

Crispin Humberto Garcia – Cruz

Produção de Polissacarídeos Bacterianos



CONTÍDIDO

3.1.50.8
421.30

Pág.

Índice

CRISPIN HUMBERTO GARCIA-CRUZ

Resumo

Summary

Introdução

PRODUÇÃO DE POLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

2.1. Polissacarídeos bacterianos	3
2.1.1. Aglicano bacteriano	3
2.1.2. Goma gelana	6
2.1.3. Goma xantana	8
2.1.4. Goma levana	10
2.1.5. Goma de <i>Rhizobium</i>	11
2.2. Recuperação e purificação dos biopolímeros	12

3. Material e métodos

3.1. Microrganismos	17
3.2. Meio base	
3.3. Meio de produção	
3.4. Inoculação	

Tese apresentada ao Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto da UNESP, para a obtenção do Título de Livre Docente.



786198

São José do Rio Preto
1997

CONTEÚDO

	Pág.
Índice de Tabelas	i
Resumo	ii
Summary	iii
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Polissacarídeos bacterianos	3
2.1.1. Alginato bacteriano	3
2.1.2. Goma gelana	6
2.1.3. Goma xantana	8
2.1.4. Goma levana	10
2.1.5. Goma de <i>Rhizobium</i>	11
2.2. Recuperação e purificação dos biopolímeros	12
3. Material e métodos	17
3.1. Microrganismos	17
3.2. Meio base	17
3.3. Meio de produção	19
3.4. Meio de manutenção	20
3.5. Seleção e propagação da cultura	20
3.6. Preparo do inóculo	21
3.7. Produção dos polissacarídeos	22
3.8. Separação e purificação dos polissacarídeos	22
3.9. Determinação do crescimento celular	22



ÍNDICE DE TABELAS

4.	Resultados e Discussão	23
4.1.	Goma xantana	23
4.2.	Polissacarídeo de <i>Rhizobium</i>	31
4.3.	Ácido alginico	36
4.4.	Goma gelana	42
4.5.	Goma levana	47
5.	Conclusões	53
6.	Bibliografia	54



ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Efeito da adição de glicose e sacarose nos parâmetros de fermentação durante a produção de goma xantana por <i>Xanthomonas campestris pv campestris</i> a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	Pág. 24
Tabela 2.	Efeito da adição de glicose e sacarose nos parâmetros de fermentação durante a produção de goma xantana por <i>Xanthomonas campestris pv manihotis</i> a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	25
Tabela 3.	Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma xantana por <i>Xanthomonas campestris pv manihotis</i> a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	27
Tabela 4.	Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma xantana por <i>Xanthomonas campestris pv campestris</i> a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	28
Tabela 5.	Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma xantana por <i>Xanthomonas campestris pv</i>	29



Tabela 11.	<i>manihotis</i> a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	39
Tabela 6.	Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma xantana por <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	30
Tabela 7.	Efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos parâmetros de fermentação durante a produção de polissacarídeo por <i>Rhizobium leguminosarum phaseoli</i> , a 30°C durante 168 horas e 210 rpm.	32
Tabela 8.	Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 3,0% de manitol, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de polissacarídeo por <i>Rhizobium leguminosarum phaseoli</i> , a 30°C durante 168 horas e 210 rpm.	34
Tabela 9.	Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 3,0% de manitol, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de polissacarídeo por <i>Rhizobium leguminosarum phaseoli</i> , a 30°C durante 168 horas e 210 rpm.	35
Tabela 10.	Efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos parâmetros de fermentação, durante a produção de ácido algínico por <i>Azotobacter vinelandii</i> , a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	37

Tabela 11.	Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 1,0% de glicose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de ácido algínico por <i>Azotobacter vinelandii</i> , a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	39
Tabela 12.	Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 1,0% de glicose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de ácido algínico por <i>Azotobacter vinelandii</i> , a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.	41
Tabela 13.	Efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos parâmetros de fermentação durante a produção de gelana por <i>Pseudomonas elodea</i> , a 30°C durante 72 horas e 210 rpm	43
Tabela 14.	Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de gelana por <i>Pseudomonas elodea</i> , a 30°C durante 72 horas e 210 rpm.	45
Tabela 15.	Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de gelana por <i>Pseudomonas elodea</i> , a 30°C durante 72 horas e 210 rpm.	46
Tabela 16.	Efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos	48



parâmetros de fermentação durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa*, a 35°C durante 120 horas e 210 rpm.

Tabela 17. Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, 50
ao meio de produção contendo 1,0% de manitol, nos
parâmetros de fermentação, durante a produção de
levana por *Bacillus polymyxa*, a 35°C durante 120
horas e 210 rpm.

Tabela 18. Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao 51
meio de produção contendo 1,0% de manitol, nos
parâmetros de fermentação, durante a produção de
levana por *Bacillus polymyxa*, a 35°C durante 120
horas e 210 rpm.



RESUMO

Foram estudadas as exigências nutricionais das bactérias *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas elodea*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Bacillus polymyxa* e *Rhizobium leguminosarum phaseoli*, para produção de polissacarídeos ao nível de laboratório. Foram testadas diferentes fontes de carbono e a adição de baixas concentrações favoreceu a produção do polissacarídeo. A produção do polímero também foi estimulada pela adição ao meio de produção (meio base + fonte de carbono) dos ácidos pirúvico, succínico e α -ceto-glutárico. Foi testada a adição de diferentes concentrações de NaNO_3 , KNO_3 , e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, utilizadas como fontes de nitrogênio, ao meio de produção e foi observado que, o aumento da concentração de nitrogênio acima da concentração ótima provoca um aumento da massa celular e uma diminuição da produção do polissacarídeo. A sacarose pode ser utilizada como uma boa fonte alternativa para produção de polissacarídeos.



The nutritional requirements of *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas elodea*, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, *Bacillus polymyxa* e *Rhizobium leguminosarum phaseoli*, for polysaccharide production were studied in laboratory scale. Several sources of carbon was tested and observed that low concentrations stimulated polysaccharide production. The polysaccharide production was stimulated by the addition to production medium (Base medium + carbon Source) of pyruvic, succinic and α -keto-glutaric acids. The addition of NaNO_3 , KNO_3 , e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, in the production medium were tested. Nitrogen concentration higher than optimal caused a decrease in the production biopolymer and an increase in the cellular mass. The sucrose utilization is a good substitute for the polysaccharide production.



1. Introdução

A moderna indústria alimentícia vem cada vez mais tornando-se dependente da produção de alimentos altamente processados, ao invés de simplesmente preservar as matérias-primas obtidas no campo. Muito desse desenvolvimento tem resultado da criatividade ou manipulação empírica, muitas vezes por tentativa e erro, de ingredientes sobre os quais têm-se pouco conhecimento científico. Entre estes, destaca-se uma classe de polissacarídeos denominados hidrocolóides - ou gomas, como são comumente conhecidos - cuja característica mais importante, sob o ponto de vista tecnológico, é sua capacidade de determinar ou modificar a estrutura de um alimento.

Esses polissacarídeos possuem uma ampla gama de propriedades funcionais, atuando como estabilizantes, espessantes, gelificantes e crio-protetores, sendo muitas vezes os principais responsáveis pela textura (corpo, viscosidade, consistência) dos alimentos processados (Igoe, 1982; Souza, 1984).

O termo hidrocolóides refere-se a uma ampla variedade de compostos onde podem ser incluídos polissacarídeos de origem vegetal, marinha ou microbiana. As gomas de origem vegetal são obtidas de exsudados de árvores (gomas arábica e karaya), de sementes (gomas guar e locusta) e de frutas cítricas (pectina), enquanto as de origem marinha são retiradas de algas (alginato, ágar, carragena). Entre as de origem microbiana encontram-se a dextrana, xantana, curdlana e gelana.

Os polissacarídeos mais estudados nos últimos anos têm sido os de origem microbiana, chamados biopolímeros, devido a algumas vantagens de sua obtenção em relação às outras gomas, tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado, necessidade de espaço relativamente pequeno. Além disso, as gomas de origem microbiana apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como pH, temperatura, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura.



Entre os biopolímeros mais utilizados, a goma xantana é, de longe, a mais importante, representando 90% do volume total de vendas. O maior fornecedor desse polímero é a Kelco Co. situada nos EUA, entretanto a concorrência torna-se cada dia mais severa, com o aparecimento de novas indústrias produtoras no mercado. O mercado estimado para a goma xantana nos EUA e Europa (França, Alemanha, Inglaterra e Itália) em 1989 era de US\$ 33,3 milhões, sendo que 50% desse total eram supridos pelos EUA (Seisun, 1989). Dentre os biopolímeros, a xantana representa uma pequena mas importante fatia do mercado dominado pelos polissacarídeos derivados de plantas e algas (Fontanes, 1985).

A grande aceitação da goma xantana pelas indústrias alimentícias ocorreu por essa ter sido a primeira goma de origem microbiana aprovada para uso em alimentos pelo FDA (Food and Drug Administration), em 1969. Somente em 1992 um segundo biopolímero, a goma gelana também produzida pela Kelco Co., obteve aprovação pelo mesmo órgão, tornando-se uma alternativa para o mercado (Pszczola, 1993). Entretanto, a tecnologia de produção dessas gomas é de domínio exclusivo de poucas indústrias instaladas principalmente nos Estados Unidos. Por isto, o desenvolvimento e otimização de biotecnologia nacional para obtenção de hidrocolóides é de grande importância econômica para o Brasil, uma vez que os insumos básicos para sua produção e purificação (açúcar e álcool) têm baixo custo relativo e grande disponibilidade no mercado, o que poderia tornar o produto competitivo e possibilitaria a substituição das importações.

Neste estudo foram selecionadas as gomas xantana e gelana por já terem sido aprovadas como aditivos de grau alimentício no mercado internacional, embora a xantana produzida nos EUA seja obtida pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*; aqui no Brasil seria mais apropriado o uso da *Xanthomonas campestris* pv. *Manihotis* (variedade brasileira), devido às condições climáticas (Gonçalves, 1989). O alginato microbiano ainda é pouco difundido, porém aparece como uma alternativa viável ao alginato retirado de algas, já que sua produção por fermentação pode ser mais facilmente controlada. O polissacarídeo levana, produzido pelo *Bacillus polymyxa*, surge como uma boa fonte alternativa de frutose e o polissacarídeo de *Rhizobium* poderá ter algum



interesse industrial pelo fato de conferir certas características reológicas às soluções aquosas.

Desta forma, buscando contribuir para o desenvolvimento da biotecnologia nacional foram otimizados os parâmetros de produção das gomas xantana, gelana, alginato microbiano, levana e do polissacarídeo produzido por *Rhizobium*.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Polissacarídeos bacterianos

2.1.1. Alginato bacteriano

Os hidrocolóides possuem uma grande variedade de estruturas químicas, peso molecular, composição, solubilidade e outras características que lhes conferem uma ampla gama de funcionalidades (BeMiller, 1988).

O uso de hidrocolóides na indústria de alimentos baseia-se principalmente no aproveitamento de suas propriedades funcionais, que estão relacionadas à capacidade de espessar, de manter partículas em suspensão e de reter água (Sanderson, 1981). Alguns hidrocolóides provocam uma imobilização extrema da água, fazendo com que o sistema adote características de um sólido capaz de reter sua forma, convertendo-se em um gel (Szczesniak, 1986). Um desses polissacarídeos é o alginato de cálcio que, em concentrações maiores que 1%, forma géis de estrutura firme e textura quebradiça.

As aplicações dos alginatos na indústria de alimentos são muitas e bastante variadas. São utilizados na elaboração de sobremesas congeladas, produtos lácteos, produtos de panificação, molhos para salada, alimentos tipo imitação, bebidas e géis para sobremesa que gelificam na temperatura ambiente. Em sorvetes os alginatos proporcionam uma textura macia, pois controlam a formação de cristais de gelo. O alginato de propilenoglicol é um excelente espessante e estabilizante de molhos para salada tipo francês engarrafados. Outra aplicação importante é o tratamento de pescados congelados com alginato de sódio e cloreto de cálcio, que formam um filme de revestimento firme e



estável ao descongelamento, evitando o contato direto com o ar e aumentando a vida de prateleira (Glicksman, 1986).

Os alginatos são uma classe de hidrocolóides extraídos de algas marrons (do grupo *Phaeophyceae*) encontradas apenas em água salgada. Todas as algas marrons que contêm alginato constituem uma família diversificada de plantas que se adaptam facilmente ao ambiente e podem crescer em praias rochosas ou nas áreas do oceano com fundo límpido e rochoso. Somente poucas espécies de algas marrons são utilizadas como fonte comercial de alginato, sendo a alga gigante *Macrocystis pyrifera* a principal fonte de suprimento deste polissacarídeo (Glicksman, 1986).

