

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DOS FATORES ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO
DE GOMA XANTANA POR Xanthomonas manihotis.

CRISPÍN HUMBERTO GARCÍA CRUZ
QUÍMICO FARMACÊUTICO INDUSTRIAL

ORIENTADOR:
PROF. DR. VANDERLEI PEREZ CANHOS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos e Agrícola, para a obtenção do Título de Mes
tre em Ciências de Alimentos.

- 1983 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À

Sílvia

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo apoio constante no decorrer destes anos.

Ao Prof. Vanderlei Perez Canhos, pela orientação dispensada.

Ao Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México), pela bolsa de estudo fornecida.

À Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas del I.P.N. (México), pelo apoio fornecido para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Héctor F. Martínez Frías (ESIQIE).

Ao Banco de México S.A.

Ao Dr. Oswaldo Paradella Filho do Instituto Agronômico de Campinas, pelo fornecimento da cultura empregada neste trabalho.

A todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

CONTEÚDO

	Pág.
Índice de Figuras	i
Índice de Tabelas	ii
Resumo	iii
Summary	iv
1. Introdução	1
1.1. Propriedades da goma xantana	1
1.2. Aplicações da goma xantana	1
1.2.1. Alimentos	2
1.2.2. Produção de petróleo	2
1.2.3. Outras aplicações	3
2. Revisão Bibliográfica	4
3. Materiais e Métodos	9
3.1. Microrganismo utilizado	9
3.2. Meios	9
3.2.1. Meio Basal	9
3.2.2. Meios de Produção	9
3.2.3. Meio de Manutenção	9
3.3. Seleção e propagação da cultura	10
3.4. Preparo do inóculo	10
3.5. Produção de goma xantana	10
3.6. Determinação do crescimento celular	11
3.7. Características do caldo de fermentação	11
3.8. Separação da goma xantana	11
4. Resultados e Discussão	14
5. Conclusões	26
6. Bibliografia	27

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema (A) para seleção da colônia e (B) preparo do inóculo.	12
Figura 2. Esquema (A) de produção e (B) separação da goma xantana; pontos de amostragem.	13
Figura 3. Efeito da concentração de (A) glicose ou (B) sacarose, utilizadas como fontes de carbono, nos parâmetros de fermentação (250 rpm 30°C/96 horas).	15
Figura 4. Efeito da concentração de ácidos orgânicos nos parâmetros de fermentação (250 rpm/ 30°C/ 96 horas).	19
Figura 5. Efeito da concentração das fontes de nitrogênio nos parâmetros de fermentação (250 rpm/ 30°C/ 96 horas).	22
Figura 6. Efeito da concentração de fosfato nos parâmetros de fermentação (250 rpm/ 30°C/ 96 horas).	23

ÍNDICE DE TABELASPág.

Tabela 1.	Efeito da adição ao Meio Basal de diferentes concentrações de glicose nos parâmetros de fermentação (250 rpm/ 30°C/ 96 horas).	17
Tabela 2.	Efeito da adição ao Meio Basal de diferentes concentrações de sacarose nos parâmetros de fermentação (250 rpm/ 30°C/ 96 horas).	17
Tabela 3.	Efeito da adição de concentrações ótimas de ácidos orgânicos na fermentação de goma xantana (Meio Basal-4% sacarose/ 250 rpm/ 30°C/ 96 horas).	18
Tabela 4.	Efeito da adição de concentrações ótimas das fontes de nitrogênio na fermentação de goma xantana (Meio Basal-4% sacarose/ 250 rpm/ 30°C / 96 horas).	21
Tabela 5.	Comparação dos parâmetros de fermentação obtidos em diferentes trabalhos realizados para produção de goma xantana.	24

RESUMO

Os requerimentos nutricionais de Xanthomonas manihotis para produção de goma xantana foram estudados em escala de laboratório. Das diferentes concentrações de glicose e sacarose adicionadas ao Meio Basal, a concentração de sacarose 4% (P/V) mostrou ser a melhor para produção de goma xantana. A produção do biopolímero foi estimulada pela adição ao Meio de Produção (Meio Basal + 4% sacarose) dos ácidos pirúvico, succínico e α -ceto-glutárico em concentrações ótimas. Dos ácidos orgânicos adicionados, o ácido succínico a 0,25% (P/V) foi o que mais estimulou a produção do biopolímero. A substituição do sulfato de amônio contido no Meio de Produção por nitrato de sódio ou nitrato de amônio causou um decréscimo na produção de goma xantana; entretanto, com a substituição do sulfato de amônio por glutamato de sódio não acarretou mudanças no teor de goma xantana produzida. Concentrações de nitrogênio maiores que a concentração ótima causaram um decréscimo na produção do biopolímero e aumento na massa celular. A produção de goma xantana mostrou ser adversamente afetada por concentrações de fosfato inorgânico superiores a 25 mM/L. Em condições ótimas foi obtida uma produção de goma xantana de 27,4 g/L de caldo de fermentação, o que corresponde a um rendimento de 68,5%.

SUMMARY

The nutritional requirements of Xanthomonas manihotis for the production of xanthan gum were studied in laboratory scale. Different concentrations of glucose and sucrose were added to the Basal Medium and the 4% (W/V) sucrose concentration showed to be the best for xanthan gum production. The biopolymer production was stimulated by the addition of pyruvic, succinic and α -keto-glutaric acids which were added to the Production Medium (Basal Medium + 4% sucrose) at optimal concentrations. The addition 0,25% (W/V) succinic acid showed to be the best for biopolymer production. The replacement of ammonium sulphate by sodium nitrate and ammonium nitrate salts nitrogen source in the Production Medium resulted decreased xanthan gum production; however, when the ammonium sulphate from the Production Medium was replaced by sodium glutamate the amount of xanthan gum produced was the same. Nitrogen concentrations higher than optimal caused a decrease in biopolymer production and an increase in cellular mass. Xanthan gum production showed to be adversely affected by concentrations of inorganic phosphate higher than 25 mM/L. At optimal conditions it was obtained a xanthan gum production of 27,4 g/L from the fermentation broth, which corresponded to a 68,5% yield.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologia para a produção de goma xantana é de grande importância econômica, devido ao potencial de utilização do biopolímero no Brasil. O fator que desfavorece um maior consumo no país é o alto custo do produto, em parte devido a taxas de importação. Este problema poderia ser resolvido pela produção nacional de goma xantana que é promissora devido a grande disponibilidade e os baixos custos dos insumos básicos, açúcar e álcool, requeridos respectivamente, para a produção e recuperação do biopolímero. Estes fatores associados ao desenvolvimento e adaptação de tecnologia adequada, poderão favorecer a competitividade de custo da goma xantana no mercado nacional e internacional.

1.1. Propriedades da goma xantana

A goma xantana se dissolve em água fria ou quente e produz soluções de alta viscosidade a baixas concentrações. As soluções da goma xantana são altamente pseudoplásticas, isto é, a viscosidade diminui rapidamente com o aumento da tensão de cisalhamento e esta diminuição é instantânea e reversível. A viscosidade destas soluções são muito resistentes à degradação térmica e a presença de sais nos alimentos, aumenta ainda mais esta resistência (Rocks, 1971). A viscosidade das soluções aquosas de goma xantana é essencialmente independente do pH entre 6 e 9 e ocorrem apenas pequenas mudanças entre pH 1 e 11 (Rocks, 1971). A goma xantana tem excelente estabilidade e compatibilidade com altas concentrações de muitos sais. Por exemplo, é compatível com soluções de 15% de NaCl e soluções de 25% de CaCl₂ (Cottrell, 1979). Uma das propriedades mais relevantes da goma xantana é a capacidade de interagir com galactomananas, tais como, goma locusta (Schuppner, 1971) e goma guar (Rocks, 1971), propiciando a formação de geis.

1.2. Aplicações da goma xantana

Dentre as áreas com grande potencial de aplicação da goma xantana, destacam-se:

1.2.1. Alimentos: a goma xantana é bastante utilizada na indústria de alimentos devido as propriedades de alta estabilidade ao pH e temperatura. Dentre as aplicações destacam-se a utilização em conservas, laticínios e produtos de panificação (Cottrell, 1979). Além disso, a goma xantana tem sido utilizada na formulação de "milk-shake" (Edlin, 1972), bebidas chocolatadas (Arden, 1974), sopas, molhos e outros produtos formulados (Wintersdorff, 1972). A goma xantana pode também ser utilizada na cobertura de produtos congelados (Jenkinson e Williams, 1973), na preparação de sorvetes com baixo teor de gordura (Gabby et alii, 1974 A) e em outros produtos dietéticos (Gabby et alii, 1974 B).

