana a partir de *Sphingomonas paucimobilis* crescida em meio contendo glicose 30 g L⁻¹ como fonte de carbono foi testada em diferentes temperaturas (28 – 34 °C) onde o autor verificou que a produção máxima, de goma gelana, de aproximadamente 3 g L⁻¹, foi obtida para a temperatura de 30 °C (WEST, 2003). Além disso, dois estágios de temperatura ao longo do cultivo foram testados (33 °C e 28 °C) com a finalidade de verificar a influência desta sobre a produção da goma. Primeiramente, os testes foram realizados na temperatura mais alta (33 °C) e após 24 h, a temperatura foi baixada para 28°C. Os autores observaram um aumento na produção da goma para esta temperatura, sendo a quantidade máxima produzida de 22,61 g L⁻¹ (ZHU et al., 2013).

O pH do meio é outra variável importante, além de influenciar no crescimento do microrganismo, também influencia na formação do produto. O valor de pH normalmente recomendado para a produção do gel varia entre 6,5-7,0. Ambientes mais ácidos ou mais alcalinos reduzem o crescimento celular, e, conseqüentemente, a produção de goma (ISHWAR et al., 2007; BAJAJ et al., 2006).

O efeito da agitação sobre a taxa de produção de goma gelana foi estudado, e chegou-se a conclusão que uma agitação de 250 rpm é adequada para a produção da goma, já que níveis menores de agitação foram insuficientes para a adequada homogeneização do meio contendo a goma. Em baixas taxas de agitação, apesar de a viscosidade ser elevada, a taxa de transferência de oxigênio não é suficiente para manter o aumento da biomassa, ou seja, o oxigênio dissolvido no meio é um limitante na produção de goma (DREVETON et al., 2006). Através de cultivos em biorreator, autores inferiram que altas taxas de aeração combinada com agitação vigorosa aumentam o crescimento de *Sphingomonas paucimobilis*. Através dessa informação, uma concentração alta, de 12,4 g L⁻¹ de goma, foi obtida sob agitação de 500 rpm a 2 vvm de aeração (GIAVASIS et al., 2006).

Outro fator importante relacionado à síntese de goma gelana é o meio de crescimento. Os componentes do meio para a produção de goma gelana são basicamente uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais inorgânicos. A fonte de carbono é o componente mais importante, pois afeta diretamente os rendimentos da produção, composição, estruturas e propriedades da goma (MARGARITIS et al., 1985).

Análises reológicas demonstraram que a goma gelana tem um comportamento fortemente pseudoplástico, mesmo em baixas concentrações, como 1 g L⁻¹. Análises mais profundas relataram que uma das variáveis que contribuem para a mudança de viscosidade da goma gelana é a composição do meio. Meios com baixa ou nenhuma quantidade de nitrogênio deram origem a gomas com baixa consistência e altas taxas de cisalhamento (DREVETON et al., 1994).

3.2. Biossíntese de goma gelana

As rotas metabólicas envolvidas na síntese das unidades de repetição do tetrassacarídeo goma gelana e as enzimas envolvidas nesta rota têm sido investigadas por diversos pesquisadores. Analisando a via Embden-Meyerhof e a via das pentoses, estudos sugeriram que a utilização da glicose foi iniciada pela ação da glicoquinase em conjunto com a glicose desidrogenase (VARTAK et al., 1995).

Uma estirpe mutante sem o gene codificador de G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase) não mostrou diferença nas taxas de utilização de glicose ou produção de CO₂, sugerindo que esta enzima não é essencial para o metabolismo de glicose em *Sphingomonas*

paucimobilis. Um aumento compensatório das enzimas glicose desidrogenase ou gluconatoquinase indica seu envolvimento na via, porém, até o momento não existe nenhuma indicação clara de que ocorra esse mecanismo (VARTAK et al., 1995; GIAVASIS et al., 2000).

Uma possível via para a síntese de goma gelana foi proposta assumindo que a síntese do polissacarídeo requer precursores ativados antes de cada unidade de repetição ser montada, semelhante a outros EPS sintetizados na parede celular de microrganismos. Esses precursores foram detectados por ensaios enzimáticos e foram definidos como açúcares difosfato nucleotídicos, UDP-glicose, TDP-ramnose e ácido UDP-glicurônico. A via proposta é mostrada na Figura 2. A glicose-6-fosfato ocupa uma posição chave a partir da qual duas rotas começam, uma começando com glicose uridina-5-difosfato (UDPG) e a outra levando à glicose timina-5-difosfato (TDPG). Por sua vez, UDPG induz a síntese de ácido D-glicurônico e D-glicose, e TDPG induz a síntese de ramnose. A combinação destes três componentes resulta na síntese de goma gelana (MARTINS et al., 1993). Entretanto, as reações que ligam esses três componentes ainda não estão totalmente esclarecidas.

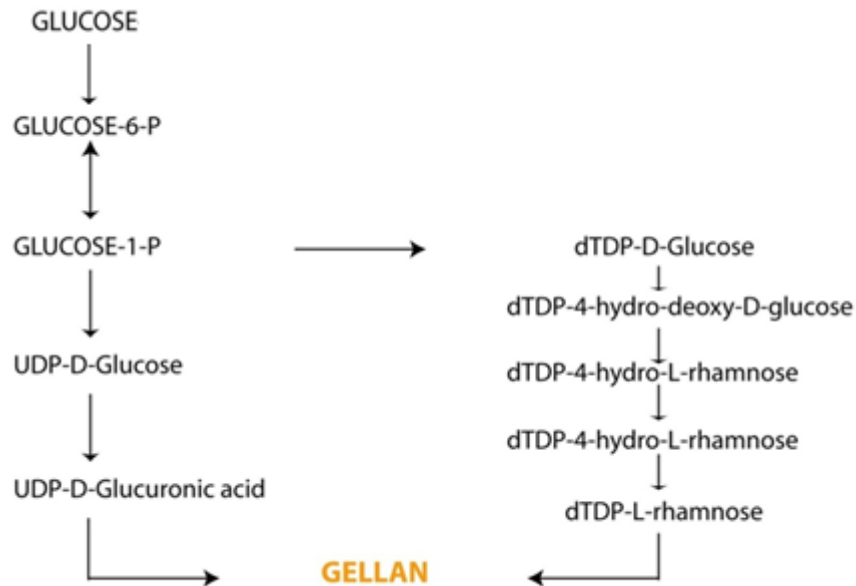


Figura 2. Via proposta para a síntese de goma gelana (Fonte: Adaptado de MARTINS et al., 1991)

3.3. Substratos alternativos utilizados na biossíntese de goma gelana

O microrganismo *Sphingomonas paucimobilis* é versátil quando se trata de fontes de carbono. De acordo com estudos, hidratos de carbono como glicose, frutose, maltose, sacarose

e manitol podem ser usados isoladamente ou em combinação como fonte de carbono (LOBAS et al., 1992). A produção de goma gelana por *Sphingomonas paucimobilis* usando glicose, lactose ou soro de queijo como fonte de carbono produziu valores de 14,5 g L⁻¹, 10,2 g L⁻¹ e 7,9 g L⁻¹, respectivamente (FIALHO et al., 1999). Em comparação, quando realizada a bioconversão através de biorreator, a quantidade de goma produzida passa de 13,67 g L⁻¹ em agitador rotacional, para 14,75 g L⁻¹ (WANG et al., 2006). As enzimas responsáveis pela síntese de goma gelana foram analisadas em meios sintéticos glicose e lactose, constatando-se que, apesar da menor produção de goma em meio contendo lactose, suas enzimas apresentaram uma maior atividade em comparação com o meio utilizando glicose (FIALHO et al., 1999).

A utilização de resíduos agroindustriais como substratos alternativos na produção de EPS permite a redução de custos de produção e minimiza problemas ambientais, auxiliando na destinação desses resíduos. A preferência dos microrganismos produtores de EPS por substratos contendo os açúcares glicose e sacarose é evidenciada (SUTHERLAND, 2002), porém algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, como, por exemplo, melão, bagaço de soja, casca de café e bagaço de mandioca, entre outros (NITSCHKE et al., 2001; WOICIECHOWSKI, 2001; KALOGIANNIS et al., 2003; JIN et al., 2003; BOZA et al., 2004; BAE & SHODA, 2004).

Indústrias de beneficiamento de soja geram milhares de toneladas de bagaço de soja anualmente. O bagaço de soja é um subproduto com baixo valor agregado, mas que, dependendo do processo pelo qual é obtido, apresenta excelentes valores nutricionais, que podem ser aproveitados das mais diversas maneiras em bioprocessos, como por exemplo, na produção de goma gelana (SOY PROTEIN COUNCIL, 1987; WEBER, 2008), em que valores máximos de 7,5 g L⁻¹ foram produzidos a partir desse subproduto (JIN et al., 2003).

3.4. Resíduos industriais para produção de goma gelana

Devido à conscientização da população e à preocupação com questões relacionadas à sustentabilidade, indústrias como a alimentícia vêm investindo, cada vez mais, em tecnologias que visam o controle da emissão de resíduos, e também seu aproveitamento (AMANTE et al., 1998). Resíduos não aproveitados significam perda de parte do lucro possível por parte das empresas, juntamente com maiores gastos no tratamento para a sua destinação adequada. Com a aprovação da Lei de Crimes Ambientais, no início de 1998, que estabeleceu pesadas sanções para empresas responsáveis pela disposição inadequada de resíduos, houve um aquecimento no mercado de gerenciamento e destinação de resíduos. Empresas começaram a focar no aproveitamento destes resíduos, e mais pesquisas começaram a ser desenvolvidas (SILVA, 2001).

Indústrias de alimentos se caracterizam por gerar resíduos com elevada carga orgânica, sendo por isso, altamente poluidores quando descartados inadequadamente (EL-GOHARY et al., 1987). A indústria de laticínios constitui uma parcela importante da indústria de alimentos, e sua contribuição em termos de poluição a partir de resíduos gerados é significativa, sendo, portanto, necessário o tratamento prévio de seus despejos líquidos antes do descarte em cursos hídricos. Um dos resíduos mais problemáticos da indústria de laticínios é o soro de queijo, que, em si, não é um poluente, mas quando lançado em cursos hídricos provoca enorme efeito poluidor devido a sua alta quantidade de substâncias orgânicas. Estas, por sua vez, demandam um grande consumo de oxigênio (DBO) pelas bactérias biodegradadoras, o que acarreta na diminuição da quantidade de oxigênio dissolvido, prejudicando, dessa forma, a vida aquática (BRAILE & CAVALCANTI, 1979; PONSANO & CASTRO-GÓMEZ, 1995; PORTO et al., 2005).

