

Produção, caracterização e propriedades tecnológicas de um biopolímero produzido por *Agrobacterium radiobacter* k84

Production, characterization and technological properties of biopolymer produced by *Agrobacterium radiobacter* k84

Caroline Maria Calliari^{1*}; Marciane Magnani²; Raúl Jorge Hernan Castro Gómez³

Resumo

No presente estudo, utilizando melação de cana-de-açúcar como única fonte de carbono para *Agrobacterium radiobacter* k84 foi obtido, em processo fermentativo, um biopolímero composto por carboidratos (35%), proteínas (15%) e minerais (40%). O rendimento do processo foi de 10 g.L⁻¹ do biopolímero que apresentou elevada solubilidade em água, pH neutro em solução aquosa e baixa atividade de água (0.52). As análises em Microscopia Eletrônica de Varredura revelaram microestrutura característica de um sólido amorfo, com partículas de formas irregulares e tamanhos variáveis. Na avaliação das propriedades tecnológicas, o biopolímero mostrou viscosidade à temperatura ambiente a partir da concentração 0.5% em solução aquosa, atividade geleificante em solução a 2%, atividade emulsificante (56.11±0.78%) e estabilizante (98.02±1.39%). Os resultados sugerem o biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 como um candidato promissor para uso industrial.

Palavras-chave: *Agrobacterium radiobacter*. Biopolímero. Melação de cana-de-açúcar. Fermentação.

Abstract

In this study, a biopolymer composed of carbohydrates (35%), protein (15%) and minerals (40%) was obtained through fermentation using sugar cane molasses as the sole carbon source for *Agrobacterium radiobacter* k84. The process yield was 10 gL⁻¹ of biopolymer, which showed high solubility in water, neutral pH in aqueous solution and low water activity (0.52). The analysis in Scanning Electron Microscopy revealed microstructure characteristic of an amorphous solid, with particles of irregular shapes and sizes. In the evaluation of technological properties, the biopolymer showed formation of viscous solutions at room temperature from concentration of 0.5% in aqueous solution, gelling activity in solution at 2%, emulsifying (56.11±1.39%) and stabilizing activity (98.02±0.78%). The results suggest that the biopolymer from *Agrobacterium radiobacter* k84 is a promising candidate for industrial use.

Key words: *Agrobacterium radiobacter*. Biopolymer. Sugar cane molasses. Fermentation.

¹ Dr^a em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina, UEL, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. E-mail: carolinemariac@yahoo.com.br

² Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Londrina, UEL, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. E-mail: magnani2@gmail.com

³ Prof. Titular, Orientador do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, UEL, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. E-mail: rcastrog@yahoo.com

* Autor para correspondência

Introdução

Biopolímeros de origem microbiana são constituídos essencialmente por polissacarídeos e tem estrutura e função similares às das gomas de origem vegetal e de algas. Amplamente utilizadas na indústria de alimentos, estas gomas tem propriedades espessantes, emulsificantes, estabilizantes, geleificantes e mimetizadores de gordura (SUTHERLAND, 2001). A obtenção de polissacarídeos a partir de microrganismos sob condições controladas é uma alternativa interessante, pois, independe de fatores como condições climáticas, ou poluição marinha que estão atrelados aos produtos de plantas e de algas (SUTHERLAND, 1992; TRIVENI; SCHAMALA; RASTOGI, 2001).

Diferentes fontes de carbono podem ser utilizadas na produção de biopolímeros microbianos, mantendo os outros componentes do meio de cultivo inalterados, bem como as condições de processamento. Os produtos originados diferem na estrutura química, que influencia nas propriedades e conseqüentemente, na possibilidade de aplicação (SUTHERLAND, 2001). Porém, o baixo rendimento e o custo elevado são fatores limitantes na obtenção de biopolímeros microbianos. A fonte de carbono representa a maior parte do custo para a produção (SCHMIDELL, 2001), sendo que o uso de fontes alternativas pode viabilizar o processo. O melão de cana-de-açúcar é uma fonte de carbono de custo inferior à glicose purificada, e possui elevada concentração de sacarose, além de sais minerais (OLIVEIRA et al., 2007).