O maior problema em relação à utilização de hidrocolóides extraídos de fontes naturais é a escassez e a possibilidade de esgotamento das mesmas. Com o avanço da tecnologia, a utilização desses hidrocolóides tem aumentado muito rapidamente e com isso suas fontes naturais são cada vez mais exploradas. Em 1983 estimou-se, nos Estados Unidos, o consumo total de gomas extraídas em aproximadamente 900.000 toneladas (Glicksman, 1986). Mesmo que estes dados não sejam recentes, observa-se a necessidade de procurar fontes alternativas para a produção destes polissacarídeos, de forma a racionalizar seu uso. Nesse sentido, as bactérias representam uma ótima fonte produtora alternativa.

Sob o ponto de vista estrutural os alginatos de origem marinha apresentam várias diferenças. Aqueles obtidos das algas marrons, por exemplo, apresentam uma composição variada no teor de ácido alginico, dependendo da alga utilizada. Este ácido alginico é um co-polímero com ligações 1-4 dos ácidos D-manurônico e seu 5-epímero ácido L-gulurônico (Glicksman, 1986). O arranjo dos monômeros deste co-polímero tem sido descrito como uma estrutura de blocos. O polímero consiste em regiões de blocos homopoliméricos de ácido manurônico e de ácido gulurônico juntos com as chamadas alternâncias ao acaso ou seqüências casuais. As propriedades do polímero, especialmente com respeito à formação de gel na presença de íons cálcio, dependem tanto da proporção de ácido gulurônico quanto das estruturas do bloco. Uma maior proporção de ácido poligulurônico no polímero permite a formação de um gel mais forte e quebradiço na



presença de íons cálcio (Smidsrod, 1974). As proporções dos três tipos de polímeros no ácido algínico variam, promovendo diferenças nas propriedades e na funcionalidade dos alginatos (Haug e Larsen, 1962; Haug, 1964; Penman e Sanderson, 1972).

Os alginatos disponíveis para uso comercial incluem os sais de sódio, potássio, amônia, mistura de amônia e cálcio, mistura de sódio e cálcio e alginato de propilenoglicol. Para fins alimentares o íon cálcio é o cátion mais utilizado como estabilizante, uma vez que reage instantaneamente com o polímero, formando géis estáveis na temperatura ambiente. Devido à grande utilização desse sistema, foram desenvolvidos dois procedimentos para a formação dos géis de alginato de cálcio a partir de sais solúveis (normalmente de sódio): um por difusão através de uma membrana e o outro por mistura controlada do íon cálcio. O primeiro consiste em difundir o íon cálcio em uma solução de alginato de sódio através de uma membrana. Os géis resultantes mostram uma estrutura não homogênea e birrefringência local, assim como poros visíveis ao microscópio (Tolstoguzov, 1975). O segundo método utiliza um sal de cálcio pouco solúvel, por exemplo citrato, ou um sal do tipo fosfato de cálcio, cuja dissolução se produz por redução do pH. Os géis elaborados com este método podem ter uma estrutura homogênea. A velocidade de formação do gel, bem como sua textura final podem ser controladas através da solubilidade e disponibilidade da fonte de cálcio (Mitchell e Blanshard, 1976), sendo suas características dependentes do método utilizado (Smidsrod et alii, 1972; Luh et alii, 1977).

O ácido algínico de origem microbiana é produzido por *Azotobacter vinelandii* sob condições deficientes de fosfato, sendo sintetizado apenas durante a fase de crescimento. Esse processo tem sido estudado em detalhes mas, para que se atinja o nível da produção de ácido algínico sob condições perfeitamente estabelecidas e controladas, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas.

O polímero produzido pela *Azotobacter vinelandii* tem a mesma estrutura básica do polissacarídeo produzido por algas, exceto pelo fato de ser parcialmente acetilado, onde aproximadamente um em cada dez grupos hidroxilados em C2 e/ou C3 estão esterificados com acetato (Gorin e Spencer, 1965; Davidson et alii, 1977; Skajak-Braek et



alii, 1986). Inclusive, a notação específica do alginato de sódio bacteriano está relacionada com aquele obtido de algas, sugerindo conseqüentemente, que as configurações glicosídicas sejam similares, indicando que os polímeros estão estreitamente relacionados (Gorin e Spencer, 1965).

O mercado para alginatos exige produtos que proporcionem boa viscosidade em solução e tenham capacidade de gelificação. Uma grande variedade de alginatos pode ser produzida por *Azotobacter vinelandii* por meio da seleção apropriada das condições de fermentação. Skajak-Braek et alii, (1986) mostraram que a proporção de ácido manurônico para ácido gulurônico no alginato produzido por esse microrganismo poderia ser influenciada pela concentração de íons cálcio no meio de crescimento, apresentando evidências que sugerem que os resíduos de ácido manurônico foram epimerizados para resíduos de ácido gulurônico por uma enzima extracelular dependente dos íons cálcio para sua atividade. Deavin et alii (1977) foram capazes de manipular o peso molecular de forma a obter a viscosidade desejada em soluções do polissacarídeo produzido pela *Azotobacter vinelandii*. Através da seleção apropriada das condições de fermentação, podem ser obtidos produtos com uma ampla faixa de viscosidade e propriedades comparáveis a um grande número de alginatos produzidos por algas.

2.1.2. Goma gelana

A goma gelana é um biopolímero que passou a ser comercializado recentemente pela Kelco Co. (EUA) e vem sendo apontada como um dos mais eficientes e multifuncionais hidrocolóides desenvolvidos até o momento. Foi o segundo polissacarídeo de origem microbiana a ser aprovado para uso em alimentos pelo FDA, em 1992.

Sua descoberta deu-se em 1977, quando a bactéria produtora *Pseudomonas elodea* foi identificada pela primeira vez durante uma pesquisa sobre microrganismos sintetizadores de gomas isolados do ambiente.

Comercialmente, a goma gelana é produzida pela inoculação de *Pseudomonas elodea* num meio de fermentação constituído de uma fonte de carbono, fosfato, fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico e alguns elementos traços. A fermentação é



desenvolvida sob condições estéreis com estrito controle de aeração e agitação, temperatura e pH (Kang et alii, 1982). Depois de que a fermentação foi completada, e antes da recuperação da goma, o caldo viscoso é pasteurizado para eliminar as células viáveis; seco e moído. A goma gelana é comercializada como dois produtos: grau industrial e grau alimentar.

A goma gelana está constituída por glicose, ácido glicurônico e ramnose na proporção de 2:1:1. Estes estão ligados juntos formando a estrutura primária de um tetrassacarídeo linear que se repete (O'Neill et alii, 1983; Jansson et alii, 1983). Na goma gelana estão presentes também dois substituintes acila (acetato e glicerato) no mesmo resíduo de glicose (O'Neill et alii, 1983). Após de-acilação alcalina suave, esse polissacarídeo forma um gel claro, firme e brilhante. O gel é termorreversível e tem excelente estabilidade ao calor, sendo resistente a vários ciclos de autoclavagem (Kang et alii, 1982).

A gelana pode ser usada como agente gelificante, texturizante, estabilizante e formador de filmes de revestimento, podendo substituir outros hidrocolóides ou ser utilizada em combinação com os mesmos. Suas principais aplicações incluem produtos de panificação e confeitaria, na forma de recheios ou coberturas, produtos lácteos, emulsões, sorvetes, geléias, sobremesas ou rações para animais domésticos. A ótima consistência e grande transparência dos géis formados possibilitam a substituição do ágar em meios de cultura (Lin et alii, 1984).

As principais vantagens da gelana em relação às outras gomas são:

- rápida liberação de aroma e sabor dos produtos formulados, devido ao mecanismo de ligação com a água;
- grande estabilidade em produtos ácidos ou submetidos ao calor, mantendo a força do gel numa ampla faixa de pH (3,5 a 8,0) e melhorando as condições de armazenamento;
- forma géis em baixas concentrações (0,05 a 0,4%);
- devido a sua reversibilidade ao calor os géis podem ser formulados para serem fundidos ou ainda manter sua estrutura mesmo quando submetidos a altas temperaturas;
- grande transparência dos géis;



- rápida dispersibilidade, sem formação de grumos, o que dispensa etapas de pré-mistura;
- facilidade de uso, uma vez que a formação do gel ocorre pela adição da goma em água, sob agitação, seguida de aquecimento a 75 °C na presença de íons monovalentes ou divalentes, com subsequente resfriamento;
- compatibilidade com um grande número de hidrocolóides e proteínas, por exemplo, a combinação de gelana com xantana e locusta produz uma grande variedade de texturas. A combinação de gelana e gelatina produz géis sem necessidade de refrigeração e resistentes ao aquecimento. A adição de gelana ao amido permite melhorar sua performance sem necessidade de uma modificação química. Os níveis de amido podem ser reduzidos melhorando a liberação de sabor, a estabilidade das pastas, a capacidade de reter água e a estabilidade das massas (Pszczola, 1993).

3.1.3. Goma xantana

Dos polímeros de origem bacteriana, a goma xantana tem sido a mais estudada, uma vez que seu uso em alimentos foi permitido pelo FDA desde julho de 1969 (FDA, 1969).

A goma xantana comercial é produzida pela linhagem pura de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizando xarope de glicose como fonte de carbono, derivados de amônia como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento sob condições aeróbias a 28 °C e agitação constante. Após a fermentação, a goma é recuperada por precipitação com etanol, seca e moída (Cottrell et alii, 1980).

Quimicamente a goma xantana é constituída por D-glicose, D-manose, ácido D-glicurônico, ácido acético e ácido pirúvico nos teores 2,8:3,0:2,0:1,7:0,51-0,63, respectivamente (Sloneker e Jeanes, 1962). A cadeia principal deste polissacarídeo é constituída de unidades de β -D-glicose unidas entre si através de ligações 1-4. A esta cadeia ligam-se dois resíduos de D-manose e um resíduo de ácido D-glicurônico. Esse polissacarídeo contém grupos acetila esterificados na posição 6 do resíduo de D-manose, ligados diretamente à cadeia principal, e grupos pirúvicos ligados às posições 4 e 6 do resíduo D-manose terminal. A molécula tem um esqueleto celulósico solúvel em água,



devido à presença de cadeias laterais ligadas em cada segundo resíduo de glicose na cadeia principal. Como consequência desta estrutura primária, a molécula existe em solução como um bastão rígido, estabilizado por interações covalentes entre o esqueleto e as cadeias laterais (Morris, 1977; Morris et alii, 1977). Segundo Sanderson (1981), esta conformação ordenada é responsável pelas seguintes propriedades em solução:

- viscosidade alta em repouso e baixa em cisalhamento, como resultado de interações moleculares fracas;
- alta pseudoplasticidade - as soluções altamente cisalhadas têm menor viscosidade devido ao alinhamento progressivo das moléculas rígidas em função do cisalhamento;
- a viscosidade aumenta em presença de sais, os quais estabilizam a conformação de bastão;
- a viscosidade é estável em temperaturas elevadas e também num amplo intervalo de pH;
- apresenta sinergismo com as gomas guar e locusta, provocando um aumento na viscosidade;

As propriedades funcionais acima mencionadas dependem da variedade de *Xanthomonas* utilizada, assim como das condições de fermentação.

Sua aplicação em produtos alimentícios é muito vasta, devido às propriedades e características específicas mencionadas a seguir: produz alta viscosidade, mesmo quando usada em baixas concentrações; é estável em relação ao calor, resistindo a altas temperaturas durante o processamento; tem excelente solubilidade e estabilidade em meio ácido; é estável na presença de sais, principalmente cloreto de sódio; é eficiente como estabilizador de emulsões, evitando a separação da gordura nos sistemas óleo/água; é de natureza altamente pseudoplástica, diminuindo o arraste durante o escoamento; nos embutidos de carnes retém a umidade e evita a exsudação da gordura, também chamado de "encapsulamento branco" (Sanderson, 1981).

A goma xantana também é utilizada na exploração de petróleo, onde auxilia na perfuração durante o processo de extração, evitando que o produto se perca (Wells, 1977). Sua aplicação estende-se à indústria de tintas, inclusive para automóveis, proporcionando uma penetração controlada, o que permite uma melhor eliminação de



água deixando um brilho uniforme (Gonçalves, 1989). Nos extintores de incêndio, graças a sua alta viscosidade a baixa concentração, a goma xantana agregada à espuma melhora a pressão de saída e sua aderência ao objeto alvo. Na indústria têxtil atua como impermeabilizante e ajuda na estampagem. Na linha farmacêutica aparece como complexante de metais: a goma xantana não é absorvida pelo organismo e proporciona a eliminação de compostos tóxicos do intestino. Na cerâmica desempenha um papel importante na desmoldagem das peças e como agente ligante. Nos adesivos, as propriedades reológicas da goma xantana lhes confere uma viscosidade maior em condições de baixo esforço tangencial, além da rápida eliminação da água durante a secagem.