Em decorrência dessa problemática, alguns processos que visam valorização do soro de queijo, como a recuperação e comercialização de proteínas provenientes deste para a produção de suplementos alimentares, vêm sendo utilizados. Porém, esse processo de recuperação de proteínas, chamado ultrafiltração, gera um resíduo tão poluente quanto o soro de queijo, chamado permeado, que retém aproximadamente 70% dos sólidos presentes no soro de queijo (EL-KHAIR, 2009).

Assim como os resíduos de indústrias de laticínios, o soro ácido de soja é um subproduto industrial de alto potencial de aproveitamento em bioprocessos. É gerado por empresas beneficiadoras de soja, durante a etapa de lavagem e centrifugação do coágulo ácido de soja, durante o processo de fabricação da proteína concentrada. O soro de soja apresenta

alto potencial poluidor, sendo que cada tonelada de proteína produzida, 28 m³ de soro ácido são gerados.

3.4.1. Soro de queijo

A indústria de laticínios é responsável pela geração de uma série de resíduos com diferentes características, conforme o produto produzido. Um desses resíduos é o soro de queijo, um subproduto da indústria de queijos obtido após a separação da caseína no leite, a partir da ação da enzima quimosina. É um líquido opaco amarelo-esverdeado obtido após a precipitação da caseína. O soro de queijo representa 85-95% do volume do leite utilizado e concentra aproximadamente 55% dos nutrientes presentes no leite, sendo aproximadamente 50 g L⁻¹ de lactose, 9 g L⁻¹ de proteínas, 3 g L⁻¹ de gordura, 6 g L⁻¹ de sais minerais e 1 g L⁻¹ de ácido láctico (RICHARDS, 2002; SISO, 1996; DOMINGUES et AL., 2010). A composição do soro varia de acordo com o tipo de queijo fabricado. Na elaboração de queijos frescos se obtém um soro mais ácido de composição diferente do soro provindo de queijos de massa prensada. O soro doce, obtido por coagulação enzimática em pH que varia entre 5,9 a 6,3, contém menor quantidade de ácido láctico, percentual de lactose mais elevado, menor teor de cálcio e menor teor de minerais em relação ao soro ácido, obtido em pH 4,6 (MADRID et al., 1995; SGARBIERI, 1996; SISO, 1996).

Para cada quilo de queijo produzido, são utilizados 10 litros de leite, dos quais 9 litros são soro remanescente. (KOSIKOWSKI, 1979; KOUSHKI et al., 2012; CARVALHO et al., 2013). A produção mundial de soro de queijo é estimada em cerca de 160 milhões de toneladas anuais, com uma taxa de crescimento anual de 2 % (GUIMARÃES et al., 2010). Além disso, a produção de queijos no Brasil está crescendo a uma taxa de 4,6% ao ano, nos últimos dez anos, o que indica o dobro do crescimento mundial, e, conseqüentemente, um aumento considerável na geração de soro de queijo. O Rio Grande do Sul é o segundo maior produtor de queijos do país, gerando cerca de 270 mil toneladas de soro de queijo entre os anos de 2009 e 2010 (SIQUEIRA et al., 2010; MAPA/SPA, 2012).

Em se tratando de disposição adequada, o soro de queijo se constitui no subproduto mais preocupante da indústria de laticínios devido ao elevado teor de carga orgânica, que varia entre 30 g L⁻¹ e 50 g L⁻¹ de DBO e entre 60 g L⁻¹ e 80 g L⁻¹ de DQO, e também devido ao grande volume em que é gerado. O soro de queijo apresenta potencial poluidor aproximadamente 100 vezes maior que o esgoto doméstico (RICHARDS, 2002; PORTO et

al., 2005), sendo que quando descartado inadequadamente pode levar a destruição da vida aquática. Dessa forma, o seu aproveitamento em novos processos produtivos pode minimizar os problemas ambientais, além daqueles relacionados aos custos para o seu tratamento por parte das empresas (TRINDADE, 2002). Alternativas que agregam valor ao soro de queijo estão sendo cada vez mais estudadas, uma dessas alternativas é o uso como substrato em processos biotecnológico.

3.4.2. Permeado de soro de queijo

O permeado de soro de queijo é gerado após o processo de ultrafiltração do soro de queijo, para produzir isolado ou concentrado proteico. Cerca de 70% dos sólidos presentes no soro são mantidos no permeado, principalmente carboidratos como a lactose (SISO, 1996), conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Composição média (%) do permeado e do soro de queijo (base seca).

	Permeado	Soro de queijo
Proteínas	3 – 8	11 – 14,5
Carboidratos	68 – 85	63 – 75
Gorduras	1,5	1 – 1,5
Minerais	8 – 20	8,2 – 8,8

Fonte: STOLIAR, 2009

Levando em consideração o alto conteúdo de nutrientes presentes no permeado, seu descarte no meio ambiente, assim como o do soro de queijo, causa severos danos ambientais (El-KHAIR, 2009). A grande maioria dos dados existentes relacionados a DBO e DQO são para o soro de queijo, entretanto como a composição de ambos é muito semelhante, os dados são equivalentes. O permeado apresenta uma DBO em torno de 60 g L⁻¹ e DQO em torno de 80 g L⁻¹, valores tão significativos quanto o soro de queijo (ANDRADE & MARTINS, 2002, GUIMARÃES et al., 2010).

Atualmente as empresas estão buscando tecnologias para o aproveitamento do permeado, pois é um subproduto pouco valorizado comercialmente e que apresenta um alto valor nutricional, podendo ser utilizado como fonte de carbono em processos fermentativos (LIMA, et al., 2012). Além disso, um dos fatores contribuintes para essa busca é a questão da

necessidade de tratamento para incorporação ao meio ambiente, que, apesar de necessário, gera custos para as empresas (ALMEIDA, 2004; BALDASSO, 2009).

3.4.3. Soro ácido de soja

O soro ácido de soja é um subproduto proveniente de indústrias beneficiadoras de soja, produzido durante a fabricação de proteína concentrada de soja, durante a etapa de lavagem e separação do coágulo ácido de soja. Nesta etapa, o pH é equivalente a 4,5 e o coágulo proteico é submetido a uma operação de centrifugação, em que a fração líquida constitui o soro ácido de soja. A Tabela 3 mostra a composição do soro ácido de soja.

Tabela 3. Composição centesimal (%) do soro ácido de soja (base seca).

Componentes	Base seca
Carboidratos	63,08 %
Proteínas	3,60 %
Lipídeos	9,91 %
Cinzas	20,18 %
Umidade	2,20 %
Fibra alimentar	1,03 %

Fonte: AOAC, 1995

Extremamente rico em açúcares, principalmente a sacarose, estaquiose e rafinose, o soro ácido de soja contém fontes de carbono que podem ser utilizadas por microrganismos que sintetizam a enzima α -galactosidase, como a bactéria *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 (INTERPROSCAN, 2014). A enzima é responsável pela hidrólise de ligações encontradas em oligossacarídeos como a estaquiose e a rafinose (ADEMARK et al., 2001). A Figura 3 ilustra a estrutura dos açúcares presentes no soro ácido de soja e as enzimas responsáveis por catalisar sua hidrólise em açúcares assimiláveis pelo microrganismo.

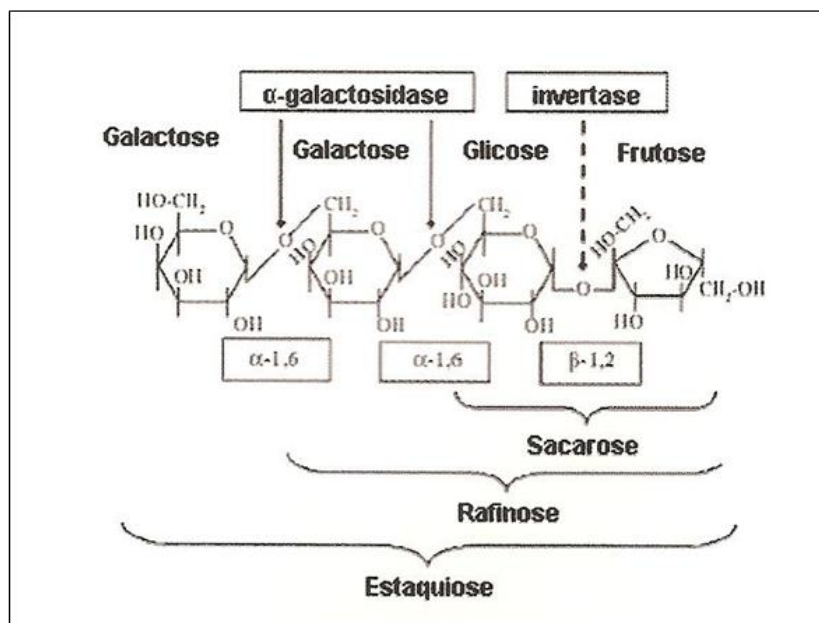


Figura 3. Estrutura da rafinose e estaquiase e as enzimas que catalisam sua hidrólise (Fonte: LeBLANC et.al., 2004).

No Rio Grande do Sul, são produzidos mensalmente mais de 50.000 m³ desse subproduto pela empresa DuPont (RS, Brasil), e devido a esse grande volume gerado são gastos aproximadamente R\$175.000,00 mensais para o tratamento do mesmo. Devido à elevada carga orgânica presente no soro ácido de soja, este apresenta alto potencial poluidor, quando descartado de forma livre de cuidados.

Atualmente, empresas que processam a soja consideram o soro ácido de soja um resíduo e têm altos gastos no processo de tratamento deste efluente, que necessita de mais de uma etapa de tratamento para que atinja o padrão de emissão de resíduos determinado pela FEPAM (Fundação Estadual de Proteção Ambiental, RS, Brasil). Essa necessidade de múltiplas etapas é devido ao soro ácido possuir uma DQO em torno de 20 g L⁻¹, podendo ser lançado em cursos hídricos com DQO máxima de 0,018 g L⁻¹ (WEBER, 2008).

