

# INFLUÊNCIA DO pH, ADIÇÃO DE SAIS E TEMPERATURA NA VISCOSIDADE DOS BIOPOLÍMEROS PRODUZIDOS POR *Beijerinckia* sp. 7070 E UR4

INFLUENCE OF pH, ADDITION OF SALTS AND TEMPERATURE IN THE VISCOSITY OF BIOPOLYMERS PRODUCED BY *Beijerinckia* sp. 7070 AND UR4

PINTO, Ellen P.<sup>1</sup>; MOREIRA, Angelita<sup>2</sup>; VENDRUSCOLO, Claire T.<sup>3</sup>

## RESUMO

Os biopolímeros vêm sendo estudados com visível interesse por suas propriedades reológicas, sendo muito utilizados na indústria de alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biopolímero, fibra longa e curta, de duas cepas de *Beijerinckia* sp. 7070 e UR4, a composição química e viscosidade destes, bem como, a influência da temperatura, de diferentes pH e da adição de sais nas soluções aquosas dos biopolímeros. O biopolímero foi obtido através de fermentação aeróbica, em batelada, em incubador agitador. As condições foram: 24°C, 180 rpm por 34 horas. O meio fermentado foi centrifugado para remoção das células. O biopolímero foi seco e após triturado. Para medida da viscosidade, as amostras foram diluídas a 1% (m/v) em água deionizada, adicionada KCl e CaCO<sub>3</sub> nas concentrações de 0,1 e 1,0 %, corrigindo-se o pH para 3,0; 5,0 e 7,0. Os valores foram determinados em viscosímetro rotacional Brookfield (modelo LV) a 25 e 65°C, a 6, 12, 30 e 60 rpm. Os resultados mostraram que a cepa 7070 no tempo de fermentação de 34 horas apresentou maior produção. Na análise cromatográfica ambas as cepas apresentaram os mesmos componentes para fibra longa: fucose, glicose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico. A solução a 1% (m/v) do biopolímero de *Beijerinckia* sp. 7070 por ser ácida, apresentou pH 6,5 à 25°C. A correção do pH para 7,0 e 3,0 diminuiu a viscosidade da solução, enquanto que em pH 5,0 a viscosidade não foi alterada. Com o aumento da temperatura houve uma redução da viscosidade para todos os tratamentos.

Palavras-chave: *Beijerinckia* sp, biopolímero, viscosidade

## INTRODUÇÃO

Os biopolímeros vêm sendo estudados com visível interesse por suas propriedades reológicas, que em muitos casos superam as características funcionais dos polissacarídeos de origem vegetal (SANDERSON & CLARK, 1983; RINAUDO, 1993). Em geral, suas soluções mantêm a

viscosidade em ampla faixa de pH e temperatura. Devido, fundamentalmente, a essas propriedades singulares, os biopolímeros têm um alto potencial de aplicação em vários segmentos industriais. Alguns são amplamente utilizados como espessantes, geleificantes, estabilizantes e, em alguns casos, como emulsificantes e como colóides protetores.

A produção de biopolímeros para uso comercial por fermentação, comparada com a extração de gomas de plantas superiores e algas, bem como a síntese química, oferece várias vantagens potenciais que incluem: a ampla diversidade de polímeros produzidos pelos microrganismos; a produção de gomas, em quantidade e com alta qualidade, relativamente independente das condições climáticas, conduzidas por fermentações bem controladas e utilizando matéria-prima de qualidade constante; a manipulação da composição do produto e suas propriedades através de alterações nas condições de fermentações (PACE, 1980).