2.1.4. Goma Levana

A levana é um polissacarídeo extracelular produzido por bactérias das mais diversas espécies, como *Bacillus polymyxa* (Han, 1989; Tkachenko e Sevryugina, 1989 e Han e Watson, 1992), *Bacillus subtilis* (Onozaki et alii, 1987), *Zimomonas mobilis* (Mays e Dally, 1988 e Reiss e Hartmeier, 1990), e vários outros como: *Bacillus mesentericus*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Acetobacter suboxydans*, etc. (Tkachenko e Sevryugina, 1989). A produção deste exopolissacarídeo consiste na fermentação de um meio nutritivo para crescimento, adicionado de uma fonte de carbono constituída essencialmente de um açúcar assimilável pelos microrganismos citados acima. A levana é um anidrofructosilfructosídeo, solúvel em água, podendo também ser chamada de polifrutana, pelo fato de estar constituída de moléculas de frutose ligadas em β (1-6). Porém alguns pesquisadores estão voltando sua atenção para o *Bacillus polymyxa* pelo fato dele transformar 40% da fonte de carbono utilizada em levana (Han, 1989). Num trabalho posterior, este mesmo pesquisador utilizou sacarose, caldo de cana e melaços de beterraba como fontes de carbono e constatou que o *Bacillus polymyxa* converteu cerca de 46% da metade frutose da molécula de sacarose para levana. Além de que o caldo de cana e os melaços de beterraba, após filtração em gel, tornavam-se bons substratos para a produção deste polímero (Han & Watson, 1992).



A literatura relata alguns dos possíveis usos práticos da levana para vários propósitos, em medicina, por exemplo, pode ser usado como um complexo biologicamente ativo; como um substituto do plasma sanguíneo; como um agente para prolongar a ação de certas drogas (Tkachenko e Sevryugina, 1989); na preparação de frutose altamente purificada e ainda como um estabilizante de colóides para a indústria de alimentos (Mays & Dally, 1988).

2.1.5. Goma de *Rhizobium*

O gênero *Rhizobia* (*Rhizobium* sp) compreende um dos três gêneros da família *Rhizobiaceae*, caracterizada pela sua capacidade de infetar e induzir a formação de nódulos em raízes de leguminosas. A diferenciação das espécies com o gênero esta baseada no tipo de leguminosa que estas bactérias são capazes de nodular. As Linhagens de Rizóbios capazes de nodular as plantas com um grupo de inoculação cruzada compreende as espécies de *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium trifoli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium japonicum* e *Rhizobium lupini*. As primeiras quatro linhagens são consideradas de crescimento rápido, uma vez que se desenvolvem entre 5 a 7 dias. As outras são consideradas de crescimento lento pois requerem de 9 a 12 dias para atingir a mesma quantidade de crescimento. Esta divisão não é absoluta, já que as diferenças nas taxas ou quantidades de crescimento entre as linhagens pode ser diminuída, mas não completamente eliminada, pela suplementação dos meios de cultura com diferentes fontes de carboidratos, compostos de nitrogênio e extratos orgânicos estimulantes (Burton, 1967).

O *Rhizobium* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia e heterotrófica; cresce bem em extratos de levedura, fermentos, malte e outros extratos de plantas. Possui uma temperatura ótima de crescimento em torno de 30°C e pode reduzir nitratos em nitritos (Sneath et alii, 1986).

Algumas espécies de *Rhizobium* produzem polissacarídeos extracelulares gomosos que poderiam ter algum interesse industrial, uma vez que proporcionam certas



características reológicas às soluções quando dissolvidos em água (Gidley et alii, 1987; Morris et alii, 1990).

Uma análise do polissacarídeo produzido pela linhagem de *Rhizobium leguminosarum phaseoli* mostrou estar composto por D-glicose, D-galactose, ácido D-glicurônico e ácido pirúvico na proporção 5:1:2:2 (Zevenhuizen, 1971). Além disso, nas células das culturas filtradas, foram encontradas β -1,2 glicanas de baixo peso molecular e oligossacarídeos ácidos, os quais podem ser considerados como sendo unidades repetidas de exopolissacarídeos de alto peso molecular (Amemura et alii., 1983, Zevenhuizen & Van Neerven, 1983). Além destes compostos, Hepper (1992) também detectou a presença de acetato e de nitrogênio em linhagens de *Rhizobium trifolii*. Não foi encontrado nenhum tipo de polissacarídeo capsular nestas espécies de *Rhizobium* (Zevenhuizen, 1984).

2.2. Recuperação e purificação dos biopolímeros

Os métodos usados para a recuperação de um exopolissacarídeo dependem das características do microrganismo produtor, do tipo de polissacarídeo e do grau de pureza desejado (Sandford, 1979). O custo desta recuperação é parte significativa do custo total de produção devido, principalmente, à natureza diluída do caldo fermentado, sua alta viscosidade e à presença de contaminantes (células, por exemplo) (Margaritis e Pace, 1985; Sandford, 1979).

Em geral os processos de recuperação têm por objetivos: 1º a concentração do caldo fermentado ou a extração do polímero, resultando em um produto sólido, microbiologicamente estável, de fácil manuseio, transporte e estocagem; 2º sua purificação para reduzir o nível de sólidos, tais como células e sais, melhorando as propriedades funcionais, cor, odor ou paladar do produto; 3º a desativação de enzimas contaminantes indesejáveis como, por exemplo, celulasas e pectinases e, 4º promover modificações nas propriedades químicas do produto para melhorar sua funcionalidade, manuseio, ou



características de dispersão e solubilidade (Margaritis e Pace, 1985; Pace e Righelato, 1980).

Um método que pode ser usado para a recuperação de biopolímeros consiste na concentração do caldo de fermentação através da evaporação da água. Este método é tecnicamente possível e economicamente aceitável, mas tem a desvantagem de proporcionar um produto de qualidade inferior, de coloração intensa, contendo células e compostos que não foram metabolizados. Tais produtos são denominados "crude-grade" ou "industrial-grade" (Godet, 1973; Sandford, 1979).

A recuperação do polissacarídeo também pode ser feita por meio de seu isolamento; este é obtido diminuindo a solubilidade do polímero na fase aquosa dando como resultando um precipitado. Isto sucede devido que a fase aquosa consiste de uma solução concentrada ou coacervado e, a adição de um solvente não miscível em água (não solvente para o polímero), precipitará formando um sal ou um ácido. O método a ser escolhido deve ser determinado do ponto de vista prático, econômico e pela especificação final do produto (Margaritis e Pace, 1985).

Quando da utilização de um solvente para a precipitação, a cor do precipitado obtido e a sua natureza fibrosa, firmeza e solidez, que determinam uma posterior facilidade de manuseio, são afetadas pela eficiência de contato do solvente e pelas condições utilizadas durante o processo de precipitação (Rogovin et alii, 1961; Albrecht et alii, 1963).

Por exemplo, o método preferido para o isolamento da goma xantana parece ser a sua precipitação pela adição de um álcool ao caldo de fermentação (Godet, 1973), sendo a recuperação deste, essencial por razões econômicas (Sandford, 1979). O custo operacional, no caso, é determinado pela quantidade de álcool perdido por peso de produto durante o processamento e o custo de destilação. O volume de álcool necessário para a precipitação da xantana é relativamente independente da concentração de polímero no caldo (Margaritis e Pace, 1985; Pace e Righelato, 1980), mas é afetado pela concentração de certos sais, sendo a quantidade mínima, dependente da força iônica (Williams et alii, 1973; Williams e Wimpenny, 1977; Read e Costerton, 1987). Geralmente a adição de um eletrólito (sal) ajuda na precipitação, neutralizando as cargas no



polissacarídeo (Sandford, 1979). A adição de cloreto de potássio ao caldo, por exemplo, diminui o volume de álcool requerido em cerca de 30%. (Margaritis e Pace, 1985).

Os polissacarídeos ácidos têm a propriedade de combinarem-se com sais quaternários de amônio, formando um precipitado complexo insolúvel, podendo então ser separados do material neutro solúvel (Godet, 1973; Sandford, 1979; Sutherland, 1972).

O polissacarídeo depois de precipitado é removido através de equipamentos convencionais como filtros ou centrifugas e os sólidos obtidos neste estágio de separação são lavados com álcool/água para remover grande parte das impurezas (sais inorgânicos e pigmentos) e então secos à vácuo ou pela passagem forçada de ar quente ou gás inerte (Godet, 1973; Miant et alii, 1978). As condições de secagem devem ser tais que evitem a degradação química, coloração excessiva, ou mudanças na solubilidade do produto. O produto seco é então moído a um tamanho de partícula pré-determinado, sendo esta mais uma etapa onde pode-se controlar a dispersibilidade, hidratação e facilidade de manuseio do produto e, mais uma vez, deve-se ter cuidado para evitar o escurecimento ou degradação do polímero (Cadmus et alii, 1982).

Como os polissacarídeos são higroscópicos por natureza e a umidade pode aumentar durante o transporte e armazenamento, resultando na possibilidade de degradação, também deve ser dada uma atenção especial às características de permeabilidade à água e resistência mecânica dos materiais utilizados para embalagem (Margaritis e Pace, 1985; Pace e Righelato, 1980).

Nas gomas xantana e gelana, o produto final moído, resultante da precipitação com solvente, poderá conter também células não viáveis do microrganismo produtor (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) e, embora este método de recuperação esteja de acordo com a Food and Drug Administration, para obter um produto que possa ser usado em alimentos, denominado "food-grade", muitas vezes a presença de células afeta diretamente a performance destas gomas para uma determinada aplicação, tornando-se essencial sua remoção. Como exemplo, pode-se mencionar a utilização das gomas em produtos visualmente transparentes (cosméticos e alimentos) ou, no caso da goma xantana, durante recuperação de petróleo a presença de células na lama de perfuração poderá causar entupimentos (Sandvik e Maerker, 1977; Sutherland, 1992).



Os caldos de fermentação que contêm polissacarídeos, no entanto, são tipicamente viscosos e as etapas de separação celular tornam-se caras, pois geralmente é necessário diluir o caldo para que sejam obtidos bons resultados práticos (Margaritis e Pace, 1985; Sandford, 1979).

Para a remoção das células das gomas xantana e gelana têm sido propostas algumas técnicas, tais como: diluição do caldo de fermentação, seguida de filtração ou centrifugação e algumas vezes combinada com a floculação das células ou dos sólidos; digestão alcalina das células pela ação de proteases; degradação alcalina, que também pode ocasionar a degradação e de-acetilação do polímero e, por último, a degradação celular com hipoclorito, embora esta oxidação possa resultar em despolimerização (Sanderson, 1990; Silman e Rogovin, 1970; Sutherland, 1972).

A remoção das células, por degradação química ou enzimática, já torna o produto adequado para uso na recuperação de petróleo, mas não para aplicações onde são requeridas soluções límpidas, pois alguns fragmentos celulares podem estar presentes (Margaritis e Pace, 1985).

A filtração ou centrifugação das células pode ser melhorada diminuindo-se a viscosidade do meio também através do aquecimento do caldo de fermentação. No caso da goma xantana, devido ao comportamento incomum da viscosidade de suas soluções com a temperatura, e dependendo da força iônica destas soluções, pode ser necessário o aquecimento à temperatura acima de 100 °C, devendo-se ter cuidado para que não haja degradação do produto (Cadmus et alii, 1982).

A presença de certas enzimas nos cultivos para produção de polissacarídeos pode causar problemas durante o processamento ou imprimir características indesejáveis ao produto final, restringindo, por exemplo, a gama de materiais com os quais é compatível. A presença de atividade celulolítica em certas gomas xantana, comercialmente disponíveis, impossibilita sua utilização em misturas com éteres de celulose, como a carboximetilcelulose. Um método proposto para a inativação da celulase, presente na goma xantana, é o tratamento do precipitado, ainda úmido, com um agente oxidante tal como o óxido de propileno, propiolactona, glutaraldeído ou pivalolactona (Margaritis e Pace, 1985; Pace e Righelato, 1980). Embora a goma xantana apresente em sua estrutura



um esqueleto celulósico não existem evidências de que a celulase de *Xanthomonas* seja capaz de degradá-lo (Pace e Righelato, 1980).

As propriedades físicas e químicas dos polissacarídeos podem ser alteradas significativamente fazendo-os reagir com uma grande variedade de compostos químicos (Margaritis e Pace, 1985; Pace e Righelato, 1980). A capacidade de dispersão da goma xantana, por exemplo, pode ser melhorada por meio da reação com um dialdeído, como o glioxal, o que dará origem a um complexo, inicialmente insolúvel em água e de fácil dispersão. Vagarosamente, no entanto, as ligações xantana-glioxal, são hidrolisadas e o polímero torna-se solúvel (Margaritis e Pace, 1985; Pace e Righelato, 1980).

Outros exemplos de tratamentos químicos que podem ser utilizados incluem: o aquecimento da goma xantana a pH alcalino, por exemplo, pH 11 por 30 minutos, quando o polímero é de-acetilado e a viscosidade das soluções do produto resultante é aumentada com adição de sais (Sloneker e Jeanes, 1962) e no caso da goma gelana promove a formação de géis transparentes (Sutherland, 1992); ligações cruzadas entre xantana e formaldeído, que dão origem a um polímero estável, solúvel em água e de maior viscosidade; um co-polímero entre xantana e poliácridamida, que apresenta propriedades superiores, quando utilizado como aditivo nos processos de recuperação de petróleo, comparado com a xantana pura (Margaritis e Pace, 1985; Pace e Righelato, 1980).