O potencial uso biotecnológico do soro ácido de soja vem sendo recentemente descoberto. Com praticamente nenhuma referência à utilização deste como substrato na literatura, torna-se uma inovação seu uso em bioprocessos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

O microrganismo *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 foi adquirido da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (SP, Brasil). Para sua manutenção, a linhagem foi mantida em meio YP contendo (g L⁻¹): glicose ou lactose, 50; peptona, 5; extrato de levedura, 3; NaCl, 5; ágar, 20; em pH 7,0, previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 min. As placas foram incubadas a 30°C durante 24 horas, e, posteriormente, armazenadas a 4 °C. Para a sua preservação, a linhagem foi estocada em uma suspensão celular contendo 80 % de células e 20% de glicerol, a -20 °C.

4.2. Sistema experimental

A condução dos experimentos foi realizada em duas etapas. Na primeira, buscou-se avaliar e comparar a produção de goma gelana em agitador rotacional por duas grandes classes de meios de cultivo: subprodutos industriais e meios sintéticos. Numa segunda etapa, a produção da goma foi realizada em biorreator, a partir do meio de cultivo em que se obteve a maior produção de goma na etapa anterior. Análises de viscosidade da goma também foram realizadas para os meios com as maiores produções do biopolímero.

4.3. Meios de cultivo

Para produção da goma em agitador rotacional, os meios foram divididos em dois grandes grupos: subprodutos industriais e meios semi-sintéticos. O grupo dos subprodutos industriais foi composto por soro de queijo 50 g L⁻¹ (lactose, 40 g L⁻¹, proteínas, 6 g L⁻¹ e sais minerais, 4 g L⁻¹), proveniente da empresa Elegê laticínios S.A. (RS, Brasil); permeado de soro de queijo 50 g L⁻¹ (lactose, 46,5 g L⁻¹, proteínas, 1 g L⁻¹ e sais minerais, 2,5 g L⁻¹), obtido da empresa Sooro (PR, Brasil); e soro ácido de soja 45 g L⁻¹, cedido pela empresa DuPont (RS, Brasil). Já o grupo dos meios semi-sintéticos foi formado por meio semi-sintético lactose (SL), composto de (g L⁻¹): lactose, 50; extrato de levedura, 1; Na₂HPO₄, 1; KH₂PO₄, 3; K₂SO₄, 10; MgSO₄·7 H₂O, 1; meios YPL e YPG compostos por (g L⁻¹): lactose ou glicose,

50, respectivamente; peptona, 5; extrato de levedura, 3; NaCl, 5. O pH de todos os meios de cultivo foi ajustado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M.

4.4. Produção de goma gelana em agitador rotacional

4.4.1. Preparo do pré-inóculo

O microrganismo foi inoculado em frascos cônicos de 250 mL contendo 50mL de meio YPG, previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. O material foi mantido em agitador rotacional a 30°C com uma agitação de 250 rpm durante 12 horas. Ao final desse tempo, a concentração celular foi padronizada para densidade óptica igual a 1 ($DO_{640\text{ nm}} = 1$). Após, as células foram centrifugadas e ressuspensas em um volume correspondente a 10% do volume total de cultivo, para cada um dos distintos meios.

4.4.2. Produção de goma gelana

A produção da goma ocorreu através da adição de 5mL de inóculo contendo a linhagem *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899, em um frasco cônico de 250 mL contendo 45 mL de meio de cultivo, totalizando um volume final de 50 mL. Os frascos cônicos contendo a linhagem foram mantidos em agitador orbital, a uma temperatura de 30°C, a uma velocidade de agitação de 250 rpm, por um período de 96 h. Oito meios de cultivos foram testados nesta etapa experimental: 1) soro de queijo 50 g L⁻¹; 2) permeado de soro de queijo 50 g L⁻¹ suplementado com peptona bacteriológica, 5 g L⁻¹; 3) soro de queijo 50 g L⁻¹ hidrolisado com a enzima β-galactosidase; 4) permeado de soro de queijo 50 g L⁻¹ hidrolisado com a enzima β-galactosidase e suplementado com peptona, 5 g L⁻¹; 5) soro ácido de soja 45 g L⁻¹; 6) Sintético lactose (SL) 50 g L⁻¹; 7) YPL 50 g L⁻¹ e 8) YPG 50 g L⁻¹. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e a análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o programa Statistic 7.0 (StatSoft, Estados Unidos).

A hidrólise da lactose presente nos meios soro e permeado de queijo foi realizada através da enzima comercial β-galactosidase (DSM Food Specialties, Holanda), a partir da adição de 0,5 mL de enzima para cada litro de meio de cultivo, a uma temperatura de 25 °C,

por um período de 8 h. O soro ácido de soja foi concentrado quatro vezes em concentrador para que atingisse uma concentração de açúcares de aproximadamente 45 g L^{-1} .

4.5. Produção de goma gelana em biorreator

Nesta etapa experimental o soro de queijo foi o meio de cultivo escolhido para ser empregado na produção do biopolímero visto apresentar alta produção de goma gelana em experimentos em agitador rotacional (etapa anterior), e especialmente, por ser um meio de cultivo alternativo e menos oneroso para a condução deste bioprocessos. O pré-inóculo foi feito adicionando-se uma alçada da bactéria em um frasco de 250 mL contendo 50 mL de meio YPL. O frasco foi incubado em agitador rotacional a 250 rpm, 30°C por 12 h. Em seguida, a concentração celular foi padronizada para densidade óptica igual a 1 ($\text{DO}_{640} = 1$). As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio soro de queijo em um volume correspondente a 10% do volume total do biorreator de bancada. O meio de cultivo utilizado foi o soro de queijo 50 g L^{-1} (lactose, 40 g L^{-1} , proteínas, 6 g L^{-1} e sais minerais, 4 g L^{-1}). O cultivo ocorreu a uma temperatura de 30°C , a uma velocidade de agitação de 400 rpm, e aeração de 2 vvm. Este experimento foi realizado em duplicata.

4.6. Recuperação e quantificação da goma

Para recuperação da goma gelana o meio de cultivo foi submetido à centrifugação a $15.000 \times g$ por 15 min a 4°C , para a separação das células. Em seguida, foi acrescentado ao sobrenadante, três partes de etanol 92 % para a precipitação. Após 30 minutos de repouso, o material foi novamente centrifugado ($15.000 \times g$, 15 min, 4°C) para a recuperação do biopolímero precipitado. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado de goma gelana seco em estufa a 50°C por 24 h até peso constante. O peso-seco da goma foi obtido através da relação entre a diferença de peso do frasco vazio previamente seco com o peso do frasco seco acrescido da goma dessecada.

4.7. Métodos analíticos

A concentração dos açúcares lactose, glicose e galactose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando detector de índice de refração (IR) e coluna Bio-RadAminex HPX 87H, a 45 °C, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM como fase móvel, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e 20 µL de volume de amostra. A concentração dos açúcares totais presentes em meio soro ácido de soja foi realizada por método Dubois, utilizando glicose como padrão (DUBOIS et al., 1956). A concentração celular foi determinada através da medição da absorbância em 640nm e correlacionada a curva de calibração densidade óptica *versus* peso seco.

4.8. Análise da viscosidade

A análise da viscosidade da goma produzida foi realizada para os meios em que se obteve as maiores produções do biopolímero. Para tanto, as gomas produzidas através de soro de queijo e meio sintético de lactose em agitador rotacional foram avaliadas. Para fins de comparação, a goma produzida por soro de queijo em biorreator também foi analisada. Amostras de 50mL de cada meio foram precipitadas, secas em estufas a 30 °C e diluídas em água, em soluções de 30 g L⁻¹. As amostras foram analisadas em viscosímetro de Ostwald a uma temperatura de 30 °C, realizando seis repetições.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Morfologia das colônias de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899

Sphingomonas paucimobilis é uma bactéria gram-negativa em forma de bacilo. As colônias desse microrganismo apresentam uma cor amarela pigmentada e uma textura pegajosa, devido aos glicosfingolipídeos (GSL) presentes na membrana externa, diferente das demais bactérias gram-negativas. Os GSL parecem ter muitas das mesmas funções dos LPS presentes na maioria das membranas de bactérias gram-negativas, tal como uma barreira de substâncias bactericida (BALKWILL et al, 1999).

A glicose é utilizada preferencialmente para o crescimento, mas uma grande variedade de outros açúcares tais como arabinose, fucose, galactose, lactose, manose, melibiose, sacarose, trealose e xilose também são frequentemente assimilados. Outro aspecto interessante é que, além de monossacarídeos e dissacarídeos, *Sphingomonas paucimobilis* também pode assimilar polissacarídeos como o amido (BALKWILL et al, 1999).

A Figura 4 ilustra a semelhança de crescimento da bactéria *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em placas contendo meios YPG e YPL. Nota-se que as características morfológicas das colônias são condizentes com o descrito na literatura (BALKWILL et al., 2006).

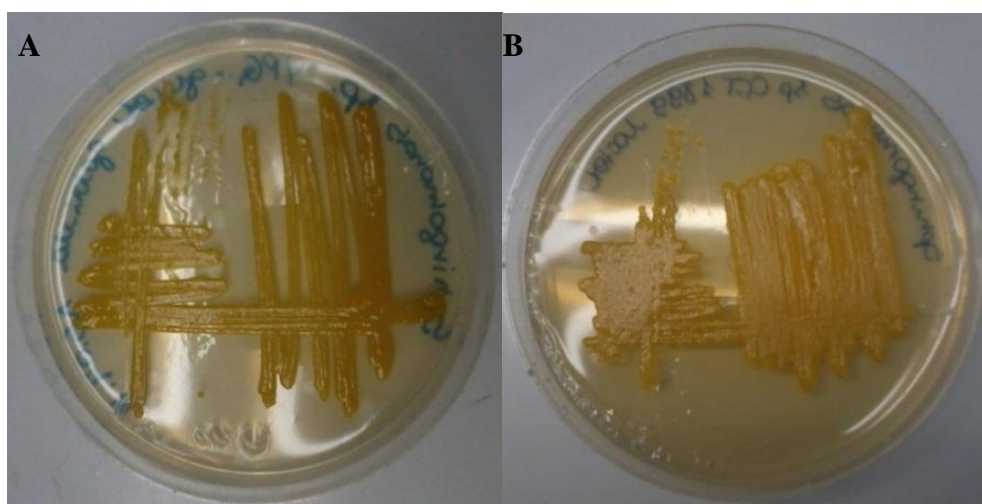


Figura 4. Colônias de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 crescidas a 30°C por 24 h em meios YPG (A) e YPL (B).