A adição de goma xantana em vários tipos de alimentos é permitida nos E.U.A. desde 1969. Testes feitos em ratos (Booth et alii, 1963) e cachorros (Robbins et alii, 1964) demonstraram que a goma xantana não é degradada, não inibe o crescimento, e não causa toxidez aguda ou irritação da pele. Com base nestes estudos a "Federal Food and Drug Administration" permitiu o uso da goma xantana como aditivo em alguns alimentos (FDA, 1969) como emulsificante e estabilizante opcional em molhos para saladas (FDA, 1971), queijos e derivados (FDA, 1973). O uso da goma xantana em alimentos já foi provado no Canadá (Anônimo, 1971), Dinamarca (Anônimo, 1973 A) e Nova Zelândia (Anônimo, 1973 B) e há petições pendentes em outros países (Kelco, 1972). No Brasil a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965 (Decreto Lei Nº 55.871). As concentrações máximas de goma xantana permitidas nos diferentes tipos de alimentos estão especificadas de acordo com a Resolução Nº 15/75 (1975).

1.2.2. Produção de petróleo: os quatro polímeros atualmente utilizados em lamas de perfuração são goma xantana, poliacrilamidas, amidos modificados e derivados de celulose, particularmente carboximetilcelulose. Devido a estabilidade ao pH, calor, cátions e íons divalentes associada ao comportamento pseudoplástico sob condições de alta tensão de cisalhamento, a goma xantana é tecnicamente o polímero preferido para a perfuração de poços de petróleo (Wells, 1977). Outro se

tor com grande potencial de utilização de goma xantana é o de projetos de recuperação melhorada de óleos (Sandvik e Maerker, 1977).

- 1.2.3. Outras aplicações: na área industrial, a goma xantana é usada como espessante de pastas de impressão de têxteis, removedores ácidos ou alcalinos, formulações de explosivos e outras utilidades (Sandford, 1979). Na área de agricultura, a goma xantana é utilizada como agente de suspensão de vitaminas e minerais para suplementos líquidos em alimentos de animais, e também para suspender proteínas nos substitutos de leite para bezerros (Betz, 1979). As propriedades reológicas da goma xantana aumentam a capacidade de dispersão das suspensões de fungicidas, herbicidas e inseticidas, aumentando também a capacidade de aderência à vegetação (Cottrell, 1979).

De acordo com a literatura, a linhagem comumente utilizada para a produção de goma xantana é Xanthomonas campestris NRRL-B-1459. Outras linhagens de Xanthomonas podem ser isoladas de plantas doentes. A linhagem de Xanthomonas utilizada neste trabalho foi obtida do Instituto Agrônomo de Campinas - Fazenda Santa Elisa e foi isolada da planta de mandioca (Manihot esculenta) apresentando sintomas de infecção sistêmica. Neste trabalho estudou-se as características nutricionais desta linhagem e o desempenho da mesma na produção de goma xantana tendo em vista a utilização de sacarose como fonte de carbono.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Lilly et alii (1958) estudaram a produção de biopolímeros por diferentes espécies de Xanthomonas utilizando fontes de carbono diversas. A partir destes estudos os autores sugeriram a formulação de um meio de produção que consistiu de glicose de amido ou sacarose, caseína hidrolizada e sais minerais. Neste meio foram testadas linhagens de Xanthomonas phaseoli, Xanthomonas campestris, Xanthomonas malvacearum e Xanthomonas carotae que com aeração adequada produziram até 6g de polissacarídeo por litro de caldo de fermentação contendo 2,5% da fonte de carbono (24% de rendimento).

A primeira tentativa para a determinação dos requerimentos nutricionais de Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 para a produção da goma xantana foi feita por Rogovin et alii (1961). O caldo de fermentação consistiu de 2,5g de glicose, 2,0g de fosfato de potássio e traços de sais minerais. Após a fermentação, a goma xantana foi recuperada por precipitação com etanol e purificada por reprecipitação. No ano seguinte, Sloneker e Jeanes (1962) determinaram a composição do polissacarídeo B-1459 (goma xantana) produzido por Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 que mostrou ser composto por D-glicose, D-manose, ácido glucurônico, ácido acético e ácido pirúvico nos teores 2,8:3,0:2,0: 1,7:0,51-0,63 respectivamente.

Rogovin e Albrecht (1964) descreveram um método para separar o polissacarídeo B-1459 do caldo de fermentação através da formação de complexos com aminas quaternárias. Outro processo para recuperação de goma xantana do caldo de fermentação proposto por McNeely e O'Connell (1966) utilizou um hidrolizado de cal (íons cálcio) como precipitante e após separação, o precipitado foi purificado por lavagem em solução ácida.

Lindblom e Patton (1967) relataram que quando Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 é colocada num processo de multiestágios, no qual, as células crescem num meio com baixa concentração de carboidrato (0,2%) no primeiro estágio; o crescimento celular ocorre normalmente, mas o microrganismo não sintetiza o biopolímero. Entretanto, com o aumento da concentração do carboidrato, pode-se obter um incremento na produção do polissacarídeo. Rogovin (1969)

descreveu um processo simples de fermentação contínua para produção do polissacarídeo B-1459, utilizando açúcar de milho (2,25%) com um inóculo de 2,7mg de células de Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 por grama de caldo de fermentação. A uma temperatura de 28°C após 13 dias de fermentação, o rendimento obtido foi de 79,6% (baseado na quantidade de açúcar consumido) e a viscosidade alcançada foi de 5 200 cP.

Sutton e Williams (1970) determinaram os componentes químicos do meio para a produção de goma xantana por Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 a nível industrial replicando às condições de cultivo encontradas nos tecidos de repolho.

Silman e Rogovin (1970) estudaram a produção do biopolímero por Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 por fermentação contínua simples utilizando glicose, sais minerais, resíduos solúveis de destilaria e uréia como componentes do meio de produção, por um período de 20 dias. Foi usado um fermentador do tipo quemostático com alimentação contínua, sem reciclar o meio de produção. A temperatura foi controlada em $28 \pm 1^\circ\text{C}$, assim como, a viscosidade do caldo de fermentação, massa celular e pH. Quando o pH não era ajustado (7,1 - 7,5), o consumo de glicose e a taxa de produção de goma xantana aumentavam. Quando a taxa de diluição foi aumentada de 0,024 para $0,0285\text{hr}^{-1}$ (pH = 7,5), o consumo de glicose e a taxa de produção de goma xantana também aumentaram. Portanto, estas observações indicaram que a taxa de produção da goma xantana é função do pH e da taxa de diluição. Posteriormente, os mesmos autores acima mencionados (1972), realizaram a experiência anterior pelo período de um ano. A conclusão foi a de que, a fermentação contínua mantida sob condições prefixadas, diminui seu rendimento na produção da goma xantana, já que, ocorre uma mudança genética na cultura de Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 tornando-a menos produtiva.

Estudando a cinética de fermentação Moraine e Rogovin (1973) concluíram que a taxa de crescimento aumenta com o aumento da concentração dos nutrientes e que o nitrogênio é consumido exclusivamente para o crescimento, uma vez que, a concentração celular aumenta com o aumento da concentração de nitrogênio no meio.

Cadmus et alii (1976) testaram um meio sintético contendo 0,01% de MgSO_4 ; 0,1% de fosfato de diamônio e 2,6% de glicose

utilizando Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 como inóculo. Em análises de várias preparações da goma produzida encontraram que, diferentes teores de ácido acetal nas cadeias laterais, podem influenciar a viscosidade das soluções diluídas de goma xantana. Estes pesquisadores também concluíram que baixos teores de nitrogênio (0,1%) e ar (0,25 vol/litro/min) favorecem a formação de goma xantana com baixo teor de piruvato. Com o aumento dos níveis de nitrogênio (0,15%) e fluxo de ar (1,5 vol/litro/min) e adição concomitante de K_2HPO_4 , a formação da goma com alto teor de piruvato é favorecida. Ambos os processos deram rendimentos de 50 e 60% de goma xantana respectivamente. Jeanes et alii (1976) fizeram um estudo completo dos procedimentos, equipamentos, escalas de produção (laboratório, planta semi-piloto e planta piloto), isolamento e purificação da goma xantana produzida por Xanthomonas campestris NRRL-B-1459. Relataram também os métodos de análise para avaliação da produção e qualidade da goma xantana.

Kidby (1977) discutiu o melhoramento do genótipo em base ao controle das formas mutantes, mutantes condicionados e método de alteração para manter as características genéticas, bem como, a produtividade da goma xantana por Xanthomonas campestris NRRL-B-1459. Sugeriu também um método de manipulação das culturas para evitar a degeneração genética, em base a seleção das colônias maiores, assim como, com produção abundante de goma (Kidby et alii, 1977).

Graham (1977) citou que Kang (1972) fez testes serológicos altamente específicos da goma xantana produzida por Xanthomonas campestris nas condições de laboratório, bem como, a análise química dos componentes da molécula e concluiu que a goma xantana obtida por fermentação é idêntica à produzida no estado natural em tecidos de repolho.

Nguyen et alii (1977) descreveram um processo para produção de biopolímeros por fermentação, utilizando Xanthomonas-sp ORS-B-253 e várias fontes de nitrogênio tais como: licor de milho, ácido glutâmico, asparagina, arginina e leucina por 4 dias a 30°C. O crescimento do microrganismo foi medido espectrofotometricamente por diluição das culturas e a produção do biopolímero foi medida pela viscosidade do caldo de fermentação. Dependendo da fonte de nitrogênio utilizada a viscosidade produzida foi de 7 230 cP (licor de milho) a 18 640 cP (solução saturada de ácido glutâmico).