O microrganismo *Agrobacterium radiobacter*, inicialmente designado como *Alcaligenes faecalis* variedade *myxogenes*, é um coco G- não patogênico, encontrado no solo, que tem crescimento ótimo entre 25°C e 30°C. A variedade k84 é uma cepa mutante da *A. radiobacter*, registrada como agente biológico preventivo da galha da coroa em pessegueiros (PENALVER et al., 1994; STOCKWELL; MOORE; LOPER, 1993), que não causa quaisquer

efeitos adversos no ambiente, ou em outras espécies vivas (EPA, 2005).

Em meio contendo carboidrato assimilável, o crescimento da *A. radiobacter* é acompanhado da produção de exopolissacarídeos como a goma curdlana e a succinoglucana que são utilizados industrialmente em larga escala (FUNAMI et al., 1999; ZEVENHUIZEN, 1997).

No presente estudo, utilizando melão de cana-de-açúcar como única fonte de carbono para *Agrobacterium radiobacter* k84, foi produzido, em processo fermentativo, um novo biopolímero, caracterizado quanto à composição, microestrutura e propriedades tecnológicas importantes para indústria alimentícia.

Material e Métodos

Produção do biopolímero de Agrobacterium radiobacter k84

O melão de cana-de-açúcar utilizado como fonte de carbono (50% de carboidratos totais) foi cedido pela Cooperativa Agropecuária Rolândia Ltda (COROL), Rolândia, Paraná, Brasil. A cepa *A. radiobacter* k84, pertencente a coleção de microrganismos do Laboratório de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, Paraná é mantida em meio de manutenção inclinado composto de 1.0% de manitol, 0.02% de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 0.02% de sulfato de magnésio (MgSO_4), 0.01% de cloreto de sódio (NaCl), 0.25% de extrato de levedura e 1.5% de ágar. Para ativação, o microrganismo foi inoculado neste mesmo meio e incubado por 48 h a 28°C.

A concentração de melão de cana-de-açúcar para composição do caldo de cultivo foi definida em experimentos preliminares. Foi utilizado melão de cana-de-açúcar 4°BRIX, equivalente a 2% de carboidratos, adicionado de 1.2% de extrato de levedura (CUNHA, 2002) e traços de sais minerais conforme Phillips e Lawford (1983). Para o preparo do pré-inóculo, uma alçada da bactéria ativada foi

inoculada em 100 mL do caldo de cultivo com incubação por 48h, a 28°C e 150 rpm. Posteriormente, 10% (v/v) do pré-inóculo foi adicionado ao caldo de cultivo e novamente incubado, para obtenção do inóculo.

Para produção do biopolímero após 120 h de cultivo, a biomassa de *A. radiobacter* foi separada por centrifugação a 12000g por 30 min a 4°C (LEE et al., 1997). O biopolímero foi precipitado do sobrenadante com etanol absoluto frio (3:1) durante 24 h, a 4°C e separado em pano de viscosa (Perfex®) sobre peneira de nylon com orifícios de 2 x 2 mm de diâmetro. Feito isso foi desidratado a 45°C, *overnight* e triturado até 60 mesh.

Caracterização do biopolímero

A determinação dos teores de umidade, cinzas, proteína e lipídios do biopolímero desidratado seguiram a metodologia oficial da Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 1995). A atividade de água do biopolímero triturado foi medida em equipamento AQUA LAB CX-2®. A determinação dos minerais da amostra foi realizada por espectrometria de emissão de plasma (ICP-ICAP 61E, Thermo Jarrel Ash Corporation) e fotometria de chama (Micronal).

Determinação quantitativa e qualitativa da fração de carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), utilizando glicose Sigma (10 – 100 µg) como padrão. Para identificação dos monossacarídeos constituintes foi realizada cromatografia de camada delgada conforme conduzido conforme Moreira, Souza e Vendruscolo (1998), utilizando glicose (1mg/mL-Sigma) como padrão. O eluente empregado foi clorofórmio:metanol:ácido acético:água [4:4:1:1 (v/v/v/v)] e o revelador uma solução de anisaldeído:ácido sulfúrico:ácido acético [1:2:100 (v/v/v)]. A placa cromatográfica revelada

e seca foi visualizada sob luz ultravioleta de onda curta (365 nm).

A determinação de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel presente no biopolímero foi conduzida pelo método enzimático-gravimétrico n° 985.29 da AOAC (1995), utilizando kit da Sigma (TDF 100A) e tampão MES-TRIS.