5.2. Cinética da produção de goma gelana por *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em agitador rotacional

A produção de goma gelana em agitador rotacional foi realizada com o objetivo de avaliar a influência de diferentes substratos sobre a cinética de produção do biopolímero, e, posteriormente utilizar o meio de cultivo que conferiu a maior produção da goma para testes em biorreator. Para esta etapa experimental, a abordagem da discussão será baseada nas duas grandes classes de meio de cultivo empregadas neste trabalho: os subprodutos industriais e os meios semi-sintéticos, sendo que na classe dos subprodutos industriais, encontram-se ainda os subprodutos hidrolisados.

5.2.1. Subprodutos industriais

A produção de goma utilizando subprodutos industriais tem como objetivo aproveitar o grande potencial nutricional que estes apresentam como substrato alternativo para este bioprocessos, auxiliando na redução de custos associados à produção do biopolímero. Neste trabalho foram utilizados três subprodutos industriais como substrato: soro de queijo, permeado de soro de queijo enriquecido com peptona e soro ácido de soja. Os resultados obtidos para a produção de goma gelana nos distintos meios podem ser observados na Figura 5, e detalhadamente na Tabela 1 do Anexo deste trabalho.

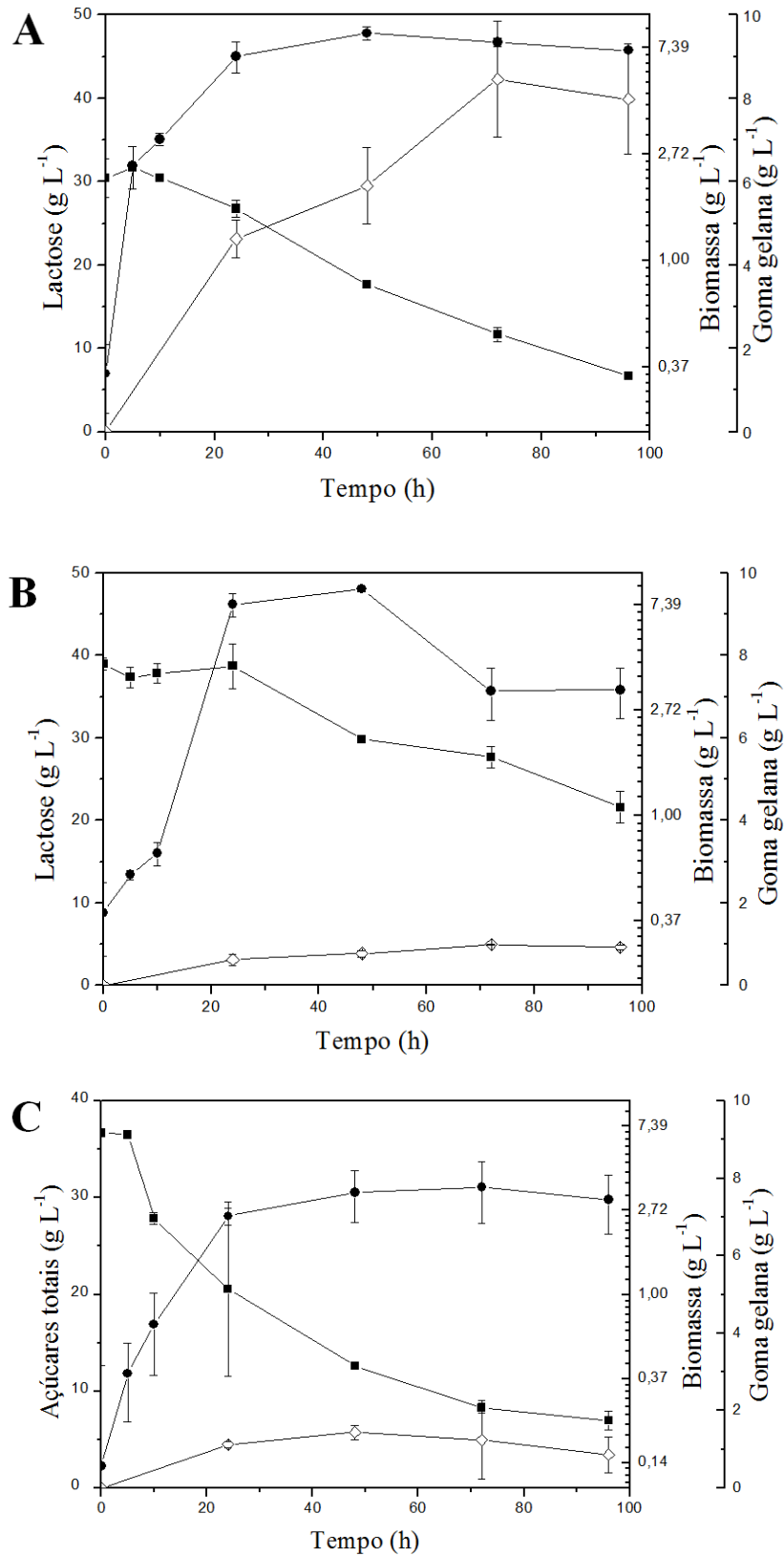


Figura 5. Cinética da produção de goma gelana em cultivos em agitador rotacional. (A) soro de queijo, (B) permeado de soro de queijo enriquecido com peptona e (C) soro ácido de soja. (■) lactose, (●) biomassa, (◇) goma gelana.

O soro de queijo é um subproduto rico em nutrientes, com quantidades interessantes de carbono, nitrogênio e sais minerais para a utilização em bioprocessos (RICHARDS, 2002; DOMINGUES, et al., 2010; GABARDO et al., 2012). A disponibilidade dessas fontes de nutrientes proporciona um ambiente favorável ao crescimento bacteriano e a produção de compostos microbiológicos. No presente trabalho o soro de queijo apresentou grande potencial como substrato. Comparativamente, durante as 96 h de cultivo, foi o subproduto com maior produção, chegando a um máximo de 8,46 g L⁻¹ em 72 h, e uma produtividade volumétrica (Q_p) de 0,12 g L⁻¹ h⁻¹ conforme mostra a Figura 5A e a Tabela 4. Esse resultado foi semelhante ao encontrado em literatura para produção de goma gelana em soro de queijo 30 g L⁻¹ em agitador rotacional 250 rpm a 30°C, que foi de 7,9 g L⁻¹ (FIALHO et al., 1999).

Além da maior produção de goma, esse bioprocessos obteve grande formação de biomassa, sendo a maior entre os subprodutos, de 8,42 g L⁻¹ em 48 h. A quantidade de lactose inicial foi de 30,43 g L⁻¹, porém, durante o cultivo essa concentração foi diminuindo conforme aumentava biomassa e a produção de goma gelana, o que significa que o microrganismo estava consumindo ativamente o açúcar, chegando a um mínimo de lactose residual de 6,67 g L⁻¹ em 96 h.

Tabela 4. Produção de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) por *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 crescida em diferentes meios de cultivo, em agitador rotacional, a 30 °C, 250 rpm.

Meios de cultivo	Goma gelana(g L ⁻¹)	Q_p (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Soro de queijo	8,46 ^a	0,12
Permeado suplementado	0,99 ^b	0,01
Soro ácido de soja	1,44 ^b	0,03
Soro de queijo hidrolisado	8,19 ^a	0,11
Permeado hidrolisado	1,15 ^b	0,02
Sintético lactose	9,87 ^a	0,10
YPL	0,04 ^b	0,01
YPG	1,46 ^b	0,01

*Letras iguais não diferem entre si pelo teste Tukey (p<0,05)

O permeado de soro de queijo pode ser uma alternativa para utilização nesse bioprocessos, contudo, como contém pouca quantidade de proteína e nitrogênio, pode existir a necessidade de suplementação do mesmo. Tendo em vista essa baixa concentração de

nutrientes essenciais para o crescimento microbiano e a produção de goma, o permeado foi enriquecido com peptona, servindo como fonte para tal. Analisando a Figura 5B, nota-se que apesar do pico de biomassa ser de $8,61 \text{ g L}^{-1}$ em 48 h, o pico de produção de goma foi de apenas $0,99 \text{ g L}^{-1}$ em 72 h, com produtividade volumétrica de $0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 4). Uma explicação para isso é a influência da falta de precursores essenciais para a síntese de enzimas necessárias para a produção de goma gelana, como o fósforo utilizado na síntese da enzima UDPG (uridine-5-diphosphate-D-glucose), que induz a síntese de glicose e ácido glucurônico, dois dos principais componentes da estrutura da goma gelana (MARTINS et al., 1993). Muito embora o meio permeado de soro de queijo tenha sido suplementado com fonte de nitrogênio, a metabolização do açúcar foi de apenas 55 %, havendo grande formação de biomassa. Este fato sugere o açúcar foi metabolizado apenas para a formação da biomassa, e não para a geração de goma gelana. Uma hipótese para isso é que a diferença entre as proteínas presentes no soro de queijo e as sintéticas adicionadas no permeado podem estar influenciando diretamente na bioconversão para goma gelana, e, por isso, uma baixa quantidade de goma foi obtida a partir deste meio. Maiores estudos para avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio se fazem necessárias para esclarecer este comportamento.

A goma gelana produzida pelo soro ácido de soja apresentou um aspecto visual diferenciado. A mudança na estrutura da goma pode ser devido aos componentes do subproduto, já que, as mesmas condições de cultivo foram reproduzidas para os diferentes meios. É visto em literatura que meios com baixa quantidade de nitrogênio geram gomas com baixa consistência e altas taxas de cisalhamento (DREVETON et al., 1994), o que pode ser uma explicação para este caso. Os principais açúcares que constituem o soro ácido de soja são a sacarose, a rafinose e a estaquise. Microrganismos que têm a capacidade de assimilar esses açúcares contam com a presença de duas enzimas, α -galactosidase e invertase, capazes de fazer a hidrólise das ligações dos oligossacarídeos, transformando-os em monossacarídeos ou dissacarídeos (ADEMARK et al., 2001). O microrganismo *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899, é provido de apenas uma dessas enzimas, a α -galactosidase, o que demonstra sua eficácia na quebra de estaquiose e rafinose, porém o microrganismo consegue assimilar a sacarose, mesmo não sintetizando a enzima invertase.