Souw e Demain (1979) estudaram os requerimentos nutricionais de Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 para a produção de goma xantana num meio químico definido. Das fontes de carbono testadas, a utilização de sacarose (4%), bem como, a adição de estimuladores de fermentação (ácidos orgânicos) em quantidades ótimas, proporcionaram a obtenção de um rendimento de 70% de goma xantana. Posteriormente (Souw e Demain, 1980) estudaram o efeito benéfico do citrato na produção de goma xantana por Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 e concluíram que o citrato em concentrações ótimas (4,7 - 9,4 mM) estimula a produção de goma xantana quando o pH não é controlado, já que, o controle de pH elimina estes efeitos benéficos. A adição de citrato favorece a formação de metabolitos envolvidos na produção de goma xantana. Seus resultados também indicaram que a atuação do citrato não é como quelante.

Silman e Bagley (1979) descreveram um método de fermentação contínua simples com Xanthomonas campestris NRRL-B-1459, utilizando um Viscosímetro Bendix-Ultraviscoson ligado diretamente ao fermentador para o controle da viscosidade do caldo de fermentação. A maioria das fermentações contínuas com o passar do tempo, podem sofrer contaminação ou variação na cultura. Entretanto, o controle da viscosidade do caldo de fermentação no fermentador evita este tipo de problema, pois, com a presença de leveduras ou bactérias contaminantes ocorrerá uma variação da viscosidade do caldo de fermentação. Esta variação é detectável pelo viscostato Bendix-Ultraviscoson.

Werneau (1980) relatou um método de fermentação por Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 no qual a fonte de carbono utilizada é gradualmente adicionada de modo a manter a concentração aproximada de 5%. As células foram inoculadas em 5,8 litros de um meio contendo (em gramas por litro) 1,0 NH_4NO_3 ; 0,03 MgSO_4 ; 0,01 FeSO_4 e 0,01 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ajustando o pH a 6,8. Uma solução de 38,3% de glicose foi adicionada com um programador automático de tempo durante 127 horas com agitação e aeração. Após 136 horas a glicose foi totalmente consumida; a viscosidade final foi de 42 750 cP e o rendimento obtido foi de 70%.

Behrens et alii (1980) relataram que depois da fase logarítmica de crescimento, Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 começa a produzir goma xantana no caldo de fermentação e que a síntese do

polissacarídeo obstrui a passagem dos nutrientes, o que acarreta um desequilíbrio no crescimento, sendo este, um pré-requisito para que a produção da goma aconteça. A biomassa aumenta 2 vezes enquanto que, o aumento de células somente 1,5 vezes; a quantidade de nitrogênio consumido é proporcional à quantidade da goma xantana produzida.

Chen (1975) relatou que, quando Xanthomonas manihotis é inoculada num meio contendo 4% de sacarose; 0,2% de KCl; 0,45% de K_2HPO_4 e 2% de pó de soja desengordurado em solução aquosa, e incubada a 28°C por 3 dias com agitação constante (185 rpm) produz uma goma de alta qualidade. A viscosidade do caldo de fermentação foi de 34 000 cP, medida com viscosímetro Brookfield modelo HAT, spindle 4, a 5 rpm e 25°C. O rendimento obtido foi de 51% em base à concentração de sacarose utilizada. Posteriormente Chen e Tsou (1976) estudaram a produção de goma xantana por Xanthomonas manihotis num meio contendo 7% de sacarose; 0,3% de peptona, 0,25% de fosfato ácido de dipotássio, ajustando o pH a 7,0 e incubando a 30°C por 3 a 5 dias num agitador rotatório (185 rpm). As culturas apresentaram viscosidade de $12\ 600 \pm 3\ 500$ cP (viscosímetro Brookfield modelo HAT, a 5 rpm e 25°C). Estes pesquisadores verificaram que para a concentração de sacarose à 7% foram detectadas altas concentrações de açúcar residual. Concluíram que a viscosidade do caldo de cultura aumenta conforme o aumento das concentrações de sacarose, mas, não o suficiente para aconselhar a utilização de concentrações maiores de 4%. Baseando-se nas propriedades reológicas apresentadas, os autores sugeriram que esta nova goma pode ter a mesma composição química que a goma produzida por Xanthomonas campestris.

Cheng et alii (1978) descreveram um processo para recuperação da goma xantana produzida por Xanthomonas manihotis utilizando etanol ou metanol para precipitação da goma no caldo de fermentação. A temperatura ótima de secagem (secador de tambor) foi de 70°C.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo utilizado: Xanthomonas manihotis obtido na Estação Experimental Fazenda Santa Elisa, Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

3.2. Meios:

3.2.1. Meio Basal: o Meio Basal utilizado foi de Souw e De main (1979) e contém os seguintes ingredientes (em gramas por litro):

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	0,02
HCl	0,13 mL

O pH foi ajustado a 7,0 com solução de hidróxido de sódio 1 M antes da esterilização.

3.2.2. Meios de Produção: foram obtidos através da adição de soluções esterilizadas de glicose ou sacarose ao Meio Basal previamente esterilizado de modo a fornecer a concentração desejada do carboidrato, em Peso/Volume.

3.2.3. Meio de Manutenção: a linhagem de Xanthomonas manihotis foi mantida em Agar YM (Difco) cuja fórmula é indicada a seguir (em gramas por litro):

Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona	5,0
Dextrose	10,0
Agar	20,0

Observação: os meios e as soluções de açúcares foram esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 15 min.

3.3. Seleção e propagação da cultura (Figura 1A).

A linhagem de *Xanthomonas manihotis* foi inoculada por estrias em esgotamento numa placa de Agar YM, a qual foi incubada a 30°C por 48 horas. Após incubação foi feita a seleção da colônia mucóide de maior diâmetro (aproximadamente 4 mm), sendo transferida para tubos inclinados de Agar YM, que foram incubados por 24 horas à 30°C.

3.4. Preparo do inóculo (Figura 1B).

Depois da incubação em tubos de Agar inclinado, foi feita a suspensão da cultura por adição de 10 mL de água destilada estéril. Esta suspensão de células foi transferida para frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL dos meios de produção. Após incubação em agitador rotatório (New Brunswick G 25) a 30°C por 96 horas e 250 rpm, o caldo de fermentação foi diluído com 150 mL de água destilada estéril e centrifugado (Centrifuga Internacional, Modelo 8-20 A) a 7000 rpm por 30 min. Posteriormente descartou-se o sobrenadante e as células foram suspensas em 150 mL de água destilada estéril e recentrifugadas. Novamente o sobrenadante foi descartado e o inóculo foi obtido através da suspensão das células lavadas em 30 mL de água destilada estéril.

3.5. Produção de goma xantana (Figura 2A).

As diferentes formulações dos Meios de Produção foram inoculadas com *Xanthomonas manihotis* (IAC) de modo a fornecer uma densidade ótica final de 0,05 a 650 nm (espectrofotômetro "Bausch and Lomb Spectronic 20") e incubadas em agitador rotatório à 30°C por 96 horas e 250 rpm.

3.6. Determinação do crescimento celular.

A determinação do crescimento celular foi feita através da determinação do peso celular seco. Diluiu-se 50 mL do caldo de fermentação com 150 mL de água destilada e centrifugou-se a 7000 rpm por 30 min. Após decantar o sobrenadante, as células foram transferidas para uma placa de petri (10 cm de diâmetro) e procedeu-se a secagem em estufa a vácuo (Estufa retilínea, Fanem Ltda. S.P.) à 55°C até peso constante.