Determinação quantitativa e qualitativa da fração protéica

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método micro-Kjeldahl da Association of Official Analytical Chemist (AOAC, 1995). Para determinar proteínas solúveis foi utilizado o método colorimétrico de Lowry et al. (1951), utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e albumina de soro bovina Sigma (100 – 500 mg) como padrão.

O peso molecular da fração protéica foi determinado por eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) a 12% e revelação com solução de nitrato de prata. A partir do biopolímero livre de minerais, foi considerada a fração protéica do biopolímero e preparada uma solução de 50 µg/mL em água destilada. O padrão de peso molecular utilizado foi de 220-10 kDa (Invitrogen®).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma fina camada do biopolímero desidratado foi colocada sobre uma fita de carbono aderida ao *stub*. A deposição com ouro foi realizada em corrente de 40 mA, sob vácuo (10^{-1} mbar), em metalizador BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater. A amostra foi analisada em Microscópio Eletrônico Philips Quanta 200 (FEI) sob tensão de 20 kV, com distância de trabalho de 10.2 mm.

Propriedades tecnológicas

Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)

Uma alíquota de 30 mL do biopolímero em solução aquosa 8%, preparada a 30°C foi homogeneizada em agitador magnético durante 30 min e centrifugada a 1500g por 10 min. O IAA foi obtido pela razão entre o peso do precipitado e o peso da amostra. Para determinação do ISA o sobrenadante foi mantido a 105°C até secagem completa e então calculada a razão entre o peso do resíduo sólido presente no sobrenadante após a secagem e o peso da amostra (ANDERSON et al., 1969).

Índice de absorção de óleo (IAO)

Foi preparada uma mistura contendo 8% do biopolímero em óleo de soja (Soya®) a 30°C, em volume final de 30mL. A mistura foi homogeneizada em agitador magnético por 30 min e centrifugada a 1500g por 10 min. O IAO foi obtido pela razão entre o peso do precipitado e o peso inicial da amostra (ANDERSON et al., 1969).

Viscosidade e formação de gel

Soluções do biopolímero, nas concentrações 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 5.0% e 15.0% (p/v) foram preparadas pela adição do biopolímero em água destilada, sob agitação em agitador magnético durante 10 min a temperatura ambiente. A viscosidade das soluções foi medida em viscosímetro Brookfield com *spindle* nº 18, a 20 rpm e 25°C. Para verificação da capacidade de formação de gel, soluções em concentração 1.0% e 2.0% (p/v) foram mantidas em banho-maria a 60°C durante 15 min (FUNAMI et al., 1999) e resfriadas a 25°C durante 4 h para geleificação.

Atividade emulsificante e estabilidade da emulsão

Uma mistura de 5 mL de água, 5 mL de óleo de soja (Soya®) e 0.5 g de biopolímero foi emulsionada a 9500g durante 1 min, em agitador de haste Heidolf (YAMATSU et al., 1972). A emulsão obtida foi centrifugada a 25°C, 2000g por 5 min e a atividade emulsificante determinada pela razão entre o volume da emulsão e o volume total de solução. Como referência foram realizadas análises com lecitina de soja comercial Solec™F. A emulsão obtida foi mantida a 80°C em banho-maria, durante 30 min e então resfriada em água corrente por 10 min. Feito isso procedeu-se a centrifugação por 5 min a 2000g. A estabilidade da emulsão foi calculada pela razão entre o volume final e o inicial (YAMATSU et al., 1972).

Análises estatísticas

Os resultados, apresentados como médias \pm o desvio padrão, foram comparados por análise de variância (ANOVA) e Tukey, utilizando o Statistica 5.0, considerando $p \leq 0.05$.

Resultados e Discussão

O biopolímero de *A. radiobacter* k84 obtido por fermentação em caldo contendo melaço de cana-de-açúcar como única fonte de carbono é composto por minerais (40%), carboidratos (35%) e proteínas (15%). De coloração marrom, devido à cor do melaço utilizado, tem umidade 10% e em solução a 1% o pH é neutro. O rendimento aproximado do processo de obtenção foi de 10.0 ± 0.97 g.L⁻¹. Após a produção do biopolímero, aproximadamente 3 g.L⁻¹ de biomassa ativa de *A. radiobacter* k84 foram recuperados do caldo de cultivo. Uma alternativa para reaproveitamento deste subproduto, que além de agregar valor, evitaria o descarte no meio ambiente é a aplicá-lo para combate da galha da coroa em plantações de pessegueiros (PENALVER et al., 1994; STOCKWELL; MOORE; LOPER,

1993).