K ₂ PO ₄	5,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
Ácido Cítrico	2,0
H ₃ BO ₃	0,006
ZnO	0,006
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,0024
CaCO ₃	0,2
HCl	0,13 ml

O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH ou HCl antes da esterilização.



3. Material e métodos

3.1. Microrganismos

Para a produção dos polissacarídeos microbianos foram utilizadas as bactérias *Azotobacter vinelandii* (ácido alginico), *Pseudomonas elodea* (goma gelana), *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (goma xantana), *Bacillus polymyxa* (goma levana) e *Rhizobium leguminosarum phaseoli* (polissacarídeo de *Rhizobium*).

3.2. Meio base

O meio base empregado para a produção dos biopolímeros é muito semelhante e consiste basicamente de uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e de sais minerais.

Para a produção de goma xantana e ácido alginico foi utilizado o meio proposto por Souw e Demain (1979), que consistiu, em g/l, de:

KH_2PO_4	5,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
Ácido Cítrico	2,0
H_3BO_3	0,006
ZnO	0,006
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0024
CaCO_3	0,2
HCl	0,13 ml

O pH foi ajustado a 7,0 com NaOH ou HCl antes da esterilização.



Para produção da goma gelana foi utilizado o meio proposto por Kang et alii (1982), o qual contém os seguintes ingredientes (em gramas por litro):

Glicose:	30,0
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$:	0,1
NH_4NO_3 :	0,9
Extrato de Levedura:	0,5
Solução Salina:	1,0 ml

Para produção de levura, o meio base utilizado consistiu dos ingredientes abaixo relacionados (g/l):

A Solução Salina foi preparada em 1 litro de água de-ionizada e contém:

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$:	1,800 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$:	2,487 g
H_3BO_3 :	0,285 g
$CuCl_2$:	27 mg
$ZnCl_2$:	21 mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$:	74 mg
$MgMoO_4$:	23 mg
Tartarato de Sódio:	2.1 g

O pH foi ajustado a 7,0 antes da esterilização. A fonte de carbono foi esterilizada por separado.

3.2 Meio de Produção

O pH foi ajustado a 7,0 com KOH antes da esterilização.

Os meios de Produção foram obtidos por meio da adição de soluções esterilizadas.

Para a produção do polissacarídeo de *Rhizobium leguminosarum phaseoli* foi utilizado o meio de Norris modificado por Vincent (1962) o qual consistiu, em gramas por litros, de:



$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,45

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1

KNO_3 0,6

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01

Biotina 0,0005

Tiamina 0,0005

Extrato de Levedura 3,0

Para produção de levana, o meio base utilizado consistiu dos ingredientes abaixo relacionados (g/l):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0

K_2HPO_4 1,0

KH_2PO_4 5,0

NaCl 0,5

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1

$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01

vitamina do complexo B 0,2% do volume

O pH foi ajustado a 7.0 antes da esterilização. A fonte de carbono foi esterilizada por separado.

3.3. Meio de Produção

Os meios de Produção foram obtidos por meio da adição de soluções esterilizadas da fonte de carbono ao Meio Basal, previamente esterilizado, de modo a fornecer a concentração de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% (peso/volume). As fontes de carbono utilizadas para a produção das gomas foram as indicadas na literatura visando sua substituição pela

sacarose devido à abundância e ao baixo custo no mercado nacional. Cada fonte de carbono foi esterilizada separadamente.

3.4. Meio de Manutenção

As diferentes linhagens bacterianas, exceto *Bacillus polymyxa*, foram mantidas em ágar YM (Jeanes et alii, 1976), cuja fórmula é indicada a seguir (gramas por litro):

Extrato de Levedura	3,0
Extrato de Malte	3,0
Peptona	5,0
Dextrose	10,0
Ágar	20,0

Observação: O meio e a solução da fonte de carbono devem ser esterilizados por separado em autoclave a 121°C por 20 min.

Para manutenção da cultura de *Bacillus polymyxa* foi usado o meio Plate Count Ágar (PCA). A viabilidade da bactéria foi mantida por repicagens periódicas da cultura para um meio recém preparado e, antes da armazenagem, deixou-se crescer por 72 horas a 37°C, isto foi feito para que a cultura sempre estivesse em condições ótimas para ser utilizada.

3.5. Seleção e Propagação da Cultura

As diferentes linhagens foram inoculadas por estrias em esgotamento em placa de ágar YM e incubada a 30°C durante 24h. Após incubação foi realizada a seleção da



colônia mucóide de maior diâmetro sendo transferida para tubos inclinados de ágar YM, que por sua vez, foram incubados por 24 h a 30°C.

3.6. Preparo do inóculo

Depois do crescimento em tubos de ágar inclinado, as diferentes culturas foram suspensas pela adição de 10 ml de água destilada estéril. Esta suspensão de células foi transferida para frascos erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml do Meio de Produção. Após incubação num “Shaker” rotatório a 30°C por 72 h e 210 rpm, o caldo de fermentação foi centrifugado a 8.500 rpm por 20 min. As células foram utilizadas como inóculo e o sobrenadante foi descartado.

Para *Bacillus polymyxa* o inóculo foi preparado utilizando um meio de cultura que promove a esporulação. O meio utilizado foi (g/l):

Extrato de carne	1,5
Extrato de levedura	3,0
Caseinato	4,0
Peptona	4,0
Dextrose	1,0
Sulfato de Manganês	0,3
Ágar	15,0
Água destilada	1000 ml

Acertou-se o pH a 6,5 e distribuiu-se este meio em erlenmeyers inclinados, onde foi inoculada a cultura da bactéria e incubada por sete dias a 37°C. No quinto e no sétimo dia fez-se uma coloração de Gram e de esporos para confirmação da ocorrência da esporulação completa. Os esporos foram conservados em tubos de ensaio contendo 10 ml de água destilada estéril e foram colocados no congelador. A ativação dos esporos para preparação do inóculo foi feita através de um choque térmico.



3.7. Produção dos polissacarídeos

As diferentes formulações dos meios de produção foram inoculadas com cada bactéria de modo a fornecer uma densidade óptica de 0,05 a 650 nm, medida em espectrofotômetro, sendo incubadas, em duplicata, por tempo e temperatura adequados a cada microrganismo.

3.8. Separação e purificação dos polissacarídeos

Os polissacarídeos foram separados do caldo de fermentação por precipitação com três volumes de etanol, depois da remoção das células por centrifugação a 8500 rpm por 20 min. A seguir, a solução foi concentrada por evaporação a vácuo e a goma obtida foi colocada para secar em estufa, também a vácuo, a 45 °C até atingir peso constante. Finalmente foi calculado o rendimento (gramas do polissacarídeo por 100 gramas da fonte de carbono).

3.9. Determinação do crescimento celular

A determinação do crescimento celular foi feita através da quantificação do peso celular seco. Centrifugou-se o caldo de cultura a 8 500 rpm por 20 min. Após retirada do sobrenadante, as células foram transferidas para placas de Petri (10 cm de diâmetro) e procedeu-se a secagem em estufa a 45°C até peso constante.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. Goma Xantana

O carboidrato comumente utilizado para a produção industrial de goma xantana é glicose obtida de amido (Anônimo, 1977). Desde os primeiros estudos dos requerimentos nutricionais das diferentes linhagens de *Xanthomonas*, a glicose tem sido a fonte de carbono normalmente preferida (Leach et alii, 1957; Lilly et alii, 1958). As Tabelas 1 e 2 mostram que a concentração ótima de glicose para a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* nas condições utilizadas em nosso laboratório, foi de 1%. Concentrações de glicose acima de 1% acarretaram diminuição na produção da goma xantana. O aumento da massa celular (peso celular seco), mostrou ser proporcional a quantidade de glicose adicionada ao Meio de Produção. A variação de pH final do meio (pH inicial 7,0), mostrou-se dependente das concentrações de glicose utilizadas sendo que o pH mínimo foi de 3,4 e o máximo de 7,3 (Tabelas 1 e 2). A causa da diminuição do pH do caldo de cultura durante a fermentação é provavelmente devida à formação de ácidos orgânicos, bem como, a presença de grupos pirúvicos, na molécula de xantana (Sandford et alii, 1977).

Em 1979, Souw e Demain demonstraram que maiores rendimentos e viscosidades nas fermentações com *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459, podiam ser obtidos utilizando-se sacarose como fonte de carbono. Devido a grande disponibilidade e baixo custo da sacarose no mercado nacional, foi de nosso interesse verificar sua utilização como fonte de carbono para a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e por *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, respectivamente. As Tabelas 1 e 2 mostram também o efeito das concentrações de sacarose nos parâmetros de fermentação. Pode-se observar que a concentração ótima de sacarose para a produção de goma xantana foi de 1%, e que, a partir desta concentração, o aumento da quantidade de sacarose foi acompanhado por uma diminuição na quantidade da goma produzida. Nestes experimentos, portanto, concentrações acima de 1% acarretaram a queda da produção de goma xantana. Observa-se também que, o aumento da massa celular depende diretamente



da concentração de sacarose utilizada, até a concentração de 5%. Concentrações superiores não foram testadas. A variação de pH final do meio (pH inicial 7,0) mostrou ser dependente da quantidade de sacarose utilizada, sendo que o pH máximo de 7,3 foi obtido para uma concentração de 1% e o pH mínimo 4,6 foi obtido para uma concentração de 5%.

Tabela 1. Efeito da adição de glicose e sacarose nos parâmetros de fermentação durante a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a 30°C durante 96h e 210 rpm.

Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento (%)	pH
Glicose				
1,0	2,50	3,801	38,01	7,0
2,0	2,70	4,202	21,01	6,4
3,0	2,70	4,203	13,01	6,4
4,0	2,80	4,252	10,63	4,2
5,0	3,00	4,730	9,46	3,4
Sacarose				
1,0	2,85	3,905	39,05	7,0
2,0	3,08	5,517	27,59	6,4
3,0	3,07	5,837	19,46	6,2
4,0	3,80	6,025	15,06	5,6
5,0	3,89	6,173	12,35	5,3

Para as mesmas concentrações de glicose ou sacarose, a quantidade de goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* ou por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* foi praticamente igual (Tabelas 1 e 2). Souw e Demain (1979)



utilizando *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459 verificaram também isto mesmo, quando da substituição da glicose por sacarose.

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados do efeito das diferentes concentrações de glicose e sacarose nos parâmetros de fermentação. Nestas Tabelas, quando comparados os resultados obtidos à concentração de 1% tanto de glicose quanto de sacarose, observa-se que o uso de sacarose como fonte de carbono favorece mais o aumento da massa celular do que a utilização de glicose; pois obteve-se 2,85 g/l para sacarose e 2,50 g/l para glicose (peso celular seco) para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e 2,30 g/l para sacarose e 2,00 g/l para glicose para *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*.

Tabela 2. Efeito da adição de glicose e sacarose nos parâmetros de fermentação durante a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* a 30°C durante 96h e 210 rpm.

Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento (%)	pH
Glicose				
1,0	2,00	4,106	41,06	7,3
2,0	1,90	4,808	24,04	7,1
3,0	2,00	6,026	20,12	6,8
4,0	2,30	2,816	7,08	5,9
5,0	2,60	3,250	6,50	4,2
Sacarose				
1,0	2,30	4,200	42,00	7,3
2,0	2,50	6,700	33,50	6,6
3,0	2,70	6,138	21,06	5,6
4,0	2,70	5,040	12,60	5,0
5,0	2,80	5,530	11,06	4,6



Em termos de produção, ambas fontes de carbono produzem aproximadamente a mesma quantidade de goma xantana (3,801 g/l e 3,905 g/l para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e, 4,106 g/l e 4,200 g/l para *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, respectivamente). Comportamentos similares foram obtidos por Leach et alii (1957) e Souw e Demain (1979) utilizando, respectivamente, *Xanthomonas phaseoli* e *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459.

Com base nos resultados das Tabelas 1 e 2, escolheu-se sacarose à uma concentração de 1% como fonte de carbono para o estudo do efeito da adição de ácidos orgânicos e fontes de nitrogênio ao Meio Basal. A decisão foi feita, com base no rendimento obtido.

De acordo com Souw e Demain (1979), a adição de concentrações adequadas dos ácidos orgânicos pirúvico, succínico e α -ceto-glutárico ao Meio de Produção podem estimular a produção de goma xantana. Para se determinar as concentrações ótimas destes compostos no Meio de Produção contendo 1% de sacarose, foram adicionadas diferentes concentrações dos ácidos acima mencionados e os resultados obtidos para as duas espécies de bactérias testadas podem ser observados nas Tabelas 3 e 4. Estas Tabelas mostram que existe um ótimo de concentração do ácido orgânico para a produção de goma xantana. Verifica-se também que quando atingida a máxima produção de goma xantana, não necessariamente se alcança o máximo de crescimento celular. Isto também foi observado por Souw e Demain (1979).