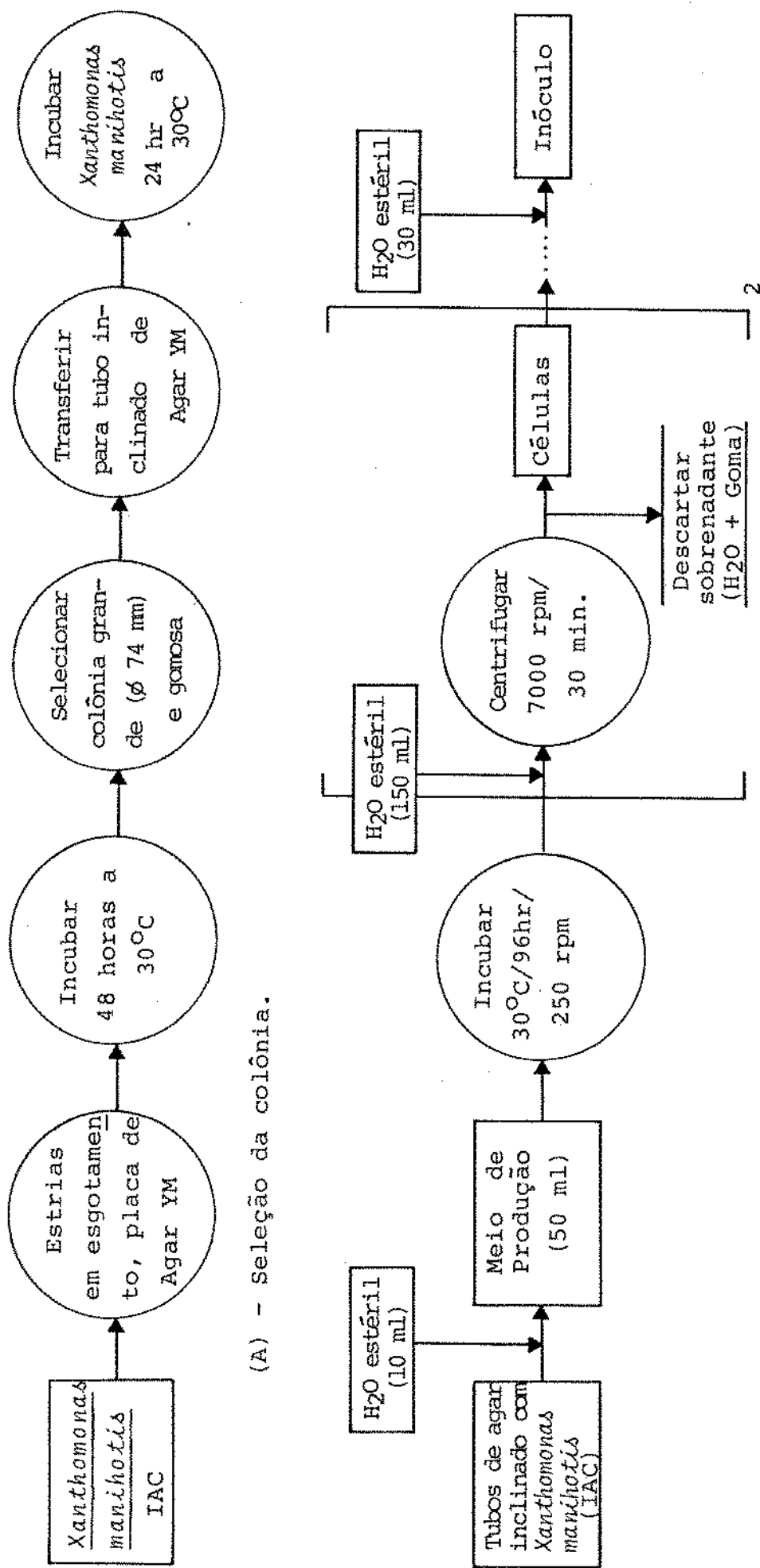
3.7. Características do caldo de fermentação.

A viscosidade aparente do caldo de fermentação foi medida em viscosímetro Brookfield tipo LVT à 30 rpm e 25°C.

O pH do caldo de fermentação foi determinado em um potenciômetro "Corning digital 110" com escala expandida de pH.

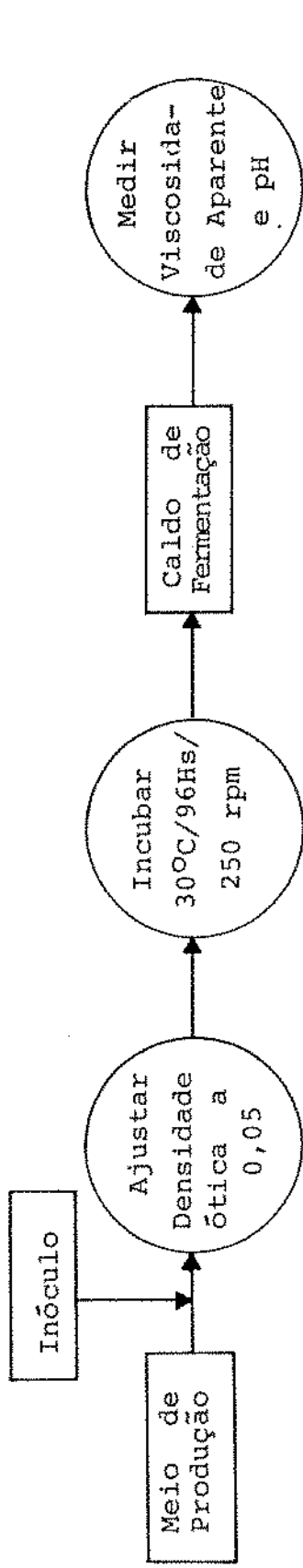
3.8. Separação da goma xantana.

A goma xantana foi separada por precipitação com etanol, de acordo com o método indicado por Rogovin et alii (1961), depois da remoção das células por centrifugação a 7000 rpm por 30 min. (Figura 2B). Após precipitação, filtrou-se e o precipitado (xantana) foi lavado três vezes com etanol. Por fim colocou-se na estufa a vácuo a 55°C até se obter peso constante. Finalmente, calculou-se o rendimento (gramas de xantana por 100 gramas de sacarose).

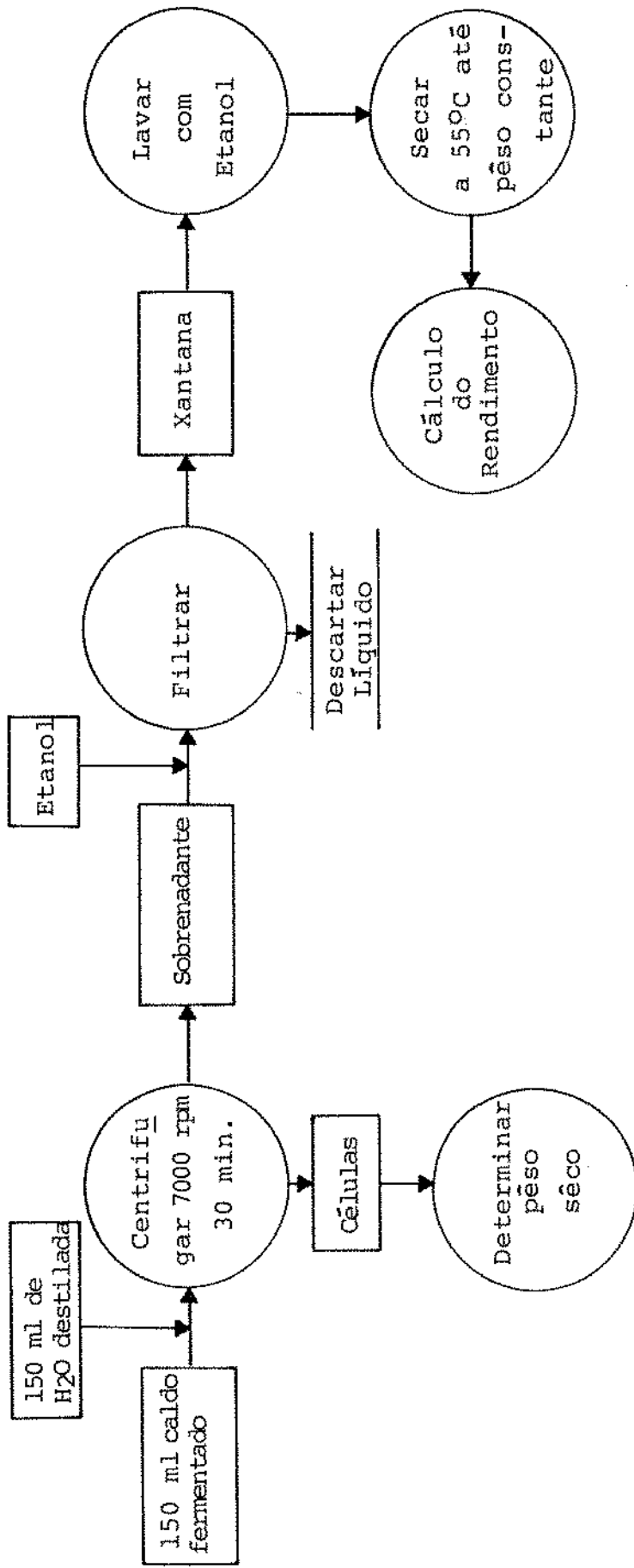


(B) - Preparo do inóculo.

Figura 1 - Esquema (A) para seleção da colônia e (B) preparo do inóculo.



(A) - Produção da goma xantana e medidas de pH e viscosidade



(B) - Separação da goma xantana e determinações de rendimento e peso celular seco.

Figura 2 - Esquema (A) de produção e separação (B) da goma xantana e pontos de amostragem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O carboidrato comumente utilizado para a produção industrial de goma xantana é glicose obtida de amido (Anônimo, 1977). Em estudos de requerimentos nutricionais das diferentes linhagens de Xanthomonas, glicose é a fonte de carbono normalmente preferida (Leach et alii, 1957; Lilly et alii, 1958). A Figura 3A mostra que a concentração ótima de glicose para a produção de goma xantana por Xanthomonas manihotis nas condições de laboratório é de 4%. O aumento ou decréscimo da quantidade de goma produzida foi acompanhado por um respectivo aumento ou decréscimo na viscosidade do caldo de fermentação. Concentrações de glicose acima de 4% acarretaram diminuição na produção da goma xantana e, conseqüentemente, da viscosidade do caldo de fermentação. O aumento da massa celular (peso celular seco), mostrou ser proporcional a quantidade de glicose adicionada ao Meio de Produção até a concentração de 4%.