Como pode ser visto na Figura 5C e Tabela 4, a utilização desse subproduto resultou em um pico máximo de apenas $1,44 \text{ g L}^{-1}$ de goma gelana no tempo de 72 h, com uma produtividade de $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A biomassa acumulada teve um pico em 72 h, com $3,5 \text{ g L}^{-1}$,

aproximadamente a metade da biomassa produzida através do meio soro de queijo. Em literatura, quando utilizado bagaço de soja como substrato, se obteve uma quantidade de 7,5 g L⁻¹ de goma gelana, através do microrganismo *Sphingomonas paucimobilis* NK2000, mutante de *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461, em agitador rotacional a 200 rpm e 30 °C, por 48 horas (JIN et al., 2003). Essa diferença na quantidade produzida em literatura através do bagaço de soja, com a quantidade de goma produzida neste trabalho com o soro ácido de soja, pode ser devido, principalmente, à composição do meio, já que ambos são subprodutos com propriedades nutricionais diferentes.

5.2.2. Subprodutos hidrolisados

Levando em consideração a preferência constatada em literatura do microrganismo *Sphingomonas paucimobilis* por meios contendo glicose ou sacarose como fonte de carbono (SUTHERLAND, 2002), os subprodutos industriais soro de queijo e permeado de soro de queijo suplementado com peptona foram hidrolisados através da enzima β -galactosidase. A enzima cliva os dímeros de lactose em glicose e galactose (MATTHEWS, 2005). Os dados obtidos no experimento podem ser analisados na Figura 6.

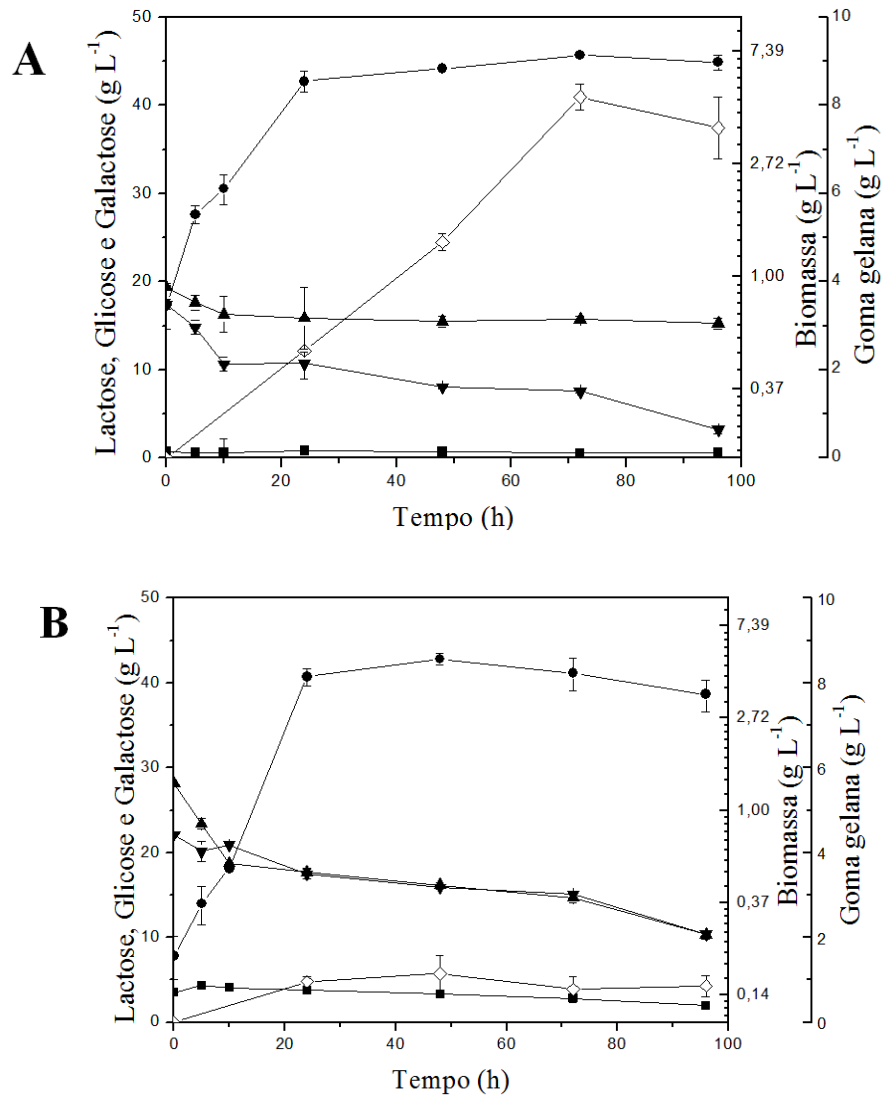


Figura 6. Cinética da produção de goma gelana em cultivos em agitador rotacional em soro de queijo hidrolisado (A), permeado de soro de queijo hidrolisado enriquecido com peptona (B). (■) lactose, (▲) galactose, (▼) glicose, (●) biomassa, (◇) goma gelana.

O soro de queijo hidrolisado teve uma composição de açúcares inicial de $0,75 \text{ g L}^{-1}$ de lactose, $17,39 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e $19,36 \text{ g L}^{-1}$ de galactose, como pode ser visto na Figura 6A. A produção de biomassa foi ligeiramente menor quando comparada ao soro de queijo, sendo produzido um máximo de $8,19 \text{ g L}^{-1}$ em 72 h, enquanto que no soro de queijo sem hidrólise foi de $8,46 \text{ g L}^{-1}$ em 72 h. Conforme verificado na Figura 6A, a bactéria consumiu mais rapidamente a glicose do que a galactose. Muito embora ambos os açúcares tenham sido metabolizados simultaneamente, o fato sugere a preferência pela glicose como anteriormente demonstrado em literatura (SUTHERLAND, 2002). Esse consumo mais lento de galactose pode ser devido à sua entrada na via de metabolização de galactose, Via Leloir, antes da entrada na via glicolítica (KEGG, 2014). Além do mais, uma alta produtividade volumétrica

foi obtida em meio soro de queijo hidrolisado, chegando a um máximo de $0,11 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tabela 4). Dessa forma, fica evidenciado que o soro de queijo apresenta potencial para a utilização neste bioprocessos, não necessitando da etapa prévia de hidrólise, o que acarreta em menos custos associados ao processo.

A produção de goma gelana através do permeado de soro de queijo hidrolisado e suplementado com peptona não obteve resultados significativos que justificassem seu potencial de utilização nesse bioprocessos, conforme pode ser observado na Figura 6B. Uma explicação para a pouca quantidade de goma gelana produzida neste meio remete-se àquela anteriormente discutida em relação ao permeado de soro suplementado, em que a influência de diferentes fontes de nitrogênio, podem estar associados a diferenças na metabolização e produção do biopolímero. Em relação à produção de biomassa, esta foi inferior quando comparada a produção em permeado não hidrolisado, contudo a quantidade de açúcares consumidos foi similar ao do permeado não hidrolisado (60 %). Uma explicação para este fato pode ser devido a um maior consumo dos açúcares para a manutenção celular, e não para a geração de biomassa, visto que este meio é constituído por duas fontes de açúcares diferentes daquela em permeado não hidrolisado, onde as exigências dos transportadores de açúcares (permeases) e do microrganismo podem ser diferentes (CORREIA et al., 2002).

5.2.3. Meios semi-sintéticos

Para comparação dos dados obtidos através do processo de produção de goma gelana em subprodutos industriais, foram realizados testes com meios sintéticos. O conjunto de dados gerados testando os três meios sintéticos, sintético lactose, YPL contendo lactose como fonte de carbono e YPG contendo glicose como fonte de carbono estão apresentados na Figura 7 e detalhadamente no Anexo deste trabalho.

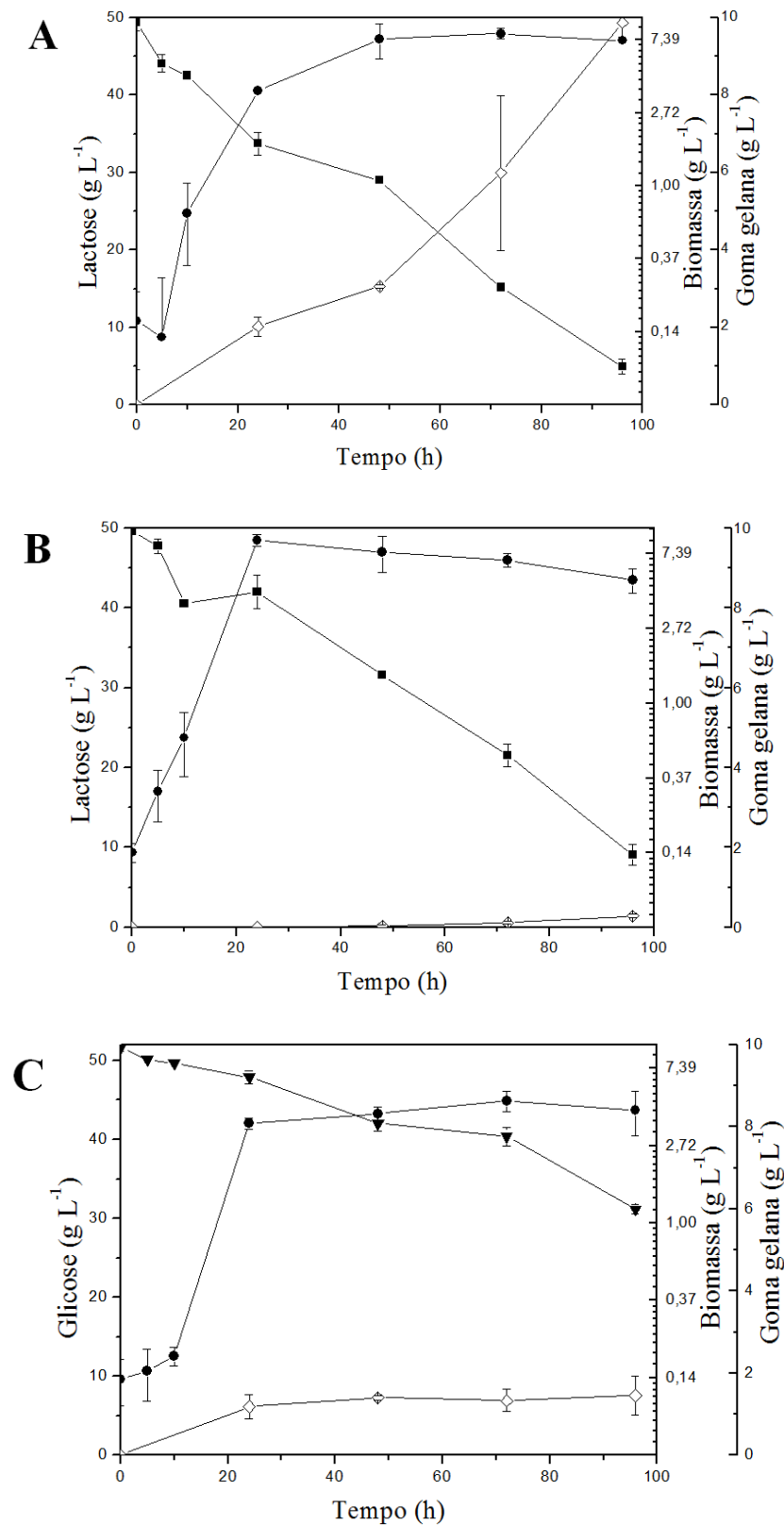


Figura 7. Cinética da produção de goma gelana em meios semi-sintético lactose (A), YPL (B), YPG (C). (■) lactose, (▼) glicose, (●) biomassa, (◇) goma gelana.