Souw e Demain (1979) obtiveram valores máximos de rendimento pela adição de 0,75% de ácido pirúvico ao Meio de Produção. Em nosso experimento a concentração ótima de ácido pirúvico adicionado ao meio de produção foi de 0,25% para *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e de 0,50% para *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Isto evidencia diferenças dos requerimentos nutricionais entre estas espécies de *Xanthomonas*, uma vez que estas mesmas foram submetidas às mesmas condições de cultura. Com relação aos ácidos succínico e α -ceto-glutárico os resultados obtidos para ambas as espécies foi pouco expressivo e podem ser observados nas Tabelas 3 e 4.



Souw e Demain (1979) observaram que na ausência do carboidrato, estes ácidos orgânicos podem ser utilizados como fonte de carbono permitindo o aumento da massa celular, mas nessas condições, não ocorre produção de goma xantana. Isto não foi testado.

TABELA 3. Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* a 30°C durante 96h e 210 rpm.

Fatores de Crescimento	Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento (%)
Ácido succínico	0,10	2,356	3,512	35,12
	0,25	2,314	4,030	40,30
	0,50	2,630	4,240	42,40
	0,75	3,314	4,349	43,49
	1,00	3,460	4,038	40,38
Ácido pirúvico	0,10	2,365	4,220	42,20
	0,25	2,341	4,337	43,37
	0,50	2,330	4,983	49,83
	0,75	2,260	4,059	40,59
	1,00	2,250	3,512	35,12
Ácido α -ceto-glutárico	0,10	2,230	3,221	32,21
	0,25	2,520	3,424	34,24
	0,50	2,750	3,594	35,94
	0,75	2,700	3,573	35,73
	1,00	2,725	3,505	35,05



TABELA 4. Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a 30°C durante 96h e 210 rpm.

Fatores de Crescimento	Concentração %	Peso Celular seco (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento (%)
Ácido succínico	0,10	1,870	2,742	27,42
	0,25	1,978	2,931	29,31
	0,50	2,032	3,014	30,14
	0,75	2,058	3,091	30,91
	1,00	2,025	3,042	30,42
Ácido pirúvico	0,10	1,858	3,895	38,95
	0,25	2,102	4,637	46,37
	0,50	2,120	4,119	41,19
	0,75	2,285	3,987	39,87
	1,00	2,345	3,791	37,91
Ácido α -ceto-glutárico	0,10	1,878	2,938	29,38
	0,25	2,023	3,142	31,42
	0,50	2,245	3,327	33,27
	0,75	2,354	3,450	34,50
	1,00	2,412	3,428	34,28

Para estudar o efeito das diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção da goma xantana, a fonte de carbono utilizada também foi sacarose na concentração de 1%. As fontes testadas foram nitrato de sódio e sulfato de amônio já contido no meio Basal. As



concentrações estudadas foram 10, 30, 50 e 70 mM. A influência das diferentes concentrações destas fontes de nitrogênio nos parâmetros de fermentação podem ser observados nas Tabelas 5 e 6.

TABELA 5. Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* a 30°C durante 96h e 210 rpm.

Fontes de Nitrogênio	Concentração (mM)	Peso Celular seco (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento (%)
(NH₄)₂SO₄				
	10	0,165	0,215	21,50
	30	0,165	0,210	27,90
	50	0,210	0,363	36,30
	70	0,190	0,168	16,80
NaNO₃				
	10	0,137	0,4200	42,00
	30	0,110	0,3650	36,50
	50	0,099	0,3738	37,38
	70	0,090	0,3218	32,18

Quando da adição das fontes de nitrogênio, foi observado para o sulfato de amônia que a medida que aumentou a concentração, houve também um aumento na produção de goma xantana até a concentração de 50 mM e, concentrações maiores provocaram uma diminuição na produção, o mesmo não foi observado em relação ao crescimento celular (Tabelas 5 e 6).



TABELA 6. Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* a 30°C durante 96h e 210 rpm.

Fontes de Nitrogênio	Concentração (mM)	Peso Celular seco (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	0,176	0,221	22,10
	30	0,231	0,287	28,70
	50	0,280	0,346	34,60
	70	0,219	0,216	21,60
NaNO ₃	10	0,153	0,4200	42,00
	30	0,109	0,3650	36,50
	50	0,109	0,3738	37,38
	70	0,106	0,3218	32,18

Para o nitrato de sódio a maior produção se deu com a adição de 10 mM, sendo esta a melhor concentração para a produção de goma xantana e também para proporcionar o maior crescimento celular. Concentrações de NaNO₃ acima desta concentração ótima, inibiram tanto a produção de goma xantana quanto o crescimento celular. (Tabelas 5 e 6).

Dos experimentos realizados, foram obtidos os maiores rendimentos (49,83%) de goma xantana quando se usou o meio de Produção contendo 1% de sacarose e 0,50% de ácido pirúvico utilizando *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* e 46,37% para *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, quando foi utilizado o meio acima contendo 0,25% de ácido pirúvico, rendimentos estes, comparáveis aos obtidos por Cadmus et alii (1978) e Souw e Demain (1979)



Cadmus et alii (1978) indicaram que o maior rendimento obtido em um meio químico complexo contendo sólidos secos solúveis de destilaria, o rendimento aumentou para 65%. Souw e Demain (1979) relataram um rendimento de 70% quando usaram um meio químico definido com 4% de sacarose e 1,0% de ácido succínico. É interessante frisar, que as culturas utilizadas em nossos experimentos foram *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, e que as culturas usadas por Cadmus et alii (1978) e Souw e Demain (1979), foram em ambos os casos *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459 geneticamente selecionadas (Kidby, 1977; Kidby et alii, 1977) e as temperaturas por eles utilizadas foram 27-28 e 25°C respectivamente. Possivelmente, a isto se deve a diferença dos resultados obtidos, já que, a temperatura utilizada em nossos experimentos (30°C), de acordo com Cadmus et alii (1978), acelera o crescimento, bem como, a síntese do biopolímero, mas, o conteúdo de piruvato é reduzido, afetando a qualidade da goma (Sandford et alii, 1977).

4.2. Polissacarídeo de *Rhizobium*

A bactéria utilizada foi *Rhizobium leguminosarum phaseoli*, esta bactéria é considerada de crescimento rápido pelo fato de se desenvolver completamente entre 5 e 7 dias (Burton, 1967). Entretanto este tempo de crescimento pode ser diminuído com a suplementação ao meio de cultura de diferentes carboidratos, alguns compostos de nitrogênio e outros estimulantes orgânicos. Neste estudo foi testado o efeito da adição de diferentes fontes de carbono no meio de produção. As fontes de carbono utilizadas foram: sacarose, manitol, lactose e glicose nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0% e os resultados são mostrados na Tabela 7.

Para determinar o efeito da adição de manitol ao meio de produção foi verificado o crescimento bacteriano e a produção do polissacarídeo. A produção do polissacarídeo foi influenciada grandemente pela concentração de manitol no meio de produção. O maior rendimento foi obtido na concentração de 3,0%; concentrações maiores não promoveram



Tabela 7. Efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos parâmetros de fermentação durante a produção de polissacarídeo por *Rhizobium leguminosarum phaseoli*, a 30°C durante 168 horas e 210 rpm.

Fontes de Carbono	Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Polissacarídeo (g/l)	Rendimento (%)
Sacarose	1,0	0,301	0,200	2,00
	2,0	0,514	0,610	3,05
	3,0	0,530	2,235	7,45
	4,0	0,621	2,920	7,30
	5,0	0,526	3,310	6,62
Manitol	1,0	0,556	0,812	8,12
	2,0	0,601	1,838	9,19
	3,0	0,706	4,125	13,75
	4,0	0,852	5,388	13,47
	5,0	1,000	6,900	13,80
Lactose	1,0	0,323	0,206	2,06
	2,0	0,468	0,736	3,68
	3,0	0,615	1,428	4,76
	4,0	0,822	1,900	4,75
	5,0	0,830	2,535	5,07
Glicose	1,0	0,305	0,420	4,20
	2,0	0,4520	1,130	5,65
	3,0	0,503	2,571	8,57
	4,0	0,704	3,092	7,73
	5,0	0,753	3,800	7,60



nenhum aumento na produção do polissacarídeo. Na Tabela 7 observa-se também que, a massa celular aumenta na medida que aumenta a concentração de manitol.

Em relação as outras fontes de carbono, apenas glicose na concentração de 3,0% mostrou estimular a produção do polissacarídeo; sacarose e lactose não promoveram a produção do polissacarídeo. Em geral, pode ser observado (Tabela 7) que, o aumento da concentração da fonte de carbono promoveu um aumento da massa celular e que, um maior crescimento bacteriano não proporciona altos rendimentos do polissacarídeo.

Das fontes de carbono testadas, como pode ser observado na Tabela 7, o manitol na concentração de 3% foi a que apresentou os melhores resultados. Esta concentração foi utilizada como base para estudos posteriores.

A possibilidade de aumentar o rendimento da produção do polissacarídeo nas culturas bacterianas pela adição de algum intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos foi tentada pela primeira vez em 1954 por Greathouse e colaboradores. Estes pesquisadores estudaram o efeito da adição de acetato, citrato e succinato na produção de celulose por *Acetobacter xylinum*; a partir destes estudos, muitos outros pesquisadores fizeram esta mesma tentativa. Desta forma, neste estudo foi testado o efeito da adição dos ácidos succínico, pirúvico e α -ceto-glutárico no meio de produção utilizado pela bactéria *Rhizobium leguminosarum phaseoli* e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 8.

Desta Tabela 8 pode ser observado que apenas o ácido succínico foi eficiente para aumentar a produção do polissacarídeo. Pode-se observar que as concentrações menores de ácido promoveram os melhores rendimentos (0,10 e 0,25%). Observa-se também que concentrações maiores deste ácido promoveram um aumento no crescimento.

Os ácidos pirúvico e α -ceto-glutárico não estimularam a produção de polissacarídeos. Com o ácido pirúvico observa-se apenas uma tendência de aumento da massa celular e com o ácido α -ceto-glutárico o crescimento permaneceu constante.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos do efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de produção contendo 3% de manitol. A produção do polissacarídeo por *Rhizobium leguminosarum phaseoli* transcorreu durante 7 dias a 30°C e 210 rpm.



Tabela 8. Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 3,0% de manitol, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de polissacarídeo por *Rhizobium leguminosarum phaseoli* a 30°C durante 168 horas e 210 rpm.

Fatores de Crescimento	Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Polissacarídeo (g/l)	Rendimento (%)
Ácido pirúvico	0,10	0,718	1,824	6,08
	0,25	0,918	1,935	6,45
	0,50	1,319	1,893	6,31
	1,00	1,425	1,899	6,33
	1,50	1,513	1,908	6,36
	2,00	1,519	1,887	6,29
Ácido succínico	0,10	0,819	4,218	14,06
	0,25	1,091	4,635	15,45
	0,50	1,252	4,593	15,31
	1,00	1,392	4,638	15,46
	1,50	1,427	4,101	13,67
	2,00	1,622	3,870	12,90
Ácido α -ceto-glutárico	0,10	0,655	1,659	5,53
	0,25	0,663	1,989	6,63
	0,50	0,681	1,743	5,81
	1,00	0,632	1,521	5,07
	1,50	0,621	1,515	5,05
	2,00	0,627	1,518	5,06



Tabela 9. Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 3,0% de manitol, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de polissacarídeo por *Rhizobium leguminosarum phaseoli*, a 30°C durante 168 horas e 210 rpm.

Fontes de Nitrogênio	Concentração (mM)	Peso Celular seco (g/l)	Polissacarídeo (g/l)	Rendimento (%)
NaNO₃				
	10	0,498	4,098	13,66
	30	0,525	4,599	15,33
	50	0,621	6,698	15,66
	70	0,675	4,398	14,66
KNO₃				
	10	0,652	3,699	12,33
	30	0,672	4,548	15,16
	50	0,715	4,731	15,77
	70	0,762	3,999	13,33
(NH₄)₂SO₄				
	10	0,556	3,180	10,60
	30	0,650	3,519	11,73
	50	0,695	3,447	11,49
	70	0,725	3,351	11,17

A concentração ótima de nitrogênio foi encontrada pela comparação do crescimento da cultura no meio de produção com 3,0% de manitol contendo 10; 30; 50 e 70 mM de NaNO₃; KNO₃ e (NH₄)₂SO₄, respectivamente. A concentração do nitrogênio adicionado ao meio de produção afeta de forma diferente o rendimento do polissacarídeo e o crescimento bacteriano. Em geral, foi observado que o crescimento bacteriano



aumenta com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio, enquanto que, os rendimentos do polissacarídeo foram maiores nas culturas com baixas concentrações.