Teores acima de 4% de glicose não causaram aumento da massa celular (Tabela 1). 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 5,5 e o máximo de 7,5 (Figura 3A). 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).

Recentemente, Souw e Demain (1979) demonstraram que maiores rendimentos e viscosidades nas fermentações com Xanthomonas campestris NRRL-B-1459, podem ser obtidas utilizando-se sacarose como fonte de carbono. Devido a grande disponibilidade e baixo custo da sacarose no mercado nacional, é de interesse verificar sua utilização como fonte de carbono para a produção de goma xantana por Xanthomonas manihotis. A Figura 3B mostra 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 4%, e que, a partir desta concentração, o aumento ou diminuição da quantidade de sacarose foi acompanhado por um aumento ou diminuição na viscosidade do caldo de fermentação e na quantidade da goma produzida. Concentrações acima de 4% acarreta-

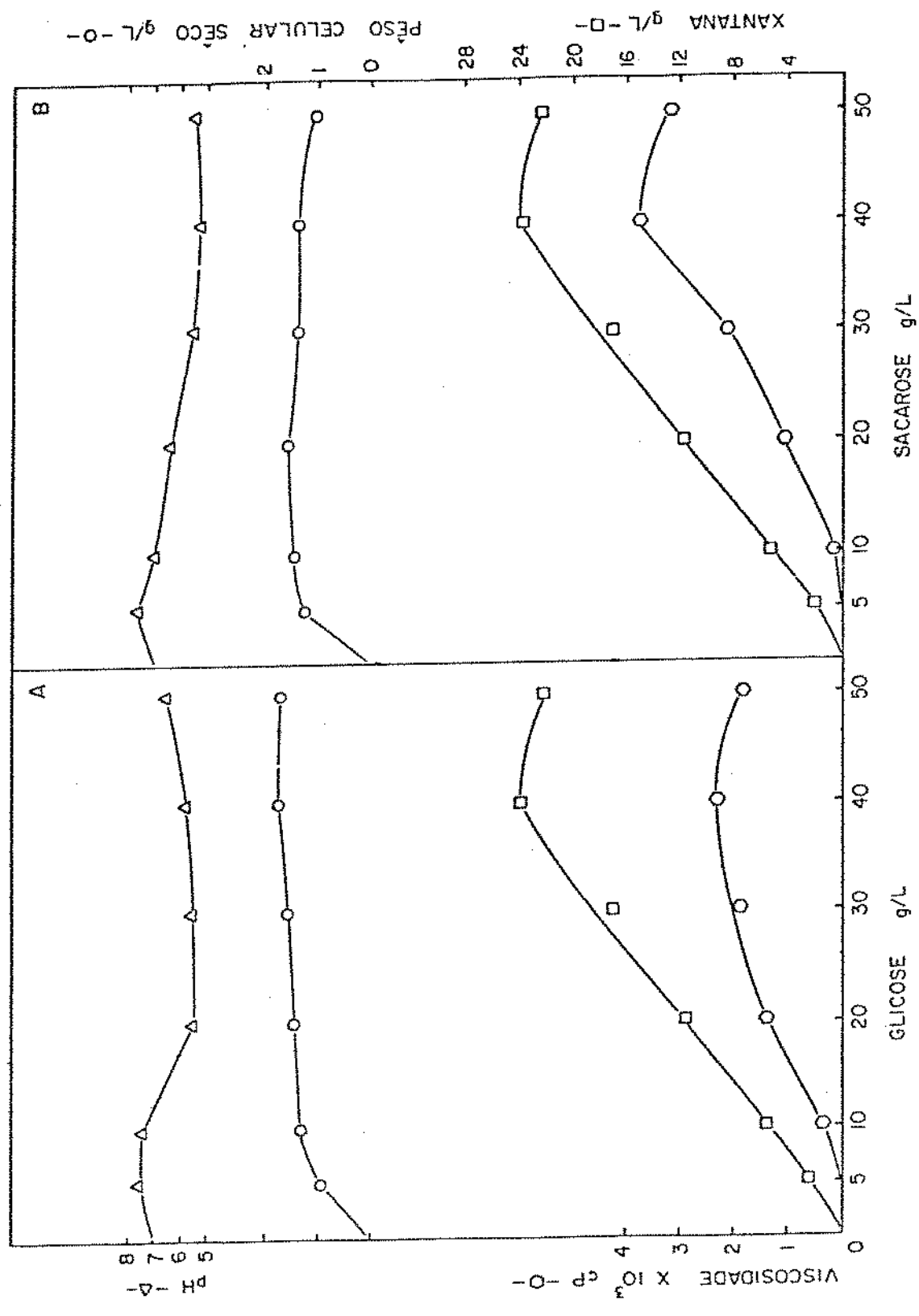


FIGURA 3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE OU SACAROSE UTILIZADAS COMO FONTES DE CARBONO NOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO (250 rpm / 30° C / 96 Hs.)

ram a queda da produção de goma xantana e viscosidade do caldo de fermentação. Observa-se também que, o aumento da massa celular depende diretamente da concentração de sacarose utilizada, até a concentração de 4%. Entretanto a adição de quantidades superiores a 4% de sacarose ao Meio de Produção acarretam uma diminuição da massa celular (Tabela 2), provavelmente devido à redução da atividade de água requerida para o crescimento do microrganismo. 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 7,6 foi obtido para uma concentração de 2% e o pH mínimo 5,3 foi obtido para uma concentração de 4%.

Para as mesmas concentrações de glicose ou sacarose, a quantidade de goma xantana produzida por Xanthomonas manihotis foi praticamente igual. Entretanto, a viscosidade do caldo de fermentação contendo 4% de glicose, foi 40% do valor da viscosidade obtida para o caldo de fermentação contendo 4% de sacarose como fonte de carbono (Tabelas 1 e 2). Um estudo recente sugeriu que, na produção de goma xantana, a diferença encontrada na viscosidade da goma pode estar relacionada com os diferentes teores de ácido pirúvico da molécula de xantana (Cadmus et alii, 1976); o que foi posteriormente comprovado por Sandford et alii (1977). Isso talvez explique o grande aumento de viscosidade do caldo de fermentação, que contém sacarose como fonte de carbono; o que pode ser devido a um maior teor de ácido pirúvico na molécula de xantana (Sandford et alii, 1977). Souw e Demain (1979) utilizando Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 verificaram também, que maiores viscosidades podem ser obtidas pela 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 4% tanto de glicose quanto de sacarose, observa-se que o uso de glicose como fonte de carbono favorece mais o aumento da massa celular do que a utilização de sacarose; pois obteve-se 1,742 g/L para glicose e 1,424 g/L para sacarose (pêso celular sêco). Em termos de produção, ambas fontes de carbono produzem aproximadamente a mesma quantidade de goma xantana (23,698 e 23,757 respectivamente). Resultados similares foram obtidos

Tabela 1 - Efeito da adição ao Meio Basal de diferentes concentrações de glicose nos parâmetros de fermentação (250 rpm/30°C/96 horas).

Concentração de glicose %	Pêso celular sêco g/L	pH	Xantana (pêso sêco) g/L	Rendimento %	Viscosidade cP
0,5	0,929	7,50	2,4395	48,8	60
1,0	1,331	7,40	5,2980	52,3	320
2,0	1,443	5,50	11,5497	57,7	1352
3,0	1,606	5,50	17,0930	57,0	1960
4,0	1,742	5,80	23,6980	59,3	2280
5,0	1,740	6,30	21,8380	43,7	1840

Tabela 2 - Efeito da adição ao Meio Basal de diferentes concentrações de sacarose nos parâmetros de fermentação (250 rpm/30°C/96 horas).

Concentração de sacarose %	Pêso celular sêco g/L	pH	Xantana (pêso sêco) g/L	Rendimento %	Viscosidade cP
0,5	1,236	7,60	1,969	39,4	36
1,0	1,440	7,00	5,430	54,3	160
2,0	1,492	6,40	11,585	57,9	1080
3,0	1,412	5,60	17,100	57,0	2100
4,0	1,424	5,30	23,757	59,4	3800
5,0	1,088	5,50	22,353	44,7	3220

por Leach et alii (1958) 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 4% 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 na viscosidade aparente (3800 cP) do caldo de fermentação com 4% de sacarose.

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 4% de sacarose, foram adicionadas diferentes concentrações destes ácidos orgânicos. A Figura 4 mostra que existe um ótimo de concentração destes ácidos orgânicos para a produção de goma xantana. Verificou-se também que quando atingida a máxima produção de goma xantana, consegue-se a máxima viscosidade, mas não necessariamente o máximo de crescimento celular (Figura 4), o que também foi observado por Souw e Demain (1979).