O biopolímero apresentou atividade de água (A_w) de 0.525. Considerando a possibilidade de emprego industrial, como por exemplo em alimentos, esta é uma característica muito importante do biopolímero, pois representa estabilidade a reações de degradação (AGUILERA; STANLEY, 1990; FENNEMA, 1996) bem como à contaminação microbiana (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) do biopolímero (Figura 1) permitiram visualizar partículas de formas irregulares e tamanhos variáveis, sendo que as menores partículas apresentavam-se ou não

aderidas a superfície das maiores. Esta estrutura é definida como uma *partially random mixture*, que caracteriza a interação parcial entre as partículas de tamanhos diferentes (BARBOSA-CANOVAS; RUFNER; PELEG, 1985). De acordo com Cano-Chauca et al. (2005), a aderência das partículas menores em torno das maiores, característica de compostos amorfos, indica a ausência de superfícies cristalinas. A presença de superfícies amorfas é interessante, pois confere alta solubilidade do pó em água (CANO-CHAUCA et al., 2005; YU, 2001) e maior velocidade de dissolução, em comparação a compostos cristalinos (YU, 2001).

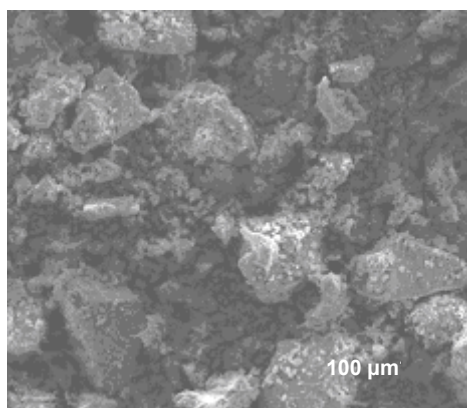


Figura 1. Micrografia do biopolímero produzido pela *Agrobacterium radiobacter* k84 observado em microscópio eletrônico de varredura com aumento de 300 x.

Os minerais presentes no biopolímero estão apresentados na (tabela 1). As quantidades de zinco, chumbo, cobre, cádmio, níquel e cobalto inferiores a 0.0 mg/g. A ausência de metais pesados é outra importante característica do biopolímero, uma vez que seu emprego em alimentos ficaria comprometido caso estes fossem detectados. Os minerais têm importante papel em funções

essenciais do organismo humano, como regular a atividade enzimática, facilitar a transferência de compostos essenciais através da membrana celular e manter a pressão osmótica (CZAJKA-NARRINS, 1998). Além disso, minerais podem apresentar funcionalidade tecnológica devido a interações com os componentes dos sistemas alimentares (NABRZYSKI, 2002; SIKORSKI, 2002).

Tabela 1. Composição mineral, em miligramas (mg) por grama (g) do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84.

Mineral	mg/g
K	200
P	8
Ca	7
Mg	6
Na	1.2
Fe	0.6

A cromatografia de camada delgada da fração de carboidratos (35%) revelou composição exclusiva de monossacarídeos com fator de retenção 0.43 (RF), que é correspondente ao RF da glicose (MOREIRA; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1998). Portanto a composição da fração de carboidratos é idêntica a da goma curdlana de *A. radiobacter*. Em contrapartida, na determinação de fibra do biopolímero foi encontrada somente fibra solúvel e a goma curdlana é uma fibra insolúvel (HARADA; MISAKI; SAITO, 1968). Já a succinoglucona que é uma fibra solúvel, difere do biopolímero obtido no presente estudo quanto à composição, pois se trata de um heteropolissacarídeo (DUSSAP; DE VITA; PONS, 1991).

Como uma fibra solúvel, composta por repetidas unidades de glicose, o biopolímero de *A. radiobacter* K84 é um candidato promissor como ingrediente em alimentos, já que fibras solúveis estão associadas ao bom funcionamento do trato gastrointestinal e redução os níveis de colesterol sérico (BEMILLER; WHISTLER, 1996). Adicionalmente, fibras solúveis apresentam propriedades tecnológicas interessantes para indústria de alimentos que incluem a habilidade de reter água e de formar gel (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998).