O meio semi-sintético lactose contém todos os sais necessários para o crescimento do microrganismo *Sphingomonas paucimobilis* (WANG, 2006). Por esse motivo, aliada a uma

fonte de nitrogênio e a uma fonte de carbono, no caso a lactose, o microrganismo formou uma biomassa máxima de $8,03 \text{ g L}^{-1}$, no tempo de 72 h. A produção de goma gelana em meio semi-sintético lactose não obteve diferença estatística quando comparada à produção em soro de queijo e soro de queijo hidrolisado, chegando a um máximo de $9,87 \text{ g L}^{-1}$ em 96 h, com produtividade volumétrica (Q_p) de $0,10 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, o que é próximo do valor encontrado em literatura, de $10,2 \text{ g L}^{-1}$, para cultivo em agitador rotacional utilizando lactose 30 g L^{-1} como fonte de carbono, a 250 rpm e $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (FIALHO et al., 1999). Autores demonstram que, utilizando o mesmo meio sintético lactose presente neste trabalho, e otimizando um tempo de descanso e um tamanho para o inóculo, é possível chegar a uma produção de $20,0 \text{ g L}^{-1}$ de goma gelana, através da utilização de agitador rotacional a 180 rpm e $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (NAMPOOTHIRI et al, 2003).

Um ponto interessante a observar é a questão da produtividade (Q_p), apesar do meio sintético lactose apresentar uma produção de goma estatisticamente igual à produção do soro de queijo, a produtividade foi menor. O meio sintético obteve uma produtividade de $0,08 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$, enquanto que o soro de queijo obteve uma produtividade de $0,19 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ em 24 h (Anexo 1). Uma explicação para essa diferença de produtividade é em relação aos compostos do meio. Como o soro de queijo é derivado do leite, ele possui proteínas como a α -lactalbumina e a β -lactoglobulina (RICHARDS, 2002), enquanto o meio sintético apenas possui componentes sintéticos. As fontes de, por exemplo, aminoácidos, são diferentes entre os dois meios, fazendo com que o soro de queijo ofereça um conjunto de nutrientes que aumente a produtividade em relação ao meio sintético.

Ambos os meios YPL e YPG não apresentaram produção significativa de goma. Conforme a Figura 7B e 7C, houve crescimento celular, porém, a produção de goma não acompanhou este aumento de biomassa. Como estes são meios utilizados em literatura para crescimento celular (WANG et al., 2006; BAJAJ et al., 2006), um hipótese é a de que nutrientes essenciais para a produção de goma gelana, como, por exemplo, o fósforo, não estejam presentes, ou em quantidades insuficientes, prejudicando as taxas metabólicas de produção. Na literatura, a produção de goma gelana pelo mesmo microrganismo em meio simplificado, contendo glicose como fonte de carbono e em agitador rotacional a 200 rpm e $30 \text{ }^\circ\text{C}$, foi de até $13,67 \text{ g L}^{-1}$. A produção foi maior no meio simplificado porque, apesar do meio ser menos complexo do que os meios comumente utilizados, apresenta adição de sais que contém os elementos necessários para a produção da goma gelana em quantidades suficientes, como nitrogênio e fósforo (WANG et al., 2006).

5.3. Cinética da produção de goma gelana por *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em biorreator

O substrato utilizado como meio de cultivo para o bioprocesso em biorreator foi definido como o soro de queijo devido a este apresentar alta produção de goma gelana em agitador rotacional, e principalmente, por ser um meio de cultivo alternativo e menos oneroso para a condução deste bioprocesso. A Figura 8 apresenta o aspecto do meio soro de queijo, após a formação de goma gelana. Conforme se verifica, o meio de cultivo passou a ter a coloração característica do microrganismo *Sphingomonas paucimobilis*, assim como uma maior resistência à agitação foi observada, devido à formação do gel.



Figura 8. Aspecto do meio soro de queijo após a produção de goma gelana, em 72 h.

A Figura 9 juntamente com a Tabela 5 apresenta os resultados obtidos através do cultivo em biorreator utilizando *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 para produção de goma gelana. A cinética de consumo de açúcar (lactose) em biorreator foi mais rápida quando comparada com os testes em agitador rotacional, restando apenas $3,82 \text{ g L}^{-1}$ em 72 h, enquanto que em agitador rotacional, no mesmo período, foi de $11,70 \text{ g L}^{-1}$. Muito embora o perfil de

produção de goma gelana em biorreator tenha sido similar ao teste em agitador rotacional nas primeiras 24 h, alcançando uma produção de $4,65 \text{ g L}^{-1}$ e uma produtividade volumétrica de $0,19 \text{ g L}^{-1}$, se verificou que a produção de goma gelana em biorreator não aumentou consideravelmente até 72 h, ao passo que em agitador rotacional, um aumento gradual e significativo foi observado. Neste caso, a aeração e a agitação contribuíam para a formação de biomassa, mas não significativamente para a produção de goma gelana. Além disso, uma hipótese é a de que a alta agitação pode estar contribuindo para a degradação do biopolímero, já que a produção em biorreator foi menor, quando comparada à produção em agitador rotacional, com o mesmo substrato.

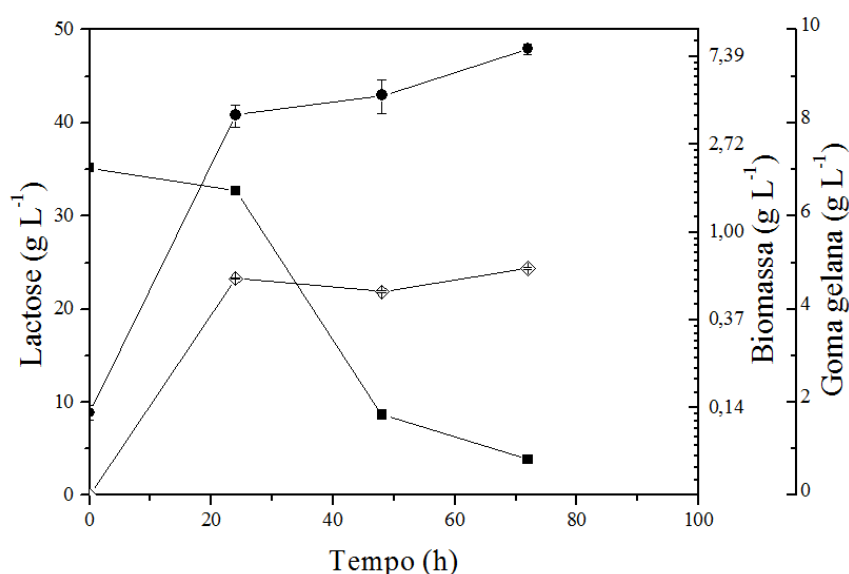


Figura 9. Cinética da produção de goma gelana em soro de queijo através de biorreator. (■) lactose, (●) biomassa, (◇) goma gelana.

Apesar de aparentemente a goma produzida estar em grande quantidade após o processo de precipitação, essa observação foi refutada. Com a mudança das condições, a estrutura da goma gelana hipoteticamente pode ter sido alterada. Apesar disso, uma evidência de que, otimizando as condições de cultivo o biorreator seja uma opção interessante, é devido ao microrganismo ser aeróbico, já que em condições aumentadas de aeração e agitação ocorrem diferenças na produção e aspecto da goma gelana (GIAVASIS et al., 2006).

Tabela 5. Consumo de lactose, concentração de biomassa, produção de goma gelana e produtividade volumétrica em biorreator operado a 30 °C, 400 rpm, 2 vvm.

Tempo (h)	Lactose (g L⁻¹)	Biomassa (g L⁻¹)	Goma gelana (g L⁻¹)	Q_p
0	35,19	0,13		
24	32,71	3,78	4,65	0,19
48	8,65	4,73	4,37	0,09
72	3,82	8,01	4,87	0,06

5.4. Aspecto e viscosidade da goma gelana produzida por *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899

Após os testes de quantificação da produção de goma gelana, os substratos com melhor produtividade, soro de queijo e sintético lactose, em agitador rotacional, e soro de queijo, em biorreator, tiveram a goma analisada por viscosímetro. Como a estrutura de EPS tende a mudar conforme os componentes do meio e as condições de cultivo em que o microrganismo é submetido (MARGARITIS et al., 1985; DREVETON et al., 1994), as diferenças quanto ao aspecto visual das gomas produzidas pode ser observadas na Figura 10. A composição do soro de queijo é diferenciada do meio sintético, já que o soro apresenta nutrientes advindos do leite, enquanto o meio sintético apresenta proteínas presentes no extrato de levedura e na peptona. Essas diferenças envolvendo composição e condições do meio de cultivo podem ter provocado mudanças na estrutura da goma gelana. A goma produzida por meio sintético lactose é representada pela Figura 10A. Com a análise visual se verificou que se trata de uma goma fibrosa e firme, diferente das demais. A Figura 10B demonstra a goma gelana produzida por soro de queijo em agitador rotacional, que apresenta uma coloração mais clara, quando comparada à goma do meio sintético. Já a goma produzida por soro de queijo em biorreator, Figura 9C, aparentemente foi menos densa que as demais.