Os valores das concentrações ótimas de ácido pirúvico, ácido succínico e ácido α -ceto-glutárico para a produção de goma xantana estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito da adição de concentrações ótimas de ácidos orgânicos, na fermentação de goma xantana (Meio Basal-4% sacarose/250 rpm/30°C/96 horas).

Ácido Orgânico	Concentração ótima (g/100 mL de caldo)	Peso celular seco g/L	pH	Xantana (Peso seco) g/L	Viscosidade cP
Pirúvico	0,10	1,190	5,50	26,504	5100
Succínico	0,25	1,314	7,50	27,395	8500
α -ceto-glutárico	0,50	0,870	7,00	24,343	6000

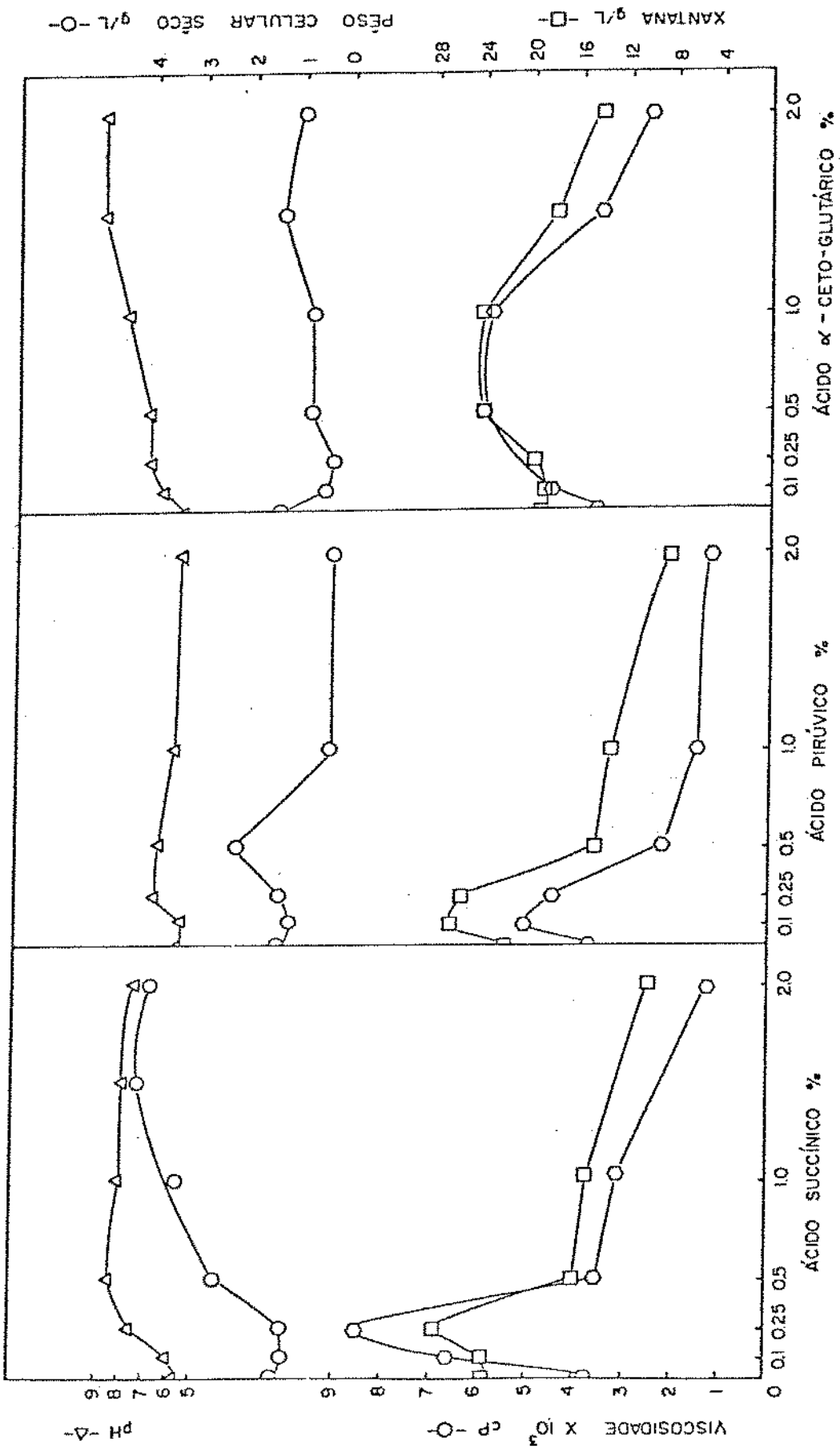


FIGURA 4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS NOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO (250 rpm / 30°C / 96 Hs.)

Souw e Demain (1979) obtiveram valores máximos de viscosidade pela adição de 0,75% de ácido pirúvico e 1,0% de ácido succínico ao Meio de Produção. Isto evidencia diferenças dos requerimentos nutricionais entre Xanthomonas campestris e Xanthomonas manihotis.

Souw e Demain (1979) observaram que na ausência de 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.

No estudo do efeito das diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção da goma xantana, a fonte de carbono utilizada foi sacarose na concentração de 4%. Nitrato de sódio, glutamato de sódio e nitrato de amônio, foram utilizados em substituição ao sulfato de amônio contido no Meio Basal. A influência das diferentes concentrações destas fontes de nitrogênio nos parâmetros de fermentação estão indicadas na Figura 5. Pode-se observar, que com o aumento da concentração das fontes de nitrogênio utilizadas, ocorre um aumento da massa celular (pêso celular sêco), o que não ocasiona necessariamente um aumento na produção de goma xantana. Pode-se também concluir, que uma maior produção do polímero ocorre sob condições de limitação da fonte de nitrogênio. Efeitos similares foram observados com outros microrganismos produtores de polisacarídeos: Aerobacter aerogenes (Dugid et alii, 1953); Coccidioides immitis (Pappagianis et alii, 1958); Chromobacterium violaceum (Corpe, 1964); Pullularia pullulans (Catley, 1971); Pseudomonas NCI-B-11264 (Williams et alii, 1977) e Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 (Souw e Demain, 1979).

As concentrações ótimas para produção do polímero, estão resumidas na Tabela 4.

A concentração de fósforo inorgânico no caldo de cultura, mostrou também influir bastante nos parâmetros de fermentação na produção de goma xantana. O efeito das diferentes concentrações de fosfato ácido de dipotássio adicionado ao Meio de Produção está indicado na Figura 6. Concentrações de fosfato superiores a 25 mM/L, embora tenham favorecido o crescimento (pêso celular sêco), acarretaram uma diminuição na quantidade da goma produzida e na viscosidade do caldo de fermentação. Em estudo feito por Souw e Demain (1979), a concentração ótima de fosfato no Meio Basal foi

Tabela 4 - Efeito da adição de concentrações ótimas das fontes de nitrogênio na fermentação de goma xantana (Meio Basal-4% sacarose/250 rpm/30°C/96 horas).

Fonte de nitrogênio	Concentração ótima mM/L	Pêso celular sêco g/L	pH	Xantana (pêso sêco) g/L	Viscosidade cP
NaNO ₃	20	2,044	7,50	12,726	1460
NH ₄ NO ₃	20	1,212	7,40	18,682	3800
Glutamato de sódio	40	1,382	7,00	24,928	4500
(NH ₄) ₂ SO ₄	10	1,176	6,30	25,369	4600

de 50 mM/L; o que indica diferenças nos requerimentos nutricionais para produção de goma xantana entre as linhagens de Xanthomonas campestris e Xanthomonas manihotis.

Dos experimentos realizados, foi obtido um maior rendimento (68,5%) de goma xantana quando se usou o Meio de Produção contendo 4% de sacarose e 0,25% de ácido succínico; rendimento este, comparável aos obtidos por Cadmus et alii (1978) e Souw e Demain (1979) (Tabela 5).