O perfil eletroforético da fração protéica do biopolímero revelou composição de proteínas de peso molecular 65 kDa, 80 kDa e 105 kDa (Figura 2). Em relação a propriedades tecnológicas

Rosenberg e Ron (1999) relataram que proteínas de baixo peso molecular atuam na diminuição da tensão interfacial, enquanto que as de alto peso molecular são mais eficazes na estabilização de emulsões óleo/água, pelo efeito no aumento da viscosidade (SHEPHERD et al., 1995). Além disso, o tamanho das proteínas influencia na interação eletrostática (POOLE; WEST; FRY, 1987; POOLE; WEST; WALTERS, 1984), que é condição para que um composto apresente propriedades como a de formar gel (FENG; HULTIN, 2001). O biopolímero obtido no presente estudo não formou gel sob aquecimento na concentração de 1% em solução aquosa. Porém, em solução 2% formou gel com viscosidade de 230.10 ± 2.05 Cp (*Spindle* n° 18, 10 rpm, 25°C). A capacidade de formação de gel era prevista devido a sua composição, pois polissacarídeos e proteínas são macromoléculas relacionadas à atividade geleificante (RUITER; VORAGEN, 2002; SIKORSKI, 2002; SUTHERLAND, 2001). Em adição, a composição mineral, com presença de íons divalentes que aumentam as interações eletrostáticas favorecem a geleificação (FENG; HULTIN, 2001; SIKORSKI, 2002; WARD; ANDON, 2002).

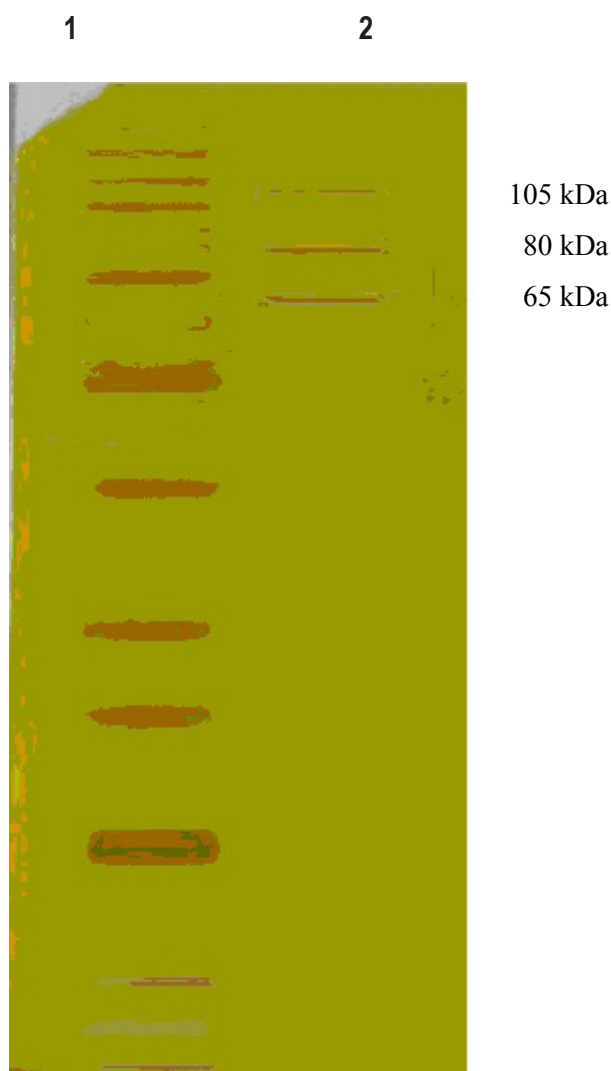


Figura 2. Perfil eletroforético da fração proteica do biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 em poliacrilamida (SDS PAGE), corado com nitrato de prata.

1 = Padrão de peso molecular (Invitrogen®) – 10-220 kDa

2 = Biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 (50 µg de proteína/mL)

O Índice de solubilidade em água (ISA) do biopolímero foi $68.59 \pm 3.17\%$. Um composto com ISA superior a 50% é classificado como altamente solúvel (CHEL-GUERRERO et al., 2002) e o valor encontrado para o ISA no presente estudo está entre o ISA da goma xantana (60%) (SCIARINI et al., 2009) e frutooligossacarídeos (FOS) (75%) (DEIS, 1994), importantes ingredientes utilizados como substitutos de gordura na indústria de alimentos. Esse parâmetro está relacionado com estado amorfo mostrado na análise microestrutural (Figura 1) e sugere que o biopolímero possui também

propriedades emulsificantes.