A análise da viscosidade demonstrou uma maior viscosidade da goma gelana produzida por soro de queijo em agitador rotacional, similar à viscosidade do meio sintético lactose. Em literatura sabe-se que a goma produzida por meio soro de queijo em agitador rotacional nas condições de 250 rpm e 30 °C é mais viscosa, quando comparada à produzida através de meios sintéticos contendo fonte de carbono lactose ou glicose (FIALHO et al., 1999). A goma produzida através de soro de queijo em biorreator, como observado

visualmente, obteve menores valores de viscosidade. Valores medidos nos diferentes meios podem ser observados na Tabela 6.

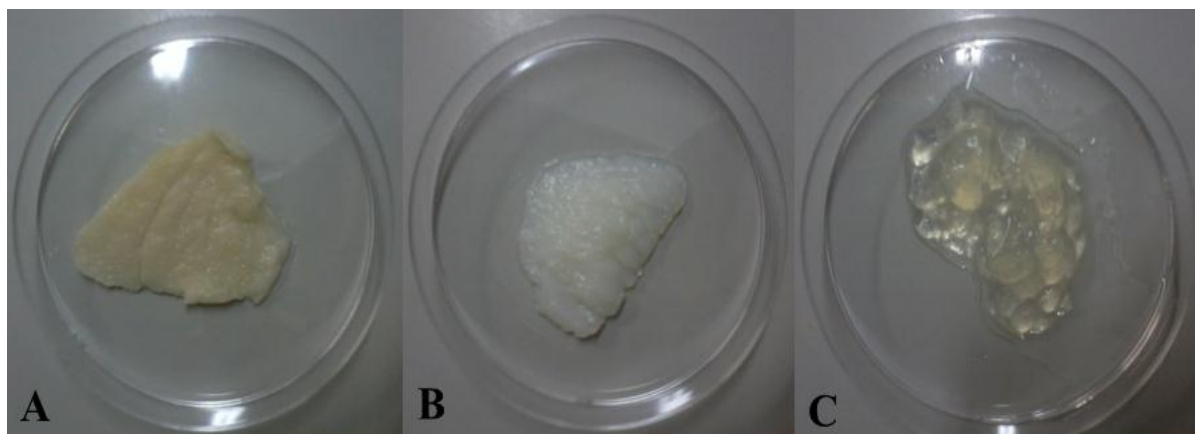


Figura 10. Aspecto da goma gelana produzida através de (A) meio sintético lactose, (B) soro de queijo em agitador rotacional, (C) soro de queijo em biorreator.

Tabela 6. Viscosidades nos diferentes meios de cultivo: Sintético lactose (SL), soro de queijo em agitador rotacional (SQ) e soro de queijo em biorreator (SQB).

Meio de cultivo	Concentração (g L ⁻¹)	Tempo (s)	Viscosidade específica (Pa·s)
SL	30	30,24	2,60
SQ	30	31,32	2,69
SQB	30	20,46	1,76

Uma explicação para a menor viscosidade da goma a partir de soro de queijo em biorreator é em questão da maior aeração e agitação mecânica a que o bioprocesso foi submetido. Sabe-se que através de cultivos em biorreator altas taxas de aeração combinada com agitação vigorosa aumentam o crescimento de *Sphingomonas paucimobilis* (GIAVASIS et al., 2006), porém, pode-se constatar que não necessariamente esse aumento de biomassa leva a um aumento da produção de goma, e, também, que essa goma pode não ser tão viscosa quanto a produzida em agitador rotacional. Para que se chegue a um bioprocessos com alta produtividade, e, ao mesmo tempo, alta qualidade da goma gerada, são necessários estudos visando a otimização do processo.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho resultou nas seguintes conclusões:

- Os substratos utilizados no processo e a fonte de açúcar influenciaram a produção da goma. Entre os subprodutos, o substrato que conferiu maior produtividade foi o soro de queijo, enquanto que nos meios semi-sintéticos foi o semi-sintético lactose.
- Os subprodutos hidrolisados não mostraram diferença estatística em relação à produção de goma dos subprodutos não hidrolisados, o que demonstra que a etapa de hidrólise pode ser dispensada, diminuindo os custos do processo.
- O soro de queijo mostrou-se um potencial substrato alternativo para utilização neste bioprocessos.
- As condições de cultivo, como a aeração e a agitação, e a composição do meio influenciam tanto na produção quanto nas propriedades da goma gelada.
- A goma gelada produzida a partir de soro de queijo em biorreator apresentou menor viscosidade quando comparada a goma gerada a partir do meio semi-sintético lactose e do soro de queijo em agitador rotacional.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEMARK, P.; LARSSOM, M.; TJERNELD, F.; STALBRAND, H. Multiple α -galactosidases from *Aspergillus niger*: purification, characterization and substrate specificities. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 441-448, 2001.

ALESSI, M.C.M. **Avaliação da hidrólise alcalina da gordura sobre a biodegradação anaeróbia de soro de queijo**. Tese (Mestrado em Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

ALMEIDA, E. S. **Tratamento do efluente da indústria de queijos por processos biológicos e químicos**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2004.

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J.F.P. Influência da adição da fécula de batata-doce sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 249-253, 2002.

BAE, S.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1366-1371, 2004.

BAJAJ, I. B.; SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S.; PANDEY, A. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 150-156, 2006.

BAJAJ, I. B.; SURVASE, A.; SAUDAGAR, S.; SINGHAL, R. Gellan Gum: Fermentative, production, downstream, processing and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 341-354, 2007.

BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; RUVEN, G. S. Desmineralização do soro de leite através da eletrodialise. In: **Seminário do programa de pós-graduação em Engenharia Química**, 2009, Porto Alegre. Anais.VIII Oktoberforum – PPGEQ, 2009.

BALKWILL, D. L.; FREDRICKSON, J. K.; ROMINE, M. F. **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**. 7. ed. New York, Estados Unidos: Springer, 2006. p. 605-629.

BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysaccharide production by *Beijerinckia* cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 1201-1209, 2004.

BRAILE, P.M; CAVALCANTI, J.E.W.A. **Manual de tratamento de águas residuárias industriais**. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1979.

CNI. **Avanços da indústria brasileira rumo ao desenvolvimento sustentável: síntese dos fascículos setoriais**. Confederação Nacional da Indústria, Brasília, 2012.

COLE, K.D. Reversible gels for electrophoresis and isolation of DNA. **Biotechniques**, v. 26, n. 4, p. 748-756, 1999.

CORREIA, I. S.; FIALHO, A. M.; VIDEIRA, P.; MOREIRA, L.M.; MARQUES, A.R.; ALBANO H. Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: Genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 170-76, 2002.

DREVETON, E.; FREDERIC, M.; JACQUELINE, L.; DANIEL, B.; LIONEN, C. Effect of mixing and mass transfer conditions on gellan production by *Auromonas elodea*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.77, n. 6, p. 642–649, 1994.

DREVETON, E.; MONOT, F.; LACOURTIER, J.; BALLERINI, D.; CHOPLIN, L. Influence of fermentation hydrodynamics on gellan gum physico-chemical characteristics. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, n. 3, p. 272–276, 1996.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HALMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substance. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

DURAN, E.; COSTELL, E.; IZQUIERDO, L.; DURAN, L. Low sugar bakery jams with gellan gum-guar gum mixture, influence of compositions on texture. **Food Hydrocolloids**, v. 8, n. 3, p. 373–381, 1994.

EI-KHAIR, A. A. A. Formulation of MilkPermeate for Utilization as Electrolyte Beverages. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 2, p. 572-578, 2009.

EL-GOHARY, F. A.; ABO-ELELA, S. I. Management of waste water from soap and food industries: A case study. **Science of the Total Environmental**, v. 66, p.203-212, 1987.

FIALHO, A.; MARTINS, L.; DONVAL, M.; LEITAO, J.; RIDOUT, M.; JAY, A.; MORRIS, V.; 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 Environtal Microbiology**, v.65, n. 6, p. 2485–2491, 1999.

FRANCOIS, P.; ANDRE, M.; PIERRE, M. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. **BiotechnologyAdvances**, v. 4, n. 2, p. 245–259, 1986.

GABARDO, S. **Produção de goma xantana através do aproveitamento de soro de queijo**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2009.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Gellangum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 177-211, 2000.

GUIMARÃES, P.M.R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **BiotechnologyAdvances**, v.28, p.375–384, 2010.

IKE-UNOR, U.O.; OFOEFULE, S.I.; CHUKWU, A. Evaluation of gellan gum as a potential pharmaceutical adjuvant: Binding properties in tablets containing a poorly water soluble and

poorly compressible drug. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 16, n. 5, p. 397-401, 2006.

INTERPROSCAN. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/interpro/protein/D5VGN7/similar-proteins;jsessionid=BD7E8E5B17EF9A8A8A8093A342C8E633>>. Acesso em: 06 mai 2014.

JIN, H.; LEE, N. K.; SHIN, M. K.; KIM, S. K.; KAPLAN, D. L.; LEE, J. W. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soy bean pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 357-360, 2003.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDES, D.A, SKARACIS, G.N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 249-256, 2003.

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

KEGG. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?swi01100+Swit_0977>. Acesso em: 09 jun 2014.

KELCO. Disponível em: <<http://cpkelco.com/products/gellan-gum>>. Acesso em: 03 mai 2014.

LeBLANC, J.G; SILVESTRONI, A.; CONNES, C.; JUILLARD, V.; DE GIORI, G.S; PIARD, J.G; SESMA, F. Reduction of non-digestible oligosaccharides in soymilk: application of engineered lactic acid bacteria that produce α -galactosidase. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, p. 432-440, 2004.

LIMA, G. J. M.; MANZKE, N.E.; TAVERNARI, F.C.; KLEIN, C. H.; COSTA, O. A. D. Uso de permeado spray-dried (PERLAC 850®) produzido a partir de soro de leite doce em substituição ao soro de leite e à lactose pura em dietas de leitões recém-desmamados. **Comunicado Técnico 507, ISSN nº 0100-8862**, Versão eletrônica, Dezembro, 2012, Concórdia, SC.

LOBAS, D.; SCHUMPE, S.; DECKWER, W. D. The production of gellan exopolysaccharide with *Sphingomonas paucimobilis* E2 (DSM 6314). **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 411-415, 1992.

MAPA/SPA – Secretaria de Política Agrícola. **Sumário Executivo: Complexo Leite**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 7 p. 2010.

MARGARITIS, A.; PACE, G.W. Microbial Polysaccharides. In: **Advances in Biotechnology**, v. 2, Toronto, Canadá: Pergamon Press, 1985. p. 1005-1044.