As bactérias do gênero *Beijerinckia* apresentam-se, morfológicamente como bastonetes gram negativos, uni ou bicelulares, essencialmente aeróbios. Algumas bactérias deste gênero são capazes de produzir polissacarídeo extracelular de elevado peso molecular que, por suas propriedades físico-químicas, são capazes de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso mesmo em baixas concentrações. As bactérias pertencentes a este gênero distribuem-se em solos de zona tropical e, em menor quantidade, em zonas subtropicais. No Brasil, foram encontradas em solos canavieiros (DOBEREINER, 1959). Novas cepas destas bactérias produtoras de biopolímero estão sendo isoladas e estudadas. Recentemente, foram isoladas de solos arrozeiros (MACHADO et al., 1999). A literatura mostra que os biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* podem ser de fibras longas ou curtas, havendo

<sup>1</sup> Bach. em Química de Alimentos, Lab. de Polímeros, Centro de Biotecnologia - UFPel Cx. P. 354, 96010-900, Pelotas, RS.

<sup>2</sup> Doutora em Biotecnologia, Lab. de Polímeros, Centro de Biotecnologia - UFPel Cx. P. 354, 96010-900, Pelotas, RS.

<sup>3</sup> Professora Dra. Departamento de Ciências dos Alimentos UFPel Cx. P. 354, 96010-900, Pelotas, RS. Tel: (0xx53) 275-7350  
E-mail: claire@ufpel.tche.br. Autor para Correspondência

(Recebido para publicação em 27/05/2002)

diferença entre eles quanto a composição e comportamento reológico (PADILHA, 1997).

De outra parte, a adição de sais em soluções aquosas de biopolímeros tem influência sobre a viscosidade destes. Os diferentes sais e concentrações empregadas podem modificar as características reológicas dos biopolímeros. VENDRUSCOLO (1995), constatou que a temperatura de fermentação influi na viscosidade aparente das soluções aquosas do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp..

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biopolímeros, de fibra longa e curta, de duas cepas de *Beijerinckia* sp. 7070 e UR4, a identificação de açúcares e derivados e viscosidade destes, bem como, a influência da temperatura, diferentes pH e adição de sais nas soluções aquosas dos biopolímeros.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Microrganismos

Utilizou-se cepas de bactérias pertencentes ao gênero *Beijerinckia*, denominadas de 7070 e UR4, isoladas respectivamente, a partir de amostras de solo canavieiro do município de Ribeirão Preto, estado de São Paulo (VENDRUSCOLO, 1995) e de solo de cultura de arroz irrigado em Uruguaiana, no estado do Rio Grande do Sul (MACHADO et al., 1999).

As culturas de bactérias foram mantidas liofilizadas e repicadas a cada 30 dias em meio ágar YM (Yeast Malt) com a seguinte composição em g.L<sup>-1</sup>: extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0 e ágar-ágar 25,0 (JEANES, 1974). As placas foram armazenadas sob refrigeração a 4°C.

### Inóculo

As culturas foram incubadas em placas a 24°C por 24 horas, em estufa. A partir dessas culturas, foi preparado uma suspensão bacteriana em meio YM líquido (JEANES, 1974) contendo 3.10<sup>10</sup> UFC/mL, que serviu como inóculo para a fermentação. Esta foi realizada em erlenmeyer de 500mL, com 200mL de meio de produção contendo em g.L<sup>-1</sup>: (1) 2,0 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,7 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 13,62 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; (2) 0,2 extrato de levedura; 2,0 triptose e (3) 50,0 sacarose (VENDRUSCOLO, 1995), inoculados com 2mL da suspensão bacteriana, perfazendo uma concentração de 6.10<sup>8</sup> UFC/mL.

### Produção e Recuperação dos Biopolímeros

A metodologia utilizada foi a recomendada por BECKING (1961), modificada por PADILHA (1997). A fermentação aeróbica foi realizada em incubador agitador marca New Brunswick Scientific Co., modelo Innova 4230 (Shaker), nas condições de 24°C, agitação de 180 rpm, por 34 horas. Após este período, o meio fermentado foi centrifugado para a remoção das células. O biopolímero foi recuperado do sobrenadante com etanol a 95% na proporção de 1:4 (v/v). As fibras longas foram separadas das fibras curtas através de peneira. As fibras curtas foram recolhidas após decantação. Os biopolímeros foram secos em estufa a 56°C até atingirem peso constante; após, foram triturados em moinho de discos e então armazenados a temperatura ambiente.