Para os Índices de absorção de água (IAA) e de óleo (IAO), também relacionados às propriedades emulsificantes, o biopolímero apresentou $83.3 \pm 1.95\%$ e $190.76 \pm 9.63\%$, respectivamente, indicando propriedade lipofílica superior à hidrofílica. Compostos com alta absorção de água são utilizados como agentes de volume (PENNA, 2002), porque tem habilidade de manter a água no sistema alimentar (JEZEQUEL, 1998; RUITER; VORAGEN, 2002). Isso é interessante na aplicação de um substituto de gordura, já que uma solução ou

suspensão viscosa imita a palatabilidade da gordura e é eficaz na manutenção da estabilidade do produto durante a armazenagem (FUNAMI; YADA; NAKAO, 1998). As características de absorção de água e de óleo determinam habilidade em estabilizar emulsões (ELIZALDE et al., 1988), devido à influência na espessura da camada interfacial que previne a coalescência dos glóbulos de gordura (ELIZALDE et al., 1988; KANTEREWICZ et al., 1987). O balanço hidrofílico-lipofílico é considerado como o melhor indicador para prever as propriedades emulsificantes de proteínas (ELIZALDE et al., 1988; KANTEREWICZ et al., 1987) e é obtido pela razão entre o IAA e IAO. O biopolímero obtido apresentou índice de absorção água-óleo (IAAO) de 0.44. Conforme Kanterewicz et al. (1987), este balanço corresponde à atividade emulsificante limitada. De fato, foi observada atividade emulsificante de $56.11 \pm 0.78\%$, valor inferior ao da lecitina de soja comercial ($72.78 \pm 0.55\%$). Entretanto, como esperado a capacidade do biopolímero de estabilizar a emulsão formada foi elevada ($98.02 \pm 1.39\%$), sem diferença ($p \geq 0.05$) daquela observada para a lecitina de soja comercial ($99.62 \pm 0.54\%$). Pode-se considerar a fração protéica do biopolímero como responsável pela atividade emulsificante e a fração de carboidrato como estabilizante da emulsão (BARRIGA et al., 1999). Considerando que a atividade emulsificante é favorecida pela presença de cátions divalentes

(ROSENBERG; RON, 1999), supostamente o conteúdo de minerais do biopolímero também influenciou nesta propriedade.

Na (tabela 2) estão apresentados os resultados dos testes de viscosidade realizados com diferentes concentrações do biopolímero em solução aquosa a temperatura ambiente. Conforme observado, a viscosidade é diretamente proporcional ao aumento da concentração de biopolímero. Este comportamento é característico de polímeros lineares que apresentam grupos carregados eletronicamente, devido ao aumento da interação entre as cadeias com o aumento da concentração (PENNA, 2002). A goma curdlana, por exemplo, em concentrações inferiores a 2% não forma suspensões uniformes, devido à precipitação das partículas nem em concentrações superiores a 10%, devido à hidratação insuficiente da goma (FUNAMI et al., 1999). Conforme Funami, Yada e Nakao (1998), a habilidade de formar soluções viscosas está relacionada à propriedade de alta absorção de água, o que reforça os resultados observados para o biopolímero do presente estudo. Essa habilidade também é relacionada a capacidade de estabilizar emulsões devido ao efeito do aumento da viscosidade na diminuição da colisão entre as gotículas (BECHER, 1965; ELIZALDE et al., 1988; KANTEREWICZ et al., 1987; PETROWSKI, 1976).

Tabela 2. Viscosidade observada para de soluções aquosas de biopolímero de *Agrobacterium radiobacter* k84 em diferentes concentrações.

Concentração de biopolímero (% p/v)	Viscosidade (Cp)
0.5	$31.75a \pm 2.47$
1.0	$32.10a \pm 1.27$
1.5	$34.75ab \pm 1.76$
2.0	$38.55bc \pm 1.63$
5.0	$41.3c \pm 0.99$
15.0	$114.25d \pm 0.78$

Médias acompanhadas de letra diferente apresentam diferença significativa ($p \leq 0.05$).