MARTINS, L.O.; SÁ-CORREIA, I. Gellan gum biosynthetic enzymes in producing and non producing variants of *Pseudomonas elodea*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 14, p. 357-364, 1991.

MARTINS, L.O.; SÁ-CORREIA, I. Temperature profile of gellan gum synthesis and activities of biosynthetic enzymes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 385–395, 1993.

MATTHEWS, B.W. The structure of E. coli beta-galactosidase. **Comptes Rendus Biologies**, v. 328, n. 6, p. 549–56, 2005.

MENDES, A.A; PEREIRA, E.B; CASTRO, H.F. Biodegradação de águas residuárias de laticínios previamente tratados por lipases. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 2, p. 143-149, 2006.

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação do biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv. pruni**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, 2002.

MOREIRA, A.N.; DEL PINO, F.A.B.; VENDRUSCOLO, C.T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através de inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 300-305, 2003.

NAMPOOTHIRI, K.M.; SINGHANIA, R.R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1513–1519, 2003.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C₇L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, 2001.

O'NEILL, M.A.; SILVENDRAN, R.R.; MORRIS, J. Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydrate Research**, v. 124, n. 1, p. 123–133, 1983.

OLIVEIRA, J. T.; MARTINS, L.; PICCIOCHI, R.; MALAFAYA, P. B.; SOUSA, R. A.; NEVES, N. M.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Gellan gum: a new biomaterial for cartilage tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 93, n. 3, p. 852-863, 2010.

PESSIN, L.C. **Serviço de Inspeção Federal (SIF)**. Comunicação pessoal, 2008.

POLLOCK, J.T. Sphingian Group of Exopolysaccharides (EPS). In: **Biopolymer**, v. 5, Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH Verlag, 2002. p. 239–257.

PONSANO, E.G; CASTRO-GÓMES, R.J.H. Fermentação de soro de queijo por *Kluyveromyces fragilis* como uma alternativa para redução de sua capacidade poluente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n. 1, p. 170-173, 1995.

PORTO, L. M.; SANTOS, R. D.; MIANDA, T.L. Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção da ricota. **Boletim CEPPA (UFPR)**, v. 23, n. 1, p. 173-182, 2005.

RAMOS, L. P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. In: **Seminário Nacional sobre Reuso de Resíduos Sólidos**, 2000, São Paulo.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro Lácteo: Perspectivas Industriais e Proteção ao Meio Ambiente. **FoodIngredients**, v. 3, n. 17, p. 20-27, 2002.

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

SILVA, T. B. C.; ANDRADE, T. C. S. Gerenciamento de Resíduos - Aspectos Técnicos e Legais. **Revista Meio Ambiente Industrial**, n.29, 2001.

SIQUEIRA, K. B.; CARNEIRO, A.V.; ALMEIDA, M.F.; SOUZA, R. C. S. N. P. O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial. **Circular Técnica Embrapa**, 104. Juiz de Fora, MG. 12 p., 2012.

SOY PROTEIN COUNCIL. **Soy protein products**: characteristics, nutritional aspects and utilization. 1987

SUTHERLAND, I. A sticky business: microbial polysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, v. 29, p. 70-71, 2002.

SUTHERLAND, I. W.; TAIT, M. I. Biopolymers. **Encyclopedia of Microbiology**. v. 1, 1992.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

TRINDADE, M.C. **Estudo da recuperação de ácido láctico proveniente do soro do queijo pela técnica de membranas líquidas surfactantes**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Escola de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

VARTAK, N.B.; LIN, C.C.; CLEARY, J.M.; FAGAN, M.J.; SAIER, M.H. Glucose metabolism in *Sphingomonas elodea*: Pathway engineering via construction of a glucose-6-phosphate dehydrogenase insertion mutant. **Microbiology**, v. 141, n. 9, p. 2339-2350, 1995.

VENETSANEAS, N.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; KORNAROS, M.; LYBERATOS, G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 15, p. 3713-3717, 2009.

WANG, X.; XU, P.; YUAN, Y.; LIU, C.; ZHANG, D.; YANG, Z.; YANG, C.; MA, C. Modeling for Gellan Gum Production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 in a Simplified Medium. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3367-3374, 2006.

WATARU, K.; SHOZO, M.; ATTWOOD, D. Oral sustained delivery of paracetamol from in situ-gelling gellan and sodium alginate formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 258, n. 1, p. 55–64, 2003.

WEBER, T. P. **Fermentação de soro ácido de soja com o microrganismo *Bacillus thermophilus***. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2008.

WENRONG, S.; GRIFFITHS, M.W. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 17–25, 2000.

WEST, T. P. Effect of temperature on bacterial gellan production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 649–652, 2003.

WEST, T. P. Effect of temperature on bacterial gellan production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 649–652, 2003.

WOICIECHOWSKI, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de Goma Xantana a partir de resíduos das Agroindústrias do café e da mandioca**. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2001

YABUUCHI, E.I.; YANO, H.; OYAIZU, Y.T.; HASHIMOTO, E.; 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**, v. 34, n. 2, p. 99–119, 1990.

ZHU, G.; SHENG, L.; TONG, Q. A new strategy to enhance gellan production by two-stage culture in *Sphingomonas paucimobilis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 829–834, 2013.

ANEXO

Tabela 1. Consumo de açúcar, produção de biomassa e de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) para cultivo de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em soro de queijo, em agitador rotacional a 30 °C, 250 rpm.

Tempo (h)	Açúcar (g L⁻¹)	Biomassa (g L⁻¹)	Goma gelana (g L⁻¹)	Q_p (g L⁻¹ h⁻¹)
Lactose				
0	30,43	1,29		
5	31,67	2,43		
10	30,41	3,10		
24	26,76	6,79	4,62	0,19
48	17,66	8,42	5,89	0,12
72	11,70	7,72	8,46	0,12
96	6,67	7,17	7,97	0,08

Tabela 2. Consumo de açúcar, produção de biomassa e de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) para cultivo de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em permeado de soro de queijo suplementado com peptona, em agitador rotacional a 30 °C, 250 rpm.

Tempo (h)	Açúcar (g L⁻¹)	Biomassa (g L⁻¹)	Goma gelana (g L⁻¹)	Q_p (g L⁻¹ h⁻¹)
Lactose				
0	38,97	0,39		
5	37,34	0,57		
10	37,86	0,70		
24	38,70	7,41	0,62	0,03
48	29,85	8,61	0,77	0,02
72	27,68	3,26	0,99	0,01
96	21,60	3,29	0,92	0,01

Tabela 3. Consumo de açúcar, produção de biomassa e de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) para cultivo de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em soro ácido de soja, em agitador rotacional a 30 °C, 250 rpm.

Tempo (h)	Açúcar (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)	Goma gelana (g L ⁻¹)	Q_p (g L ⁻¹ h ⁻¹)
0	36,74	0,12		
5	36,49	0,38		
10	27,83	0,69		
24	20,57	2,54	1,12	0,05
48	12,61	3,35	1,43	0,03
72	8,30	3,59	1,24	0,02
96	6,95	3,09	0,86	0,01

Tabela 4. Consumo de açúcar, produção de biomassa e de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) para cultivo de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em soro de queijo hidrolisado, em agitador rotacional a 30 °C, 250 rpm.

Tempo (h)	Açúcar (g L ⁻¹)			Biomassa (g L ⁻¹)	Goma gelana (g L ⁻¹)	Q_p (g L ⁻¹ h ⁻¹)
	Lactose	Glicose	Galactose			
0	0,75	17,39	19,36	0,77		
5	0,61	14,80	17,59	1,73		
10	0,60	10,62	16,29	2,18		
24	0,82	10,70	15,85	5,65	2,43	0,10
48	0,70	8,01	15,44	6,34	4,89	0,10
72	0,55	7,56	15,69	7,15	8,19	0,11
96	0,64	3,18	15,26	6,71	7,49	0,08

Tabela 5. Consumo de açúcar, produção de biomassa e de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) para cultivo de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em permeado de soro de queijo hidrolisado, em agitador rotacional a 30 °C, 250 rpm.

Tempo (h)	Açúcar (g L ⁻¹)			Biomassa (g L ⁻¹)	Goma gelana (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)
	Lactose	Glicose	Galactose			
0	3,49	22,08	28,23	0,20		
5	4,32	20,16	23,39	0,36		
10	4,04	20,93	18,75	0,53		
24	3,76	17,44	17,68	4,26	0,95	0,04
48	3,33	15,88	16,19	5,16	1,14	0,02
72	2,79	15,08	14,68	4,43	0,77	0,01
96	1,94	10,36	10,34	3,51	0,85	0,01

Tabela 6. Consumo de açúcar, produção de biomassa e de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) para cultivo de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em meio sintético lactose, em agitador rotacional a 30 °C, 250 rpm.

Tempo (h)	Açúcar (g L ⁻¹)			Biomassa (g L ⁻¹)	Goma gelana (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)
	Lactose					
0	49,38			0,05		
5	44,07			0,12		
10	42,54			0,68		
24	33,74			3,67	2,01	0,08
48	28,96			7,45	3,05	0,06
72	15,16			8,03	5,99	0,08
96	4,92			7,31	9,87	0,10

Tabela 7. Consumo de açúcar, produção de biomassa e de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) para cultivo de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em YPL, em agitador rotacional a 30 °C, 250 rpm.

Tempo (h)	Açúcar (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)	Goma gelana (g L ⁻¹)	Q_p (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Lactose				
0	49,62	0,03		
5	47,71	0,30		
10	40,55	0,62		
24	42,01	8,83	0,00	0,0000
48	31,54	7,53	0,02	0,0008
72	21,50	6,78	0,02	0,0004
96	9,08	6,78	0,03	0,0004

Tabela 8. Consumo de açúcar, produção de biomassa e de goma gelana e produtividade volumétrica (Q_p) para cultivo de *Sphingomonas paucimobilis* CCT 1899 em YPG, em agitador rotacional a 30 °C, 250 rpm.

Tempo (h)	Açúcar (g L ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)	Goma gelana (g L ⁻¹)	Q_p (g L ⁻¹ h ⁻¹)
Glicose				
0	51,71	0,03		
5	50,13	0,04		
10	49,64	0,07		
24	47,90	3,61	1,18	0,05
48	42,07	4,11	1,40	0,03
72	40,41	4,84	1,32	0,02
96	31,16	4,28	1,45	0,01