### Viscosidade

Para medida da viscosidade, as amostras foram diluídas em água deionizada (1% m/v) e os valores determinados em viscosímetro rotacional Brookfield (modelo LV) a 25°C, 45°C e

65°C a pH 6,5, nas taxas de deformação correspondentes às velocidades de 6, 12, 30 e 60 rpm.

Testou-se também a influência da adição de sais, nas soluções aquosas de biopolímero (KCl e CaCO<sub>3</sub>) nas concentrações de 0,1 e 1,0 %, corrigindo-se o pH para 3,0; 5,0 e 7,0, na temperatura de 25°C e 65°C. Os biopolímeros foram acrescentados às soluções salinas e estas foram agitadas até homogeneização e logo após submetidas a aquecimento a 80°C por 5 minutos. Após 24 horas, mediu-se a viscosidade. A cada medida foi corrigido o pH das soluções. Realizou-se triplicata de todas as amostras.

### Análise Cromatográfica

Os biopolímeros foram hidrolisados, em tubo selado, com HCl 2N [3:100 (m/v)] a 80°C por 16 horas, para identificação dos açúcares e derivados, que foi realizada através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), feita em sílica gel 60 F254 (Merck), onde o eluente empregado foi: clorofórmio: metanol: ácido acético: água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Para revelação utilizou-se o reagente anilzaldeído sulfúrico e aquecimento com pistola até 200°C, seguindo-se de visualização sob luz ultravioleta a 366nm. A identificação dos constituintes foi feita comparando-os com os padrões de análise: fucose, ácido glicurônico, galactose, glicose, ácido galacturônico, segundo MOREIRA et al. (1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção

Os resultados mostraram que a cepa 7070 no tempo de fermentação de 34 horas apresentou maior produção 9,0 g.L<sup>-1</sup> e 5,8 g.L<sup>-1</sup> para fibras longas e curtas, respectivamente, do que a cepa UR4, que apresentou 4,2 g.L<sup>-1</sup> para fibras longas e 2,7g.L<sup>-1</sup> para fibras curtas.

### Identificação dos açúcares e derivados

Na análise cromatográfica ambas as cepas apresentaram os mesmos componentes para fibra longa: fucose, glicose, galactose, ácido glicurônico e ácido galacturônico. Na cepa UR4, no biopolímero fibra curta não foi detectada resíduos de galactose. Os biopolímeros que produziram soluções mais viscosas apresentaram maior teor de galactose e fucose e os menos viscosos maior teor de glicose (Figura 1).

### Viscosidade

As soluções dos biopolímeros de fibras longas de ambas as cepas apresentaram viscosidade mais elevada do que os de fibras curtas. Os biopolímeros produzidos pela cepa 7070, entretanto, apresentaram maior viscosidade (Tabela 1). Com base nos resultados de produção e viscosidade aparente escolheu-se a cepa 7070, fibra longa para dar prosseguimento aos estudos.

A partir das análises observou-se que somente a cepa 7070 fibra longa, à 25°C e 65°C, apresentou comportamento pseudoplástico, isto é, diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação. Os demais biopolímeros apresentaram comportamento newtoniano, isto é, mantiveram a viscosidade frente ao aumento da taxa de deformação. Este comportamento, em geral, não é interessante sob o ponto de vista de produção industrial. Todos os biopolímeros diminuíram a viscosidade com o aumento de temperatura.

A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação e temperatura é uma característica comum aos biopolímeros bacterianos.

BEYER et al. (1987), observaram que em soluções a 1% do polissacarídeo produzido por *Rizobium* CB744 medidas a 25 e 65°C, houve um decréscimo da viscosidade com a taxa de deformação e temperatura.