Conclusão

Utilizando melão de cana-de-açúcar como única fonte de carbono em processo fermentativo com *Agrobacterium radiobacter* k84 foi obtido um biopolímero composto de fibra solúvel de glicose, proteínas e minerais. Características como elevada solubilidade em água e baixa atividade de água e propriedades tecnológicas de formação de gel, viscosidade e estabilizante de emulsão foram observadas para o novo biopolímero. Estas, somadas a ausência de toxicidade já verificada *in vitro* e *in vivo* (dados em publicação), bem como ao seu potencial antimutagênico (PRIMO, 2008), sugerem para o biopolímero obtido, potencial para aplicação como aditivo alimentar de substituição de gordura.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. A Dra. Elizabete R. M. Marana, do Departamento de Medicina Veterinária, pelo auxílio na caracterização da fração protéica do biopolímero.

Referências

AGUILERA, J. M.; STANLEY, D. W. *Microstructural principles of food processing and engineering*. Amsterdam: Elsevier, 1990.

ANDERSON, R. A.; CONWAY, H. F.; PFEIFER, V. F.; GRIFFIN, E. L. J. Gelation of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today*, Saint Paul, v. 14, n. 1, p. 4-7, 11-12, 1969.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST - AOAC. *Official methods of analysis*. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, v. 2, 1995.

BARBOSA-CANOVAS, G. V.; RUFNER, R.; PELEG, M. Microstructure of selected binary food powder mixtures. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 50, n. 2, p. 473-477, 481, 1985.

BARRIGA, J. A. T.; COOPER, D. G.; IDZIAK, E. S.; CAMERON, D. R. Components of the emulsifier from *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*,

Amsterdam, v. 25, n. 1/2, p. 96-102, 1999.

BECHER, P. *Emulsions: theory and practice*. 2. ed. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1965.

BEMILLER, J. N.; WHISTLER, R. L. Carbohydrates. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996, p. 157-224.

CANO-CHAUCA, M.; STRINGHETA, P. C.; RAMOS, A. M.; CAL-VIDAL, J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 420-428, 2005.

CHEL-GUERRERO, L.; PÉREZ-FLORES, V.; BETANCUR-ANCONA, D.; DÁVILA-ORTIZ, G. Functional properties of flours and protein isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canvalia ensiformis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 50, n. 3, p. 584-591, 2002.

CUNHA, M. A. A. *Produção de goma curdlana pela bactéria Agrobacterium radiobacter k84*. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

CZAJKA-NARRINS, D. M. Minerais. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. (Trad.). *Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998, p. 123-166.

DEIS, R. C. Adding bulk without adding sucrose. *Cereal Foods World*, Saint Paul, v. 39, n. 2, p. 93-97, fev. 1994.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUSSAP, C. G.; DE VITA, D.; PONS, A. Modeling growth and succinoglycan production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 9042 in batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 38, n. 1, p. 65-74, 1991.

ELIZALDE, B. E.; KANTEREWICZ, R. J. de; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Physicochemical properties of food proteins related to their ability to stabilize oil-in-water emulsions. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 53, n. 3, p. 845-848, 1988.

EPA – U.S. Environmental Protection Agency. *Agrobacterium radiobacter* strain K1026(006474). 2005. Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/tech_006474.htm. Acesso em: 21 jan. 2006.

FENG, Y.; HULTIN, H. O. Effect of pH on the rheological and structural properties of gels of water-washed chicken-