Cadmus et alii (1978) indicaram que o maior rendimento obtido em um meio químico definido foi de 56%, enquanto que, ao testar 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 (Tabela 5). As altas viscosidades relatadas por Cadmus et alii (1978), foram de 7000 cP para seu meio químico definido e 11000 cP para o seu meio químico complexo, usando 2,5% de glicose como fonte de carbono. Souw e Demain (1979) relataram a obtenção de 15000 cP de viscosidade usando 4% de sacarose mais 1,0% de ácido succínico. Em nossos experimentos, a maior viscosidade 8500 cP foi obtida com 4% de sacarose e 0,25% de ácido succínico à temperatura de 30°C. É interessante frisar, que a cultura utilizada em nossos experimentos foi Xanthomonas manihotis e que as culturas usadas por Cadmus et alii

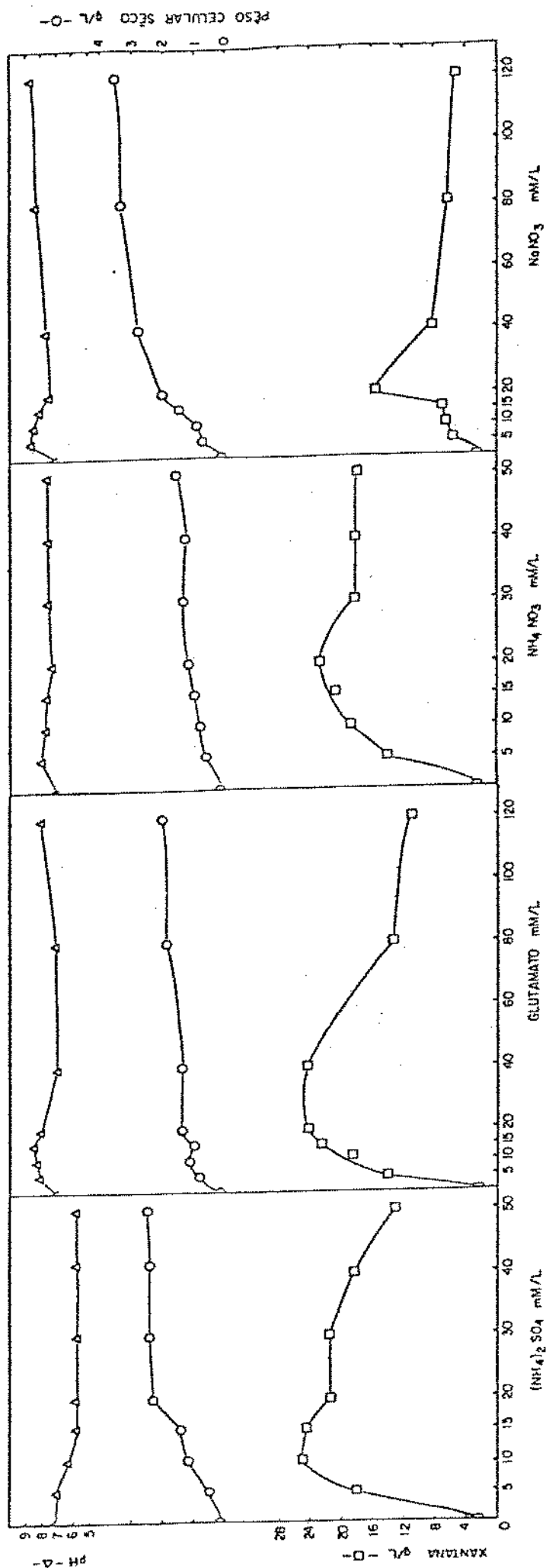


FIGURA 5. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO NOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO (250 rpm / 30°C / 96 Hs.)

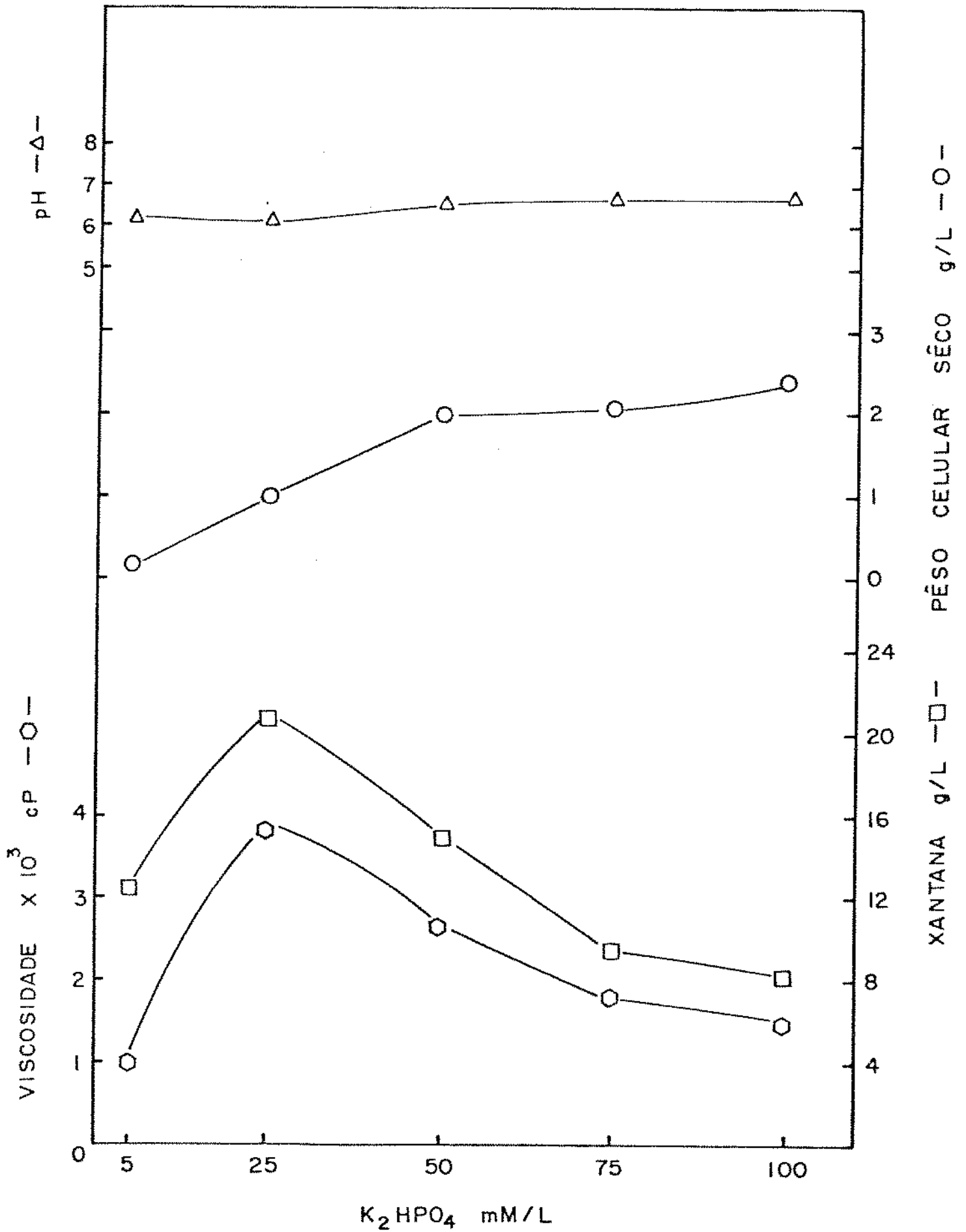


FIGURA 6. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO NOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO (250 rpm/30°C/96 Hs.)

Tabela 5 - Comparação dos parâmetros de fermentação obtidos em diferentes trabalhos realizados para produção de goma xantana.

Microorganismo	Referência	Meio de Produção	Rendimento %	Viscosidade CP	Temperatura OC	Tempo hs
<i>X. Campestris</i> NRRL-B-1459	Cadmus et alii 1978	Meio Basal: 2,5% glicose 0,01% MgSO ₄ ; 0,5% K ₂ HPO ₄ H ₂ O; pH = 7,0 Fonte de nitrogênio: 0,8% DDS (sólidos secos solúveis de destilaria); 0,25% fosfato de diamônia; 0,55% levedura de cerveja autolizada; 0,09% NaNO ₃ . Meio Sintético: 2,6% glicose; 0,01% MgSO ₄ ; 0,1% fosfato de diamônia; água pH=7,1 controlado até 6,8	65,0	11000	27-28	72
<i>X. Campestris</i> NRRL-B-1459	Souw e De-main 1979	Meio químico definido: 4% sacarose; 0,5% KH ₂ PO ₄ ; 0,02% MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,2% (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,2% ácido cítrico; 0,0006% H ₃ BO ₃ 0,0006% ZnO; 0,00024% FeCl ₃ .6H ₂ O; 0,002% CaCO ₃ e 0,13 mL HCl. pH=7,0 mais 1,0% ácido succínico	56,0	7000	27	72
<i>X. manihotis</i> I A C		Meio de produção: é igual ao meio químico definido mais 0,25% de ácido succínico.	70,0	15000	25	96
			68,5	8500	30	96

(1978) e Souw e Demain (1979), foram em ambos os casos Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 selecionadas (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).

5. CONCLUSÕES

1. Quando adicionadas diferentes concentrações de glicose ou sacarose ao Meio Basal para a produção de goma xantana por Xanthomonas manihotis, os resultados obtidos indicaram sacarose a 4% como a melhor fonte de carbono a ser acrescentada ao Meio de Produção.
2. A adição de ácidos orgânicos, em concentrações adequadas, estimula a produção de goma xantana por Xanthomonas manihotis. Em nosso trabalho, a adição de 0,25% de ácido succínico foi a que melhor contribuiu para o aumento da viscosidade do caldo fermentado.
3. Quando testadas diferentes fontes de nitrogênio, observou-se que, o crescimento de Xanthomonas manihotis aumenta com o aumento da concentração do nitrogênio. Entretanto, a produção do biopolímero é favorecida quando o microrganismo está sob limitação de nitrogênio.
4. A concentração de fosfato inorgânico no caldo de fermentação mostrou que, embora quantidades acima de 25 mM/L não afetem o crescimento de Xanthomonas manihotis, acarretam uma diminuição da goma produzida.