VENDRUSCOLO (1995) estudou o comportamento reológico das soluções aquosas a 6% do biopolímero

*Beijerinckia* 7070, produzido por fermentação com Meio VIII contendo 5% de sacarose, medido nas temperaturas de 25°C, 45°C e 65°C. Verificou que a viscosidade é dependente da temperatura e que decresce com o aumento desta, porém, o biopolímero recupera as suas características reológicas quando a viscosidade é medida novamente na temperatura inicial, no caso 25°C. Neste trabalho esta característica também foi observada, ou seja, a estrutura do polissacarídeo não é afetada irreversivelmente pela temperatura.

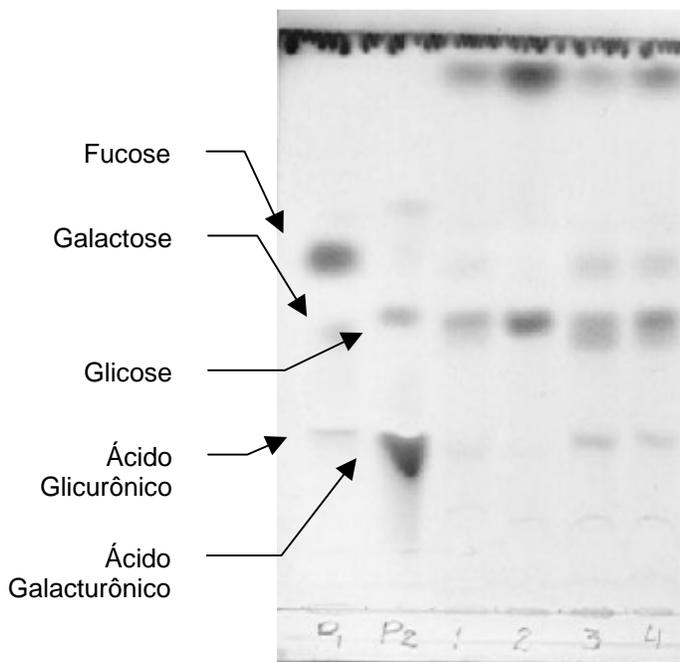


Figura 1 - Análise cromatográfica comparativa (CCDC): (P1) fucose, galactose e ácido glicurônico; (P2) glicose e ácido galacturônico com os biopolímeros das cepas (1)UR4 FL 34h, (2)UR4 FC 34h, (3)7070 FL 34h, (4)7070 FC 34h. Sistema clorofórmio: metanol: ácido acético: água 40:40:10:10 (v/v/v/v) e gel de sílica 60; revelador anizaldeído sulfúrico.

Tabela 1 - Viscosidade aparente de soluções aquosas de biopolímeros 1% (m/v) de duas cepas de *Beijerinckia*, 7070 e UR4, à 25°C, 45°C e 65°C, com tempo de fermentação de 34 horas, determinada em viscosímetro rotacional Brookfield (modelo LV).

Temperatura (°C)	Tipo de Fibra	Cepa	Viscosidade (mPas)			
			6rpm	12rpm	30rpm	60rpm
25	longa	7070	175,0	150,0	140,0	110,0
		UR4	75,0	75,0	75,0	70,0
	curta	7070	100,0	100,0	105,0	95,0
		UR4	-	-	5,0	5,0
45	longa	7070	50,0	50,0	50,0	50,0
		UR4	-	20,0	20,0	20,0
	curta	7070	50,0	50,0	50,0	50,0
		UR4	-	-	-	2,5
65	longa	7070	50,0	37,5	25,0	25,0
		UR4	-	12,5	15,0	15,0
	curta	7070	-	12,5	15,0	15,5
		UR4	-	-	-	2,5

-Sem leitura.

### Efeito do pH e sais sobre a viscosidade

A solução a 1% (m/v) do biopolímero de *Beijerinckia* sp. 7070 por ser ácida, apresentou pH 6,5 à 25°C. A correção do pH para 7,0 e 3,0 diminuiu a viscosidade da solução, enquanto que em pH 5,0 a viscosidade não foi alterada. A adição de sais alterou a viscosidade. A adição de CaCO<sub>3</sub>, em todos os valores de pH, diminuiu o efeito depletivo da mudança de pH sobre a viscosidade das soluções. A adição de KCl 1% (m/v), em todos os pH, acentuou a queda de viscosidade provocada pela mudança no pH, não sendo recomendada sua adição. Com o aumento da temperatura houve uma redução da viscosidade para todos os tratamentos (Tabela 2).