- breast muscle at physiological ionic strength. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Washington, v. 49, n. 8, p. 3927-3935, 2001.
- FENNEMA, O. *Food chemistry*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996.
- FUNAMI, T.; FUNAMI, M.; YADA, H.; NAKAO, Y. Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan. *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 317-324, 1999.
- FUNAMI, T.; YADA, H.; NAKAO, Y. Curdlan properties for application in fat mimetics for meat products. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 63, n. 2, p. 283-287, 1998.
- HARADA, T.; MISAKI, A.; SAITO, H. Curdlan: a bacterial gel-forming β -1,3-glucan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Amsterdam, v. 124, p. 292-298, 1968.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. Modern food microbiology. 19. ed. New York: Springer, 2005.
- JEZEQUEL, V. Curdlan: a new functional β -glucan. *Cereal Foods World*, Saint Paul, v. 43, n. 5, p. 361-364, 1998.
- KANTEREWICZ, R. J. de; ELIZALDE, B. E.; PILOSOFF, A. M. R.; BARTHOLOMAI, G. B. Water-oil absorption index (WOAI): a simple method for predicting the emulsifying capacity of food proteins. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 52, n. 5, p. 1381-1383, 1987.
- LEE, J. W.; YEOMANS, A. L.; ALLEN, R. A.; GROSS, D. L. Microbial production of water-soluble non curdlan type exopolymer-B with controlled composition by *Agrobacterium radiobacter*. *Biotechnology Letters*, New York, v. 19, n. 12, p. 1217-1221, 1997.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, A. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal Biological of Chemistry*, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Carboidratos. In: ALMEIDA, A. R. (Trad.). *Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9. ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 31-47.
- MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia de camada delgada: Metodologia. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 4, n. 3, p. 222-224, 1998.
- NABRZYSKI, M. Mineral components. In: SIKORSKI, Z. E. (Ed.). *Chemical and functional properties of food components*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 51-79.
- OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F. da; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 37, n. 2, p. 177-183, 2007.
- PENALVER, R.; VICEDO, B.; SALCEDO, C. I.; LÓPEZ, M. M. *Agrobacterium radiobacter* strains k84, k 1026 produce an antibiotic-like substance, active *in vivo* against *A. tumefaciens* and phytopathogenic *Erwinia* and *Pseudomonas* spp. *Biocontrol Science and Technology*, London, v. 4, n. 3, p. 259-267, 1994.
- PENNA, A. L. B. Hidrocolóides: usos em alimentos. *Food Ingredients*, São Paulo, v. 3, n. 17, p. 58-64, 2002.
- PETROWSKI, G. E. Emulsion stability and its relation to foods. *Advances in Food Research*, New York, v. 22, p. 309-359, 1976.
- PHILLIPS, K. R.; LAWFOR, H. G. Theoretical maximum and observed product yields associated with curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, Saskatoon, v. 29, p. 1270-1276, 1983.
- POOLE, S.; WEST, S. I.; FRY, J. C. Effects of basic proteins on the denaturation and heat-gelation of acidic proteins. *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 301-316, 1987.
- POOLE, S.; WEST, S. I.; WALTERS, C. L. Protein-protein interactions: their importance in the foaming of heterogeneous proteins system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, New York, v. 35, n. 6, p. 701-711, 1984.
- PRIMO, M. S. *Avaliação da atividade antimutagênica de um biopolímero extraído do microrganismo Agrobacterium radiobacter em camundongos Swiss*. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Nutrição) - Centro Universitário Filadélfia, Londrina.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 52, p. 154-162, 1999.
- RUITER, A.; VORAGEN, A. G. J. Major food additives. In: SIKORSKI, Z. E. (Ed.). *Chemical and functional properties of food components*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2002, p. 273-289.
- SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 2, p. 5-18.
- SCIARINI, L. S.; MALDONADO, F.; RIBOTTA, P. D.; PÉREZ, G. T.; LEÓN, A. E. Chemical composition and functional properties of *Gleditsia triacanthos* gum. *Food Hydrocolloids*, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 306-313, 2009.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, I. W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 40, n. 3, p. 207-217, 1995.

SIKORSKI, Z. E. *Chemical and functional properties of food components*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2002.

STOCKWELL, V. O.; MOORE, L. W.; LOPER, J. E. Fate of *Agrobacterium radiobacter* K84 in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington DC, v. 59, p. 2112-2120, jul. 1993.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from gram negative bacteria. *International Dairy Journal*, Amsterdam, v. 11, n. 9, p. 663-674, 2001.

_____. The role of acylation in exopolysaccharides including those for food use. *Food Biotechnology*, Philadelphia, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1992.

TRIVENI, R.; SCHAMALA, T. R.; RASTOGI, N. K. Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. *Process Biochemistry*, Amsterdam, v. 36, p. 787-795, 2001.

WARD, F. M.; ANDON, S. A. Hydrocolloids as film formers, adhesives, and gelling agents for bakery and cereal products. *Cereal Foods World*, Saint Paul, v. 47, n. 2, p. 52-55, fev. 2002.

YAMATSU, K.; SAWADA, K.; MORITAKA, S.; MISAKI, M.; TADO, J.; NODA, T. Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Journal of Agriculture and Biology Chemistry*, Tokyo, v. 36, n. 5, p. 719-727, 1972.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: Preparation, characterization and stabilization. *International Journal of Pharmaceutics*, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 27-42, 2001.

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Succinoglycan and galactoglucan. *Carbohydrate Polymers*, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 139-144, 1997.