6. BIBLIOGRAFIA

- Anônimo. 1971. Canada Gazette, Part II; 105.
- Anônimo. 1973A. The National Food Institute, Denmark.
- Anônimo. 1973B. New Zeland Food and Drug Regulations.
- Anônimo. 1977. Food Technology. 31:53-54.
- Arden, S. 1974. Chocolate flavored liquid confections and methods for making the same. U.S. Pat. 3 784 715.
- Behrens, U., M. Klima, S. Fiedler. 1980. Growth and accumulation of polysaccharide by Xanthomonas campestris NRRL-B-1459. Z. Allg. Mikrobiol. 20:209-213.
- Betz, D.A. 1979. Xanthan gum, a biosynthetic polysaccharide for the food industry. Food Technology in Australia. 31:11-16.
- Booth, A.N., A.P. Hendrickson and F. De Eds 1963. Physiologic effects of three microbial polysaccharides on rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 5:478-484.
- Cadmus, M.C., S.P. Rogovin, K.A. Burton, J.E. Pittsley, C.A. Knutson and A. Jeanes. 1976. Colonial variation in Xanthomonas campestris NRRL-B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. J. Can. Microbiol. 22:942-948.
- Cadmus, M.C., C.A. Knutson, A.A. Lagoda, J.E. Pittsley and K.A. Burton. 1978. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. Biotechnol. Bioeng. 20:1003-1014.

- Catley, B.J. 1971. Role of pH and nitrogen limitation in the elaboration of the extracellular polysaccharide pullulan by Pullularia pullulans. Appl. Microbiol. 22:650-654.
- Chen, W.P., S.L. Cheng, C.L. Lai. 1975. Studies on gum production II. Cultivation conditions in laboratory. Report of Taiwan sugar research institute, Tainan, Taiwan. Republic of China. 69:45-52.
- Chen, W.P. and C.H. Tsou. 1976. A new potential product from sucrose microbial gum. Taiwan sugar research institute, Taipei, Taiwan. Republic of China. Taiwan sugar. 23:14-16.
- Cheng, S.L., W.P. Chen and C.L. Lai. 1978. Studies on industrial gum production by fermentation. V. An investigation on the recovery of industrial gum. Dep. By - Prod. Util. Taiwan sugar research institute, Tainan, Taiwan. Republic of China. 78:81-87.
- Corpe, W.A. 1964. Factors influencing growth and polysaccharide formation by Chromobacterium violaceum. J. Bacteriol. 88:1433-1441.
- Cottrell, I.W. 1979. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides. ACS Symposium series 126. Sandford and Matsuda editors. pp. 251-270.
- Decreto Lei Nº 55.871, ...1965 - Legislação Federal do Setor Saúde. Ministério da Saúde I:498.
- Dugid, J.P. and J.F. Wilkinson. 1953. The influence of cultural conditions of polysaccharide production by Aerobacter aerogenes. J. Gen. Microbiol. 9:174-189.
- Edlin, R.L. 1972. Method of producing a dehydrated food product. U.S. Pat. 3 694 236.

- Food and Drug Administration. 1969. Food additives permitted in food for human consumption: Xanthan gum. Federal Register 34(53) Part 121:5376. March 19.
- Food and Drug Administration. 1971. French dressing identity standard; confirmation of effective date of order listing xanthan gum as an optional ingredient. Federal Register 36(168) Part 25:17333. August 28.
- Food and Drug Administration. 1973. Certain cheese products; order listing xanthan gum as an optional ingredient. Federal Register 38(49) Part I:6883. March 14.
- Gabby, J.L., D.D. Corbin and J.B. Lowe. 1974 A. Ice milk or low fat imitation ice cream. U.S. Pat. 3 800 036.
- Gabby, J.L., D.D. Corbin and J.B. Lowe. 1974 B. Low calorie topping, spread, and frozen dessert. U.S. Pat. 3 809 764.
- Graham. H.D. 1977. Food colloids. The AVI publishing Company Inc. Westport Connecticut.
- Jeanes, A.R., P. Rogovin, M.C. Cadmus, R.W. Silman and C.A. Knutson. 1976. Polysaccharide (xanthan) of Xanthomonas campestris NRRL-B-1459: Procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. ARS-NC-51 Agriculture Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Jenkinson, T.J. and T.P. Williams. 1973. Gel-coated frozen confection. U.S. Pat. 3 752 678.
- Kelco Co. 1972. "Xanthan gum / Keltrol / Kelzan / a natural biopolysaccharide for scientific water control". San Diego, Calif. E.U.A.

- Kidby, D. 1977. Culture maintenance and productivity. ACS Symposium Series 45. P.A. Sandford and A. Laskins editors.
- Kidby, D., P. Sandford, A. Herman, M.C. Cadmus. 1977. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: Xanthomonas campestris NRRL-B-1459. Appl. Environm. Microbiol. 33:840-845.
- Leach, J.G., V.G. Lilly, H.A. Wilson and M.R. Purvis Jr. 1957. Bacterial polysaccharides; the nature and function of the exudate produced by Xanthomonas phaseoli. Phytopathology. 47:113-120.
- Bc/5050 Lilly, V.G., H.A. Wilson and J.G. Leach. 1958. Bacterial polysaccharides II. Laboratory scale production of polysaccharides by species of Xanthomonas. Appl. Microbiol. 6:105-108.
- Lindblom, G.P. and J.T. Patton. 1967. Heteropolysaccharide fermentation process. U.S. Pat. 3 328 262.
- McNeely, W.H. and J.J. O'Connell. 1966. Process for producing Xanthomonas hydrophilic colloid. U.S. Pat. 3 232 929.
- Moraine, R.A. and P. Rogovin. 1973. Kinetics of the xanthan fermentation. Biotechnol. Bioeng. 15:225-237.
- Nguyen, C. D., J. L. Brehant, B.J. Pons and M. Sechet. 1977. Polysaccharides by fermentation. Ger. offen. 2 645 975 (Cl. CO8B37/00).
- Pappagianis, D. and G.S. Kobayashi. 1958. Production of extracellular polysaccharide in cultures of Coccidioides immitis. Mycologia 50:229-238.
- Resolução Nº 15/75. 1975. Compendio de Normas e padrões para alimentos. Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação.

- Robbins, D.J., J.E. Moulton and A.N. Booth. 1964. Subacute toxicity study of a microbial polysaccharides on rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 5:478-484.
- Rocks, J.K. 1971. Xanthan gum. *Food Technol.* 25:22-31.
- Rogovin, S.P., R.F. Anderson and M.C. Cadmus. 1961. Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 3:51.
- Rogovin, S.P. and W.J. Albrecht. 1964. Recovering microbial polysaccharides from their fermentation broths. U.S. Pat. 3 119 812.
- Rogovin, S.P. 1969. A single fermentor continuous process. U.S. Pat. 3 485 719.
- Sandford, P.A. 1979. Exocellular Microbial polysaccharides. *Adv. in Carb. Chem. and Biochem.* 36:292-296.
- Sandford, P.A., J.E. Pittsley, C.A. Knutson, P.R. Watson, M.C. Cadmus and A. Jeanes. 1977. 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.
- Sandvik, E.I. and J.M. Maerker. 1977. Application of xanthan gum for enhanced oil recovery. ACS Symposium Series 45. P.A. Sandford and A. Laskins editors. pp. 242-264.
- Schuppner, H.R. Jr. 1971. Heat reversible gel. U.S. Pat. 3 557 016.
- Silman, R.W. and P. Rogovin. 1970. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: Laboratory investigation. *Biotechnol. Bioeng.* 12:75-83.

- Silman, R.W. and P. Rogovin. 1972. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: Effect of dilution rate. *Biotechnol. Bioeng.* 14:23-31.
- Silman, R.W. and E.B. Bagley. 1979. The viscostat: Productstat method of feed-rate control in continuous fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 22:173-179.
- Sloneker, J.H. and A. Jeanes. 1962. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *Can. J. of Chem.* 40:2066-2071.
- Souw, P. and A.L. Demain. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *Appl. Environm. Microbiol.* 37:1186-1192.
- Souw, P. and A.L. Demain. 1980. Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. *J. Ferment. Technol.* 58:411-416.
- Sutton, J.C. and P.H. Williams. 1970. Comparison of extracellular polysaccharide of *Xanthomonas campestris* from culture and from infected cabbage leaves. *Can. J. Botany.* 48:645-651.
- Wells, J. 1977. Extracellular microbial polysaccharides. A critical overview. ACS Symposium Series 45. P.A. Sandford and A. Laskins editors. pp. 299-325.
- Werneau, W.C. 1980. Fermentation methods for xanthan production (Pfizer Inc.) Ger. offen. 2 947 740 (Cl. C12 D13/04).
- Williams, A.G. and J.W.T. Wimpeny. 1977. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *J. Gen. Microbiol.* 102:13-21.
- Wintersdorff, P. 1972. Method of preparing freeze-thaw-stable spoonable salad dressing. U.S. Pat. 3 676 157.