Este comportamento esta de acordo com os primeiros estudos realizados por Davis e Clapp (1961) para *Rhizobium meliloti*, bem como para outras bactérias (Duguid e Wilkinson, 1953; Wilkinson et alii, 1954; Dudman, 1959; 1964). Parece que a síntese do polissacarídeo sucede sem crescimento simultâneo e portanto os maiores rendimentos ocorrem nos meios onde o crescimento encontra-se limitado devido a falta de nitrogênio e excesso da fonte de carbono.

4.3. Ácido Algínico.

Na Tabela 10 podem ser observados os resultados obtidos durante a produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii* utilizando várias fontes de carbono com incubação de 96h a 30°C e 210 rpm. Nesta Tabela 10, pode se observar que a produção de ácido algínico foi maior na concentração de 1% de glicose, pode-se observar também, que na medida que a concentração de glicose aumenta ocorreu uma diminuição na produção do polissacarídeo. Com relação ao crescimento observa-se que ocorre um ligeiro aumento no crescimento até a concentração do 4% diminuindo já na concentração de 5%.

Comparando estes parâmetros podemos observar que a máxima produção não ocorre com o maior crescimento. Portanto a bactéria utiliza mais glicose para produção do polissacarídeo do que para o crescimento.

Alguns estudos (Horan et alii, 1981; Chen et alii, 1985) têm sugerido a sacarose como uma boa fonte alternativa de carbono para produção de alginato, mas neste estudo os resultados para produção do polissacarídeo e o crescimento celular foram pobres. Isto também foi observado por Brivonese e Sutherland (1989). Nesta mesma Tabela 10, pode se observar que a produção foi maior na concentração de 1% de sacarose e a partir desta o rendimento diminuiu uniformemente. Com relação ao crescimento celular nota-se que



Tabela 10. Efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos parâmetros de fermentação durante a produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii* a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.

Fontes de Carbono	Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Rendimento (%)
Glicose			
	1,0	1,374	14,28
	2,0	1,300	11,75
	3,0	2,000	7,17
	4,0	2,028	6,50
	5,0	1,860	6,10
Sacarose			
	1,0	1,440	8,44
	2,0	1,466	7,25
	3,0	1,494	6,35
	4,0	2,298	4,56
	5,0	2,874	3,62
Lactose			
	1,0	0,262	5,26
	2,0	0,916	3,87
	3,0	0,792	3,12
	4,0	0,458	2,07
	5,0	0,932	1,45
Frutose			
	1,0	1,734	3,86
	2,0	2,020	2,76
	3,0	2,700	2,45
	4,0	2,830	2,68
	5,0	2,890	2,13



permanece aproximadamente constante até a concentração de 3%, tendo uma tendência de aumento a partir desta concentração.

Como no caso da glicose, podemos observar que, quando da utilização de sacarose a máxima produção não ocorre com o maior crescimento, e com isso pode-se dizer, que a bactéria utiliza mais sacarose para produção do polissacarídeo do que para o crescimento.

Durante a biossíntese de alginato em culturas "Batch", Horan et alii (1981) e Chen et alii (1985) observaram que a secreção do polissacarídeo continua após que o crescimento cessa. Entretanto, Deavin et alii (1977) observaram que a síntese de alginato é paralela ao crescimento. Esta aparente contradição, deve-se as linhagens utilizadas, uma vez que, o mesmo fenótipo pode mostrar uma ou várias mutações diferentes durante o período de incubação. Por exemplo, a linhagem aqui estudada prefere glicose em lugar de qualquer uma das outras fontes testadas (Tabela 10), em contraste com o microrganismo utilizado por Chen et alii (1975), embora de acordo com Brivonese e Sutherland (1989).

Estudos realizados por Anderson et alii (1987) mostraram que *Azotobacter vinelandii* pode assimilar glicose ou frutose por duas vias diferentes e desta forma, algumas linhagens serão capazes de crescer em várias fontes de carbono.

Foram testadas também lactose e frutose como fontes de carbono. Quando da utilização de lactose, pode-se observar que a produção de ácido algínico foi maior na concentração de 1,0% e após esta concentração, nota-se que a medida que a concentração de lactose aumenta ocorre uma diminuição no rendimento. Com relação ao crescimento pode ser observado um comportamento praticamente constante em todas as concentrações utilizadas, também pode ser destacado que a glicose e a sacarose, estimulam mais o crescimento do que a lactose (Tabela 10).

Quando a frutose foi utilizada como fonte de carbono, observa-se que a produção de ácido algínico foi pobre e praticamente constante para todas as concentrações utilizadas. Com relação ao crescimento pode ser observado que a medida que aumenta a concentração o crescimento vai aumentando paulatinamente. O efeito sobre o pH do meio de cultura, quando da utilização de frutose pelo microrganismo, foi o mais acentuado do que com as outras fontes testadas (resultados não mostrados).



Tabela 11. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de produção contendo 1,0% de glicose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii*, a 30°C durante 96 horas a 210 rpm.

Fontes de Nitrogênio	Concentração (mM)	Peso Celular seco (g/l)	Rendimento (%)
NaNO ₃	10	1,592	12,76
	30	1,192	12,38
	50	1,028	11,90
	70	0,908	9,82
KNO ₃	10	1,492	11,86
	30	1,182	11,18
	50	1,127	11,19
	70	0,988	11,22
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	2,326	13,52
	30	1,804	13,88
	50	1,782	12,72
	70	1,120	11,12

Em geral, a produção de polissacarídeos por bactérias é maior num meio pobre em nitrogênio, entretanto, a cultura de *Azotobacter vinelandii* aqui utilizada mostrou-se contrária a este comportamento. Isto pode refletir segundo Brivonese e Sutherland (1989), uma demanda maior da energia requerida durante, especificamente, demanda por ATP, o processo de fixação. Isto está de acordo com o observado para *Agrobacterium radiobacter* (Linton et alii, 1987), *Klebsiella aerogenes* (Neijssel e Tempest, 1975) e *Azotobacter vinelandii* (Brivonese e Sutherland, 1989).



Na Tabela 11 estão representados os resultados obtidos durante a produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii* por incubação a 30 °C durante 96 horas e 210 rpm, variando as concentrações das fontes de nitrogênio. Quando da utilização de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio observa-se que a produção de ácido algínico foi praticamente igual em todas as concentrações testadas e que mesmo concentrações maiores de nitrogênio a bactéria não consegue utilizar. Em relação ao crescimento observa-se que a medida que aumenta a concentração da fonte de nitrogênio o crescimento diminuiu de forma constante.

Quando da utilização de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio durante a produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii* observa-se que a produção de ácido algínico permaneceu aproximadamente constante. O crescimento teve uma tendência de queda em todas as concentrações.

Em geral, pode-se observar que o aumento na concentração das fontes de nitrogênio não promoveu um aumento no rendimento do ácido algínico produzido pelo microrganismo e tem, ainda, um efeito negativo no crescimento, este fato também foi observado por Brivonese e Sutherland (1989).

Durante a produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii* foram testados também alguns fatores de crescimento e os resultados estão demonstrados na Tabela 12. O ácido α -ceto-glutárico teve o melhor rendimento para a produção do ácido algínico na concentração de 0,5%. Com relação ao crescimento a concentração de 0,1% apresentou maior crescimento ocorrendo depois uma diminuição que permaneceu constante durante todas as concentrações testadas. Com relação ao pH a medida que a concentração de ácido α -cetoglutárico aumenta o pH vai diminuindo. Em relação ao ácido pirúvico observa-se que não estimulou nem a produção de ácido algínico nem o crescimento. O pH diminui a medida que aumentou a concentração de ácido pirúvico. Quando da utilização de ácido succínico para produção de ácido algínico por *Azotobacter vinelandii* pode-se observar que a concentração de 0,5%, foi a melhor e não houve diferença às concentrações. Com relação ao crescimento pode-se observar que não houve aumento da massa celular. O pH diminui a medida que a concentração de ácido succínico aumenta.



Tabela 12. Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 1,0% de glicose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de ácido alginico por *Azotobacter vinelandii*, a 30°C durante 96 horas e 210 rpm.

Fatores de Crescimento	Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Rendimento (%)
Ácido α -ceto-glutárico			
	0,10	1,486	6,40
	0,25	1,424	8,02
	0,50	1,235	9,20
	0,75	1,225	7,66
	1,00	1,228	5,36
Ácido pirúvico			
	0,10	1,928	1,80
	0,25	1,926	3,90
	0,50	1,826	3,95
	0,75	1,628	3,06
	1,00	1,554	2,95
Ácido succínico			
	0,10	0,510	7,68
	0,25	0,532	9,24
	0,50	0,552	10,28
	0,75	0,545	10,52
	1,00	0,535	10,32



4.4. Goma Gelana

A glicose tem sido apontada por muitos pesquisadores como a fonte de carbono preferida pela maior parte das diferentes linhagens de bactérias produtoras de polissacarídeos. Portanto, desde os primeiros estudos desenvolvidos por Leach et al. (1957) e Lilly et al. (1958) até trabalhos mais recentes, como os já clássicos de Souw e Demain (1979); Pace e Righelato, 1980 e Margaritis e Pace (1985), a glicose é a primeira fonte de carbono a ser testada durante as pesquisas dos requerimentos nutricionais das bactérias. A literatura relata que a bactéria *Pseudomonas elodea* utiliza manitol como principal fonte de carbono para crescimento e produção de goma gelana. Nesta pesquisa foi observado o efeito de diferentes concentrações de manitol, glicose e sacarose sobre os parâmetros de fermentação. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 13. Nesta Tabela pode-se observar que, das fontes de carbono utilizadas, o manitol mostrou ser mais eficiente para a produção do polissacarídeo nas concentrações de 1,0 e 2,0%, proporcionando um rendimento de 44,26 e 48,61%, respectivamente. Também pode ser observado que o maior crescimento bacteriano não significou uma maior produção do polissacarídeo, uma vez que este correspondeu à concentração de 5,0% de manitol.

Quando testada glicose foi observado que a maior produção do polissacarídeo correspondeu a concentração de 3,0%, proporcionando um rendimento de 52,00%. Aqui foi observado também que o crescimento bacteriano foi praticamente constante em todas as concentrações de glicose utilizadas (Tabela 13).

Nesta Tabela 13 esta representado o efeito das diferentes concentrações de sacarose sobre os parâmetros de fermentação; pode-se observar que a concentração ótima de sacarose para produção de gelana foi de 1,0% e o rendimento obtido foi de 40,40%. Assim como observado para manitol, a concentração de sacarose que produziu a maior quantidade de goma gelana (4,04g/l) não correspondeu à concentração que promoveu o maior crescimento. Nesta mesma Tabela 13, observa-se que o crescimento bacteriano é proporcional à concentração da fonte de carbono utilizada até 4,0% e logo após começa a ter uma diminuição. Estes resultados são muito significativos, já que, devido a grande disponibilidade e baixo custo da sacarose no mercado nacional, este carboidrato poderá se



Tabela 13. Efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos parâmetros de fermentação durante a produção de goma gelana por *Pseudomonas elodea*, a 30°C durante 72 horas e 210 rpm.

Fontes de Carbono	Concentração (%)	Goma Gelana (g/l)	Peso Celular seco (g/l)	Rendimento (%)
Manitol				
	1,0	4,426	0,402	44,26
	2,0	9,723	1,107	48,61
	3,0	14,421	0,761	48,07
	4,0	22,400	0,664	56,00
	5,0	24,337	1,203	48,67
Glicose				
	1,0	2,360	0,513	23,60
	2,0	8,600	0,566	43,00
	3,0	15,670	0,681	52,00
	4,0	12,410	0,601	31,03
	5,0	11,550	0,591	23,10
Sacarose				
	1,0	4,040	0,850	40,40
	2,0	7,242	0,872	36,21
	3,0	11,890	0,951	39,63
	4,0	10,350	1,260	25,88
	5,0	14,250	0,995	28,50



tornar uma boa alternativa para produção de goma gelana por *Pseudomonas elodea* em substituição ao manitol. Desta forma, foi escolhida a sacarose na concentração de 1,0% para verificar o efeito da adição de fatores de crescimento e de fontes de nitrogênio.

Na Tabela 14 podem ser observados os resultados obtidos quando da adição dos ácidos pirúvico, succínico e α -ceto-glutárico ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose. Dos fatores de crescimento adicionados apenas o ácido pirúvico na concentração de 0,5%, promoveu o aumento na produção do polissacarídeo pela bactéria, até níveis comparáveis aos obtidos com a utilização de manitol (2,0%) sem adição de ácido pirúvico (Tabela 13 e Tabela 14).

Com relação ao crescimento, observa-se um pequeno aumento e neste caso, o maior crescimento foi o que promoveu a maior produção (Tabela 14), também pode-se observar que, logo após atingir este crescimento máximo, com o aumento da concentração do ácido pirúvico ao meio de produção, ocorreu uma diminuição do crescimento. A adição dos ácidos succínico e α -ceto-glutárico ao meio de produção inibiram o crescimento e a produção do polímero pela bactéria *Pseudomonas elodea*. (Tabela 14).