Para PETTITT (1982) a adição de NaCl nas concentrações de 0,1% a 1,0% não alteraram a viscosidade das soluções contendo 0,1% a 1% de xantana.

SANDFORD (1982) mostrou que não apenas o CaCl<sub>2</sub> mas também outros sais como NaCl, MgCl<sub>2</sub> e FeCl<sub>2</sub> quando adicionados nas concentrações 1, 3, 5, 10, 15 e 20% em soluções a 0,5% de scleroglucana aumentaram a viscosidade destas soluções. Para o polímero PS-60 produzido por *Pseudomonas elodea* a adição de CaCl<sub>2</sub> na concentração de 0,1% em solução a 1% do biopolímero foi suficiente para aumentar a força do gel (KANG et al., 1982).

VENDRUSCOLO (1995) observou que a adição de  $\text{CaCl}_2$  na solução aquosa a 1% do biopolímero produzido por *Beijerinckia*, modificou a viscosidade nas concentrações de 0,5 e 1,0% a pH 3,0. Já nas soluções aquosas a 1% do biopolímero em pH 7,0 não houve alteração da viscosidade mesmo quando foi adicionado 1% de  $\text{CaCl}_2$ .

Tabela 2 - Viscosidade aparente de soluções aquosas de biopolímeros 1% (m/v) fibra longa em 34 horas de fermentação contendo  $\text{CaCO}_3$  e KCl a 0,1% e 1% (m/v), de *Beijerinckia* 7070, em diferentes valores de pH, à 25°C e 65°C, determinada em viscosímetro rotacional Brookfield (modelo LV).

Sal (%)	pH	Temperatura (°C)	Viscosidade (mPas)			
			6rpm	12rpm	30rpm	60rpm
Sal 0,0% (Padrão)	3,0	25	50,0	37,5	50,0	42,5
		65	-	12,5	10,0	10,0
	5,0	25	100,0	87,5	60,0	57,5
		65	-	12,5	15,0	15,0
	6,5	25	175,0	150,0	120,0	95,0
		65	50,0	37,5	25,0	25,0
7,0	25	100,0	100,0	80,0	65,0	
	65	-	25,0	20,0	20,0	
KCl 0,1%	3,0	25	75,0	50,0	55,0	47,5
		65	-	-	10,0	12,5
	5,0	25	75,0	62,5	60,0	57,5
		65	-	12,5	25,0	20,0
	6,5	25	125,0	100,0	90,0	77,5
		65	-	-	25,0	25,0
7,0	25	125,0	100,0	70,0	65,0	
	65	-	-	15,0	17,5	
KCl 1,0%	3,0	25	50,0	25,0	35,0	30,0
		65	-	-	5,0	7,5
	5,0	25	50,0	62,5	35,0	37,5
		65	-	12,5	10,0	12,5
	6,5	25	100,0	87,5	80,0	65,0
		65	-	-	15,0	20,0
7,0	25	75,0	62,5	45,0	40,0	
	65	-	-	10,0	10,0	
$\text{CaCO}_3$ 0,1%	3,0	25	75,0	62,5	60,0	55,0
		65	-	12,5	15,0	15,0
	5,0	25	50,0	87,5	70,0	60,0
		65	-	12,5	15,0	12,5
	6,5	25	150,0	162,5	110,0	92,5
		65	25,0	12,5	30,0	30,0
7,0	25	100,0	112,5	80,0	75,0	
	65	25,0	12,5	25,0	25,0	
$\text{CaCO}_3$ 1,0%	3,0	25	25,0	50,0	55,0	47,5
		65	-	-	15,0	15,0
	5,0	25	75,0	62,5	65,0	50,0
		65	-	-	15,0	12,5
	6,5	25	175,0	125,0	105,0	85,0
		65	-	-	20,0	22,5
7,0	25	100,0	112,5	90,0	77,5	
	65	50,0	12,5	25,0	25,0	