A Tabela 15 mostra o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose. Desta, observa-se que a melhor performance para produção do polissacarídeo foi do sulfato de amônia na concentração de 70 mM, as outras fontes testadas não foram eficientes para promover o aumento do rendimento do polissacarídeo, apenas estimularam o crescimento bacteriano. Este mesmo comportamento foi observado para várias bactérias, onde altos crescimentos não foram capazes de promover altos rendimentos do polissacarídeo (Dudman, 1959).



Tabela 14. Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 1,0% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma gelana por *Pseudomonas elodea*, a 30°C durante 72 horas e 210 rpm.

Fatores de crescimento	Concentração (%)	Goma Gelana (g/l)	Peso Celular seco (g/l)	Rendimento (%)
ácido pirúvico				
	0,10	4,026	0,846	40,26
	0,25	4,168	1,240	41,68
	0,50	4,758	1,564	47,58
	0,75	4,236	1,765	42,36
	1,00	4,007	1,694	40,07
Ácido succínico				
0,10	0,10	2,868	0,651	28,68
0,25	0,25	3,085	0,665	30,85
0,50	0,50	3,150	0,786	31,50
0,75	0,75	3,138	0,814	31,38
1,0	1,00	3,023	0,838	30,23
Ácido α -ceto-glutárico				
	0,10	2,521	0,851	25,21
	0,25	2,731	0,872	27,31
	0,50	2,996	0,895	29,96
	0,75	2,896	0,966	28,89
	1,00	2,854	0,998	28,54



Tabela 15. Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 1% de sacarose, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de goma gelana por *Pseudomonas elodea*, a 30°C durante 72 horas e 210 rpm.

Fontes de Nitrogênio	Concentração (%)	Goma Gelana (g/l)	Peso Celular seco (g/l)	Rendimento (%)
NaNO₃				
	10	3,466	1,104	34,66
	30	3,748	1,176	37,48
	50	3,780	1,710	37,80
	70	3,665	1,766	36,65
KNO₃				
	10	3,326	1,576	33,26
	30	3,337	1,669	33,37
	50	3,258	1,687	32,58
	70	3,210	1,760	32,10
(NH₄)₂SO₄				
	10	3,006	1,580	30,06
	30	3,562	1,785	35,62
	50	3,660	1,795	36,60
	70	3,650	1,809	36,50



4.5. Goma Levana

A Tabela 16 mostra o efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos parâmetros de fermentação durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa* após incubação durante 120 horas a 37°C. Nesta Tabela 16 pode ser observado que quando da adição de sacarose a concentração ótima para produção do polissacarídeo foi de 1 %, também pode-se observar que na medida em que a concentração aumenta há uma diminuição constante da produção de levana até a concentração testada.

Com relação ao crescimento celular o efeito observado é contrário à produção, quer dizer, na medida em que aumenta a concentração da sacarose aumenta também o crescimento celular.

Na Tabela 16 também está representado o efeito das diferentes concentrações de glicose sobre os parâmetros de fermentação durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa* e pode-se observar que a utilização de glicose a 1 % foi a melhor concentração para a produção de levana; concentrações acima promoveram uma queda brusca na produção.

Com relação ao crescimento celular, pode ser observado que este aumenta na medida em que aumenta a concentração da glicose.

Quando foi testado o efeito de diferentes concentrações de lactose nos parâmetros de fermentação durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa* observa-se que a maior produção de levana foi na concentração de 1% e que a produção do polissacarídeo não aumenta, mesmo com o aumento da concentração de lactose. Com relação ao crescimento, pode ser observado que na medida em que a concentração da lactose aumenta, aumenta também a quantidade da massa celular

Quando foram testadas diferentes concentrações de frutose no meio para produção de levana por *Bacillus polymyxa* observa-se que a concentração de 1% foi a melhor para produzir levana e concentrações maiores diminuíram esta mesma produção. Em relação ao crescimento, pode-se observar que este mesmo foi aumentando paralelamente à concentração da fonte de carbono. Isto também foi observado por Tkachenko e Sevryugina (1989).



Tabela 16. Efeito da adição de diferentes fontes de carbono nos parâmetros de fermentação durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa*, a 37°C durante 120 horas e 210 rpm.

Fontes de Carbono	Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Goma Levana (g/l)	Rendimento (%)
Sacarose	1,0	0,516	0,7300	7,30
	2,0	0,739	1,252	6,29
	3,0	0,788	1,509	5,03
	4,0	0,992	1,780	4,45
	5,0	1,342	1,815	3,63
Manitol	1,0	0,812	1,484	14,84
	2,0	1,016	2,066	10,33
	3,0	1,060	2,745	9,15
	4,0	1,740	3,756	9,39
	5,0	2,060	4,955	9,91
Lactose	1,0	0,402	0,736	7,36
	2,0	0,492	1,148	5,74
	3,0	0,554	1,242	4,14
	4,0	0,866	1,824	4,56
	5,0	0,905	2,275	4,55
Frutose	1,0	0,724	1,074	10,74
	2,0	1,740	1,718	8,59
	3,0	2,098	2,028	6,76
	4,0	2,240	1,780	4,45
	5,0	2,440	2,180	4,36
Glicose	1,0	1,378	1,046	10,46
	2,0	1,546	2,008	10,04
	3,0	1,676	2,811	9,37
	4,0	1,898	3,536	8,84
	5,0	2,080	3,335	6,67



Da Tabela 16 pode ser observada a tendência geral de aumento da massa celular na medida em que a concentração da fonte de carbono aumenta; pode ser também observado que este crescimento é progressivamente lento. Com relação à produção de levana observa-se que na medida em que aumenta a concentração da fonte de carbono não houve qualquer acréscimo à produção e pode-se observar sempre uma tendência de queda. Pode-se observar também que a melhor concentração para a produção de levana foi de 1%. Em termos gerais, o manitol demonstrou ser a melhor fonte de carbono para produção de levana (Tabela 16). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Tkachenko e Sevryugina (1989), uma vez que, estes pesquisadores observaram, durante a biossíntese de levana por *Bacillus polymyxa*, que o manitol promoveu um aumento da biomassa e estimulou a produção de levana. A frutose, no entanto, apenas promoveu um aumento da biomassa.

A Tabela 17 mostra o efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 1,0% de manitol, durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa*, a 37°C durante 120 horas e 210 rpm. Nesta Tabela pode-se observar que houve pouco estímulo do crescimento e da produção do polissacarídeo pelos ácidos succínico e α -ceto-glutárico. O ácido pirúvico foi o que mais estimulou o crescimento e a produção do polissacarídeo. A maior produção do polímero ocorreu na concentração de 0,50% de ácido pirúvico (22,13%), enquanto que o crescimento continuou a aumentar até a última concentração testada (1,00%).



Tabela 17. Efeito da adição de diferentes fatores de crescimento, ao meio de produção contendo 1,0% de manitol, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa*, a 37°C durante 120 horas e 210 rpm.

Fatores de Crescimento	Concentração (%)	Peso Celular seco (g/l)	Goma Levana (g/l)	Rendimento (%)
Ácido succínico	0,10	0,536	0,957	9,57
	0,25	0,542	0,818	8,18
	0,50	0,554	0,815	8,15
	0,75	0,676	0,600	6,00
	1,00	0,732	0,600	6,00
Ácido pirúvico	0,10	1,094	1,576	15,76
	0,25	1,106	1,916	19,16
	0,50	1,308	2,213	22,13
	0,75	1,570	2,000	20,00
	1,00	1,650	2,000	20,00
Ácido α -ceto-glutárico	0,10	0,592	0,816	8,16
	0,25	0,598	0,815	8,15
	0,50	0,635	0,551	5,51
	0,75	0,650	0,559	5,59
	1,00	0,645	0,540	5,40



Tabela 18. Efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 1,0% de manitol, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa*, a 37°C durante 120 horas e 210 rpm.

Fontes de Nitrogênio	Concentração (mM)	Peso Celular seco (g/l)	Goma Levana (g/l)	Rendimento (%)
NaNO ₃	10	0,576	1,316	13,16
	30	0,546	1,361	13,61
	50	0,590	1,353	13,53
	70	0,524	1,375	13,75
KNO ₃	10	0,756	1,357	13,57
	30	0,770	1,367	13,67
	50	0,729	1,385	13,85
	70	0,744	1,389	13,89
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	0,630	1,576	15,76
	30	0,826	1,579	15,79
	50	0,746	1,713	17,13
	70	0,644	1,698	16,98



3. CONCLUSÕES

A Tabela 18 mostra o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, ao meio de produção contendo 1,0% de manitol, nos parâmetros de fermentação, durante a produção de levana por *Bacillus polymyxa*, a 37°C durante 120 horas e 210 rpm. Em geral observa-se que não houve estímulo no padrão de crescimento e pode ser observado também que o sulfato de amônio até a concentração de 50 mM promoveu um discreto aumento da produção do polissacarídeo; o crescimento chega a um máximo e logo após começa a diminuir.

1. A adição de fontes de carbono vegetais e sacarose pode ser utilizada para algumas bactérias, como uma boa fonte alternativa para produção do polissacarídeo.
2. A adição dos ácidos orgânicos α -cetoglutárico e α -cetoglutárico, afetou de forma diferente cada uma das bactérias estudadas. Em geral apenas um dos ácidos, na concentração adequada, estimulou a produção do polissacarídeo. O crescimento foi afetado de forma diferenciada em cada tipo de bactéria.
3. A adição das fontes de nitrogênio afetou de forma diferente cada bactéria. Em geral, quando a concentração da fonte de nitrogênio aumenta, observou-se um aumento no peso celular seco e uma diminuição na produção do polissacarídeo.
4. Foi que o maior crescimento bacteriano não promoveu a máxima produção de polissacarídeo pelas bactérias estudadas.



5. CONCLUSÕES.

1. A produção do polissacarídeo foi afetada pela adição de diferentes concentrações das fontes de carbono. Em geral foi observado que baixas concentrações das fontes de carbono favorecem a produção do polissacarídeo.
2. Das fontes de carbono testadas, a sacarose pode ser utilizada, para algumas bactérias, como uma boa fonte alternativa para produção do polissacarídeo.
3. A adição dos ácidos orgânicos pirúvico, succínico e α -ceto-glutárico, afetou de forma diferente cada uma das bactérias estudadas. Em geral apenas um dos ácidos, na concentração adequada, estimulou mais a produção do polissacarídeo. O crescimento foi afetado de forma diferenciada em cada tipo de bactéria.
4. A adição das fontes de nitrogênio afetou de forma diferente cada bactéria. Em geral, quando a concentração da fonte de nitrogênio aumenta, observou-se um aumento no peso celular seco e uma diminuição na produção do polissacarídeo.
5. Foi que o maior crescimento bacteriano não promoveu a máxima produção de polissacarídeo pelas bactérias estudadas.



6. BIBLIOGRAFIA

- AMEMURA, A.; HARADA, T.; ABE, M.; HIGASHI, S. Structural studies on exocellular acidic polysaccharides secreted by three non-nodulation Rhizobia. Carbohydr. Res., 115: 165. 1983.
- ALBRECHT, W.J.; SOHNS, V.E.; ROGOVIN, S.P. - "Pilot Plant Process for the Isolation of a Microbial Polysaccharide with a Quaternary Ammonium Compound". Biotechnol. Bioeng. 5:91-99. 1963.
- ANDERSON, A.J. HACKING, A.J.; DAWES, E.A. Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from sucrose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. J. Gen. Microbiol. 133:1045-1052. 1987.
- ANÔNIMO. Food Technology. 31:53-54. 1977.
- BEMILLER, J.N., Some challenges for gums and gum research, In: *Gums and Stabilizers for the Food Industry 4*, ed. Philips, G.O., Wedlock, D.J. & Williamns, P.A., IRL Press, Oxford, p. 3. 1988.
- BERGERSEN, F.J. The growth of *Rhizobium* in syntethic media. Australian J. Biol. Sci. 14:349-360. 1961.
- BRIVONESE, A.C.; SUTHERLAND, I.W. Polymer production by a mucoid strain of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30:97-102. 1989.
- BURTON, J.C. *Rhizobium* culture and use. In: Microbial Technology. J.H. Peppler ed. Reinhold Publishing Corp. New York pp. 1-33. 1967.



CADMUS, M.C.; BURTON, K.A.; SLODKI, M.E. Growth related substituent changes in exopolysaccharide of fast-growing *Rhizobia*. Appl. Environm. Microbiol. 44(1):242-245. 1982.

CADMUS, M.C.; KNUTSON, C.A.; LAGODA, A.A.; PITTSLEY, J.E.; BURTON, K.A.. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. Biotechnol. Bioeng. 20:1003-1014. 1978.

CHEN, W.P.; CHEN, J.Y.; CHANG, S.C.; SU, C.L. Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. Appl. Environ. Microbiol. 49:543-546. 1985.

COTTRELL I. W.; KANG, K. S. and KOVACS, P. Xanthan gum In: Handbook of water-soluble gums and resins. Ed. Davidson R. p. 24 Mc Graw Hill, New York. 1980.