- Sem leitura.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste experimento mostraram que o melhor biopolímero foi produzido pela cepa 7070, em 34 horas de fermentação em termos de produtividade e viscosidade de

suas soluções. A solução de biopolímero em pH 6,5 sem adição de sais apresentou o melhor resultado à 25°C.

## ABSTRACT

The biopolymers have been studied with visible interest for their rheology properties, being highly used in industry. The objective of this work was to evaluate the biopolymer production, long and short fiber, of two stumps of *Beijerinckia* sp. 7070 and UR4, the chemical composition and viscosity of these, as well as the influence of the temperature, different pH and addition of salts in the aqueous solutions of the biopolymers. The biopolymers were produced by fermentation aerobics, in boat-load. The conditions were: 24°C, 180 rpm at 34 hours. The fermented media was centrifuged for removal of the cells. The biopolymer was dried and triturated. To measure the viscosity, the samples were diluted to 1% (m/v) in water, KCl and  $\text{CaCO}_3$  in the concentrations of 0.1 and 1.0% added, correcting the pH for 3.0; 5.0 and 7.0. The values were assured in Brookfield (model LV) viscosimeter to 25 and 65°C, to 6, 12, 30 and 60 rpm. The results showed that the stump 7070 in the time of fermentation of 34 hours presented a larger production. In the chromatography analysis both stumps presented the same components for long fiber: fucose, glucose, galactose, glicuronic and galacturonic acids. The solution to 1% (m/v) of the biopolymer of *Beijerinckia* sp. 7070 because of its acidity, presents pH 6.5 at 25°C. The correction of the pH for 7.0 and 3.0 reduced the viscosity of the solution, while in pH 5.0 the viscosity was not altered. With the increase of the temperature there was a reduction of the viscosity for all the treatments.

Key-words: *Beijerinckia* sp., biopolymer, viscosity.

## REFERÊNCIAS

- BEYER, R.; MELTON, D. L.; KENNEDY, D.L. Viscosity studies on the polysaccharide gum from *Rhizobium* strain CB 744. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 39, p.151-161. 1987.
- BECKING, J. H. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. **Geographical and ecological distribution in soil. Plant and Soil**, v.14, p. 49-81. 1961.
- DOBEREINER, J. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns Estados do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 2, n.19, p. 151-160. 1959.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 5, n. 28, p. 34-40. 1974.
- KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P.J.; PS-60-agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 3, n. 45, p. 1086-1091. 1982.
- MACHADO, M. I.; VENDRUSCOLO, C.T.; MATTOS, M.L.T. Isolamento e caracterização de *Azotobacter* e *Beijerinckia* de solo do Rio Grande do Sul – Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE LA CIENCIA DEL SOLO, 1999, Tucon. **Resumo...** Tucon: 1999. v.1. p 123-127.
- MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação de composição de biopolímeros por cromatografia em camada delgada: metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 3, n. 4, p. 222-224. 1999.
- PACE, G. N. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, n.15, p. 41-70. 1980.
- PADILHA, F. F. **Síntese e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. 7070**. Pelotas, 1997. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas.

PETTITT, D. J. Xanthan gum. In: GLICKSMAN, M. ed., **Food Hydrocolloids**. Boca Raton: C.R.C. Press, 1982, p. 127-147.

RINAUDO, M. On the structure-properties of some polysaccharides used in the food industry. In: NISHINARI, K. & DOI, E. ed., **Food hydrocolloids**. New York: Plenum Press, 1993, p. 510.

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

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

VENDRUSCOLO, C.T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil**. Campinas, 1995. 143p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de "Engenharia de Alimentos", Universidade Estadual de Campinas.