DAVIDSON, I.W.; SUTHERLAND, I.W.; LAWSON, C.J. Localization of O-acetyl groups of bacterial alginate. J. Gen. Microbiol. 98:603-608. 1977.

DAVIS, R.J.; CLAPP, C.E. Preparation of purified polysaccharides from *Rhizobium*. Appl. Microbiol. 9:519-524. 1961.

DEAVIN, L.; JARMAN, T.R.; LAWSON, C.J.; RIGHELATO, R.C.; SLOCOMBE, S. Production of alginic acid by *Azotobacter vinelandii* in bath and continuous culture. In: Sanford P.A. and Laskin A. (eds). Extracellular Microbial polysaccharides. A C S Symposium Series, Washington, D.C., 45: 14-26. 1977.

DUDMAN, W.F. Cellulose production by *Acetobacter acetigenum* in defined medium. J. Gen. Microbiol. 21:327-337. 1959.

DUDMAN, W.F. Growth and extracellular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti* in defined medium. J. Bacteriol. 88(3):640-645. 1964.



- DUGUID, J.P.; WILKINSON, J.F. The influence of cultural conditions on polysaccharide production by *Aerobacter aerogenes*. J. Gen. Microbiol. 9:174-189. 1953.
- FONTANES, E. G. Polisacarídeos Microbianos. In: Quintero, R. "Prospectivas de la biotecnologia en México. Fundacion Javier Barros Sierra, ed. CONACYT, México, p.499. 1985.
- FOOD & DRUG ADMINISTRATION. Food additives permitted in food for human consumption: Xanthan gum. Federal Register 34(53) Part 121:5376. March 19, 1969.
- GIDLEY, M.J.; EGGLESTON, G.; MORRIS, E.R. Selective removal of monosaccharide sidechains from *Rhizobium* capsular polysaccharide by guar α -D-galactosidase: effect on conformation stability and gelation. Carbohydr. Res. 231:185-196. 1992.
- GLICKSMAN, M., Utilização de hidrocolóides marinhos na indústria de alimentos, Alimentos & Tecnologia, Nov./Dez., 43. 1986.
- GODET, P. - Fermentation of Polysaccharide Gums. Process Biochem. 8(1):33-34. 1973.
- GONÇALVES, J.F., Goma xantana brasileira sai da mandioca, Química e Derivados, Agosto, 52-57. 1989.
- GORIN, P.A.J. & SPENCER, J.F., Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*, Can. J. Chem. 44: 993-998. 1966.
- GREATHOUSE, G.A.; SHIRK, H.G.; MINOR, F.W. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* from unlabeled glucose and C¹⁴-acetate and C¹⁴-ethanol. J. Am. Chem. Soc. 76:5157. 1954.
- HAN, Y.W. & WATSON, M.A. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. J. Industrial Microbiology 9(3/4):257-260. 1992.



- HAN, Y.W. Levan Production By *Bacillus polymyxa*. J. Industrial Microbiology 4(6):447-452. 1989.
- HAUG, A. Composition and properties of alginates, Report nr. 30. Norwegian Institute of Seaweed Research, Trondheim, Norway. 1964.
- HAUG, A. & LARSEN, B. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates, Acta Chem. Scand., 16: 1908. 1962.
- HERPER, C.M. Composition of extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii*. Antoine van Leeuwenhoek 38:437-445. 1972.
- HORAN, N.J.; JARMAN, T.R.; DAWES, E.A. Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. J. Gen. Microbiol. 127:185-191. 1981.
- IGOE, R.S. Hydrocolloid interactions useful in food system. Food Technol. 36(4): 72-74. 1982.
- JANSON, P.; LINDBERG, B.; SANDFORD, P.A. Structure studies of gellam gum, na extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. Carbohydr. Res. 124:135-139. 1983.
- JEANES, A.R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M.C.; SILMAN, R.W.; KNUTSON, C.A. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459: Produres for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. ARS-NC-51 Agriculture Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C. 1976.



- KANG, K.; VEEDER, G.T.; MIRRASOUL, P.J.; KANEKO, T.; COTTRELL, W. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. Appl. Environm. Microbiol., 43: 1086. 1982
- KIDBY, D. Culture maintenance and productivity. ACS Symposium Series 45. P.A. Sandford and A. Laskins editors. 1977.
- KIDBY, D.; SANDFORD, P.; HERMAN, A.; CADMUS, M.C. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. Appl. Environm. Microbiol. 33:840-845. 1977.
- LEACH, J.G.; LILLY, V.G.; WILSON, H.A.; PURVIS Jr. M.R. Bacterial polysaccharides; the nature and function of the exudate produced by *Xanthomonas phaseoli*. Phytopathology. 47:113-120. 1957.
- LEE, P.K.; CHANG, H.N.; KIM, B.H. - "Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* in Continuous Fermentation". Biotechnol. Lett. 11(8); 573-578. 1989.
- LILLY, V.G.; WILSON, H.A.; LEACH, J.G.. Bacterial polysaccharides II. Laboratory scale production of polysaccharides by species of *Xanthomonas*. Appl. Microbiol. 6:105-108. 1958.
- LIN,C.C.; CASSIDA, L.E. Jr. Gelrite as a gelling agent in media for the growth of thermophilic microorganisms. Appl. Environm. Microbiol. 47:427-435. 1984.
- LINTON, J.D.; JONES, D.S.; WOODARD,S. Factors that control the rate of exopolisaccharide production by *Agrobacterium radiobactyer* NCIB 11883. J. Gen. Microbiol. 133:2979-2987. 1987.



- LUH, N.; KAREL, M.; FLINCK, J.M. Fabrication, characterization and modification on the texture of calcium alginate gels, J. Food Sci., 42: 976. 1977.
- MARGARITIS, A.; PACE, G.W. Microbial polysaccharides In: Comprehensive biotechnology. Ed. by M-Moo-Young. Pergamon Press, New York, Vol. 3:1005-1044. 1985.
- MAYS, T. D.; DALLY, E.L. Microbial Production of Polyfructose, Patent U.S. n° 4.769.254 (1988).
- MIANT, A.F.; JARMAN, R.T.; RIGHELATO, C.R. Biosynthesis of exopolysaccharide by *Pseudomonas aureuginosa*. J. Bacteriol. 134(2):418-422. 1978.
- MITCHELL, J.R.; BLANSHARD, M.V. Rheological properties of alginate gels. J. Texture Studies, 7: 219-234. 1976.
- MORRIS, E.R. Molecular origin of xanthan solution properties. In: Extracellular Microbial Polysaccharides. Ed. SANSFORD, P.A. and LASKIN, A. p.81. ACS Symposium Series n° 45 - Washington D.C. 1977.
- MORRIS, E.R.; REES, D.A.; YOUNG, G. WALKINSHAW, M.D.; DRAKE, A. Order-disorder transition for a bacterial polysaccharide conformation in recognition between *Xanthomonas* pathogen and its plant host. J. Mol. Biol., 110: 1-15. 1977
- MORRIS, V.J.; BROWNSEY, G.J.; CHILVERS, G.R.; HARRIS, J.E.; GUNNINGA, A. P.; RIDOUT, M.J.; STEVENS, B.J.H. Gelation of members of a family of branched anionic heteropolysaccharides produced by certain strains of *Rhizobium leguminosarum*. Carbohydr. Polym. 13:165-183. 1990



NEIJSSSEL, O.M.; TEMPEST, D.W. The regulation of the carbohydrate metabolism in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 organism growing in chemostat culture. Arch. Microbiol. 106:251-258. 1975.

O'NEILL, M. A.; SELVENDRAN, R.R.; MORRIS, V.J. Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. Carbohydr. Res. 124:123-133. 1983.

ONOZAKI, H.; YAMAMOTO, M.; ISSHIKI, S. & ESAKI, H. Levan Production By *Bacillus polymyxa* isolated from commercially available "natto" preparations. J. Jap. Soc. Nutr. and Food Sci. 40(5):405-409. 1987.

PACE, G.W.; RIGHELATO, R.C. - "Production of Extracellular Microbial Polysaccharides". Adv. Biochem. Eng. 15:41-70. 1980.

PENMAN, A.; SANDERSON, G.R., A method for determination of uronic acid sequence in alginates. Carb. Research. 25: 273, 1972.

PSZCZOLA, D. E., Gellan gum wins IFT's Food Technology Industrial Achievement award. Food Technology. september: 94-98. 1993

READ, R.R.; COSTERTON, J.W. Purification and characterization of adhesive exopolisaccharides from *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens*. Canadian J. Microbiol. 33:1080-1090. 1987.

REISS, M.; HARTMEIER, W. Levan Production with a Flocculent Strain of *Zimomonas mobilis*, Food Biotechnology 4(1):69-75. 1990.

ROGOVIN, S.P.; ANDERSON, R.F.; CADMUS, M.C. Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 3:5166. 1961.



SANDERSON, G.R. Polysaccharides in foods. Food Technol. 35(5): 50-57 e 83. 1981.

SANDERSON, G.R. Gellan gum. Appl. Sci. 479:201-232. 1990.

SANDFORD, P.A. Extracellular Microbial polysaccharides. Adv. in Carbohydr. Chem. and Biochem. 36:292-296, 1979.

SANDFORD, P.A.; PITTSLEY, J.E.; KNUTSON, C.A.; WATSON, P.R.; CADMUS, M.C.; JEANES, A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459: Characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. ACS Symposium Series 45. P.A. Sandford and A. Laskins editors. pp. 192-210. 1977.

SANDVIK, E.I.; J.M. MAERKER. Application of xanthan gum for enhanced oil recovery. ACS Symposium Series 45. P.A. Sandford and A. Laskins editors. pp. 242-264. 1977.

SEISUN, D. New survey of the market for industrial biopolymers. Carboh. Polym. 12: 104-105. 1989.

SILMAN, R.W.; P. ROGOVIN. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: Laboratory investigation. Biotechnol. Bioeng. 12:75-83. 1970.

SKAJAK-BRAEK, G.; GRASDALEN, H.; LARSEN, L. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. Carbohydr. Res. 154:239-250. 1986.

SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Extracellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. Can. J. of Chem. 40:2066-2071. 1962.



- SMIDSRØD, O.; HAUG, A.; LIAN, B. Properties of poly(1,4-hexuronates) in the gel state, Acta Chem. Scand., 26: 71-74. 1972.
- SNEATH, P. H. A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J. S. (editores), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore (1986).
- SOUW, P.; DEMAÏN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. Appl. Environm. Microbiol. 37:1186-1192. 1979.
- SOUZA, G. Utilização de goma xantana na indústria de alimentos. Bol. do ITAL 21(3): 277-299. 1984.
- SUTHERLAND, I.W. Bacterial polysaccharides. Adv. Microbiol. Physiol. 8:143-213. 1972.
- SUTHERLAND, I.W. The role of acylation in exopolysaccharides including those for the food use. Food Biotechnol. 6(1):75-86. 1992.
- SZCZESNIAK, A.S. Rheological basis for selecting hydrocolloids for specific applications. In: Gums and stabilisers for the food industry 3. Phillips, G.O.; Wedlock, D.J. and Williams, P.A. (eds). Elsevier Applied Science, London, p. 311, 1986.
- TKACHENKO, A.A.; SEVRYUGINA, T.V. Biosynthesis of levan By *Bacillus polymyxa* Mikrobiol. 58(3):457-461. 1989.
- TOLSTOGUZOV, V.B. Formation and structure of anisotropic gels. Colloid Polym. Sci. 253: 109. 1975.
- VINCENT, J.M. Influence of calcium and magnesium on the growth of *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 28:653-663. 1962.



WELLS, J. Extracellular microbial polysaccharides. A critical overview. ACS Symposium Series 45. P.A. Sandford and A. Laskins editors. pp. 299-325. 1977.

WILKINSON, J.F., DUGUID, J.P.; EDMUNS, P.N. The distribution of polysaccharide production in *Aerobacter* and *Escherichia* strains and its relation to antigenic character. J. Gen. Microbiol. 11:59-72. 1954.

WILLIAMS, A.G.; WIMPENNY, J.W.; LAWSON, C.J. The production of an exocellular polysaccharide by *Pseudomonas* - type microorganism. J. Gen. Microbiol. 5:76-77. 1973.

WILLIAMS, A.G.; WIMPENNY, J.W. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NC1B grown in bath culture. J. Gen. Microbiol. 102:13-21. 1977.

ZEVENHUIZEN, L.T.P.M. Chemical composition of exopolysaccharides of *Rhizobium* and *Agrobacterium*. J. Gen. Microbiol. 68:239-243. 1971.

ZEVENHUIZEN, L.T.P.M. Gel forming capsular polysaccharide of fast growing rhizobia: Occurrence and rheological properties. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:393-399. 1984.

ZEVENHUIZEN, L.T.P.M.; VAN NEERVEN, A. R.W. Surface carbohydrates of *Rhizobium* IV. Gel forming capsular polysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifoli*. Carbohydr. Res. 124:166-171. 1983.



