

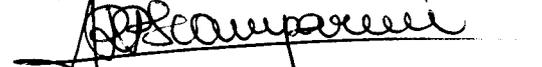
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DE PARÂMETROS PARA A PRODUÇÃO DE INÓCULOS
LIOFILIZADOS DE *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por LUCIANA MARIA BAIOTTO e aprovada pela Comissão Julgadora em 10.02.1997.

Campinas, 19 de fevereiro de 1997. Luciana Maria Baiotto

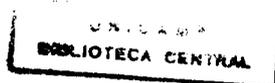

Prof^a.Dra. ADILMA R.P. SCAMPARINI

Presidente da Banca

Prof^a.Dr^a. Adilma Regina Pippa Scamparini
Orientadora

Tese Apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas
1997



UNIDADE	B.C
N.º CHAMADA	TRUNICAMP
PREÇO	R\$ 301,03
PREÇO	R\$ 281,97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	13.05.97
N.º CPD	

CM.00098159-1

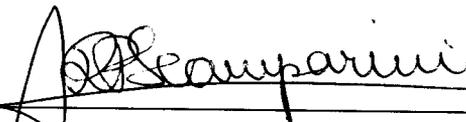
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

B161e Baiocco, Luciana Maria
Estudo de parâmetros para a produção de inóculos
liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* /
Luciana Maria Baiocco. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Adilma Regina Pippa Scamparini
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Xanthomonas campestris. 2.Biopolímeros.
3.Inoculação. 4.Xantana. I.Scamparini, Adilma Regina
Pippa. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^ª. Dr.^ª. Adilma Regina Pippa Scamparini


Prof. Dr. José Luiz Pereira


Prof.^ª. Dr.^ª. Glaucia Maria Pastore

Prof.^ª. Dr.^ª. Claire Tondo Vendruscolo

Campinas, de de 1997.

Aos meus pais: Luciano e Darcy e
ao meu amigo de todas as horas Masaharu.

AGRADECIMENTOS

À Profª. Drª. Adilma R. P. Scamparini, meu especial agradecimento pela orientação e incentivo.

Aos professores José Luiz Pereira, Glaucia M. Pastore e Claire T. Vendruscolo pelas sugestões apresentadas na redação final deste trabalho.

À Iriani R. Maldonade pela colaboração, amizade e bom humor.

À Raquel, Dirce e Dona Jacinta do Laboratório de Higiêne da FEA pela ajuda valiosa no início do desenvolvimento da parte prática deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório Geral da FEA pela amizade, auxílio e incentivo durante esses anos de convivência, em especial para Luciene, Luís, Daniela, Ivani, Priscila e Ronaldo pela ajuda em diversos momentos.

À Helena e Karla do Laboratório Geral por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia da FEA, especialmente às minhas amigas Daniela, Raquel (Cida), Tânia, Cristina, Márcia e Mônica pela amizade, ajuda e carinho que nunca serão esquecidos.

Ao pessoal da Secretaria do DCA e da Pós-Graduação pelos auxílios prestados.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que de certa forma colaboraram para a realização deste trabalho.

	página
ÍNDICE	
ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
NOMENCLATURA.....	vi
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	viii
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1- Histórico.....	4
2.2- Propriedades e Aplicações Comerciais da Goma Xantana.....	5
2.3- Fatores Envolvidos na Produção de Goma Xantana pela Bactéria <i>Xanthomonas campestris</i>	6
2.3.1- Características da Bactéria <i>Xanthomonas campestris</i>	6
2.3.2- Biossíntese da Goma Xantana.....	7
2.3.3- Estrutura da Goma Xantana.....	8
2.3.4- Produção de Goma Xantana.....	9
2.3.5- Uso de Fontes Alternativas para Produção de Goma Xantana.....	14
2.3.6- Recuperação da Goma Xantana.....	17
2.4- Manutenção, Propagação e Produção de Inóculos de <i>X. campestris</i>	18
2.4.1- Técnicas Alternativas para a Manutenção de <i>X. campestris</i>	19
2.4.2- Inóculos Liofilizados.....	22
2.4.2.1- Danos Provocados pela Liofilização.....	23
2.4.2.2- Fatores que Afetam a Sobrevivência de Culturas Liofilizadas.....	26
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1- MATERIAIS.....	29
3.1.1- Equipamentos.....	29
3.1.2- Material de Consumo.....	30
3.1.3- Meios de Cultura.....	30
3.1.4- Microrganismo.....	30
3.2- MÉTODOS.....	31
3.2.1- Preservação e Manutenção do Microrganismo.....	31
3.2.2- Preparo do Inóculo Inicial.....	31

3.2.3-	Determinação da Curva de Crescimento.....	32
3.2.3.1-	Determinação do pH Final do Meio de Crescimento.....	32
3.2.3.2-	Determinação do Crescimento Celular.....	32
3.2.3.3-	Determinação do Teor de Açúcares Redutores Totais.....	33
3.2.3.4-	Determinação da Quantidade de Goma Xantana.....	33
3.2.4-	Produção do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i>	34
3.2.4.1-	Produção do Inóculo Inicial.....	34
3.2.4.2-	Determinação da Influência do Meio de Produção Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i>	34
3.2.4.3-	Determinação da Influência do Tempo de Crescimento Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado.....	35
3.2.4.4-	Determinação da Influência do Meio de Suspensão Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado.....	35
3.2.4.5-	Processo de Suspensão das Células.....	36
3.2.4.6-	Liofilização dos Inóculos.....	36
3.2.5-	Estudo da Influência do Teor de Umidade Residual na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado.....	37
3.2.6-	Processo de Reidratação dos Inóculos Liofilizados.....	37
3.2.6.1-	Determinação da Influência do Tempo de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado.....	38
3.2.6.2-	Determinação da Influência da Concentração de Sacarose Presente no Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado.....	38
3.2.6.3-	Determinação do pH Ideal do Meio de Reidratação.....	39
3.2.7-	Determinação da Influência do Tempo e da Temperatura de Armazenamento na Viabilidade do Inóculo Liofilizado.....	39
3.2.8-	Contagem de Microrganismos e Cálculo da Taxa de Sobrevivência Celular.....	39
3.2.9-	Testes de Fermentação para a Produção de Goma Xantana Empregando os Inóculos Liofilizados.....	40
3.2.9.1-	Determinação da Curva de Crescimento de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> Liofilizada.....	40

3.2.9.2-	Avaliação do Desempenho do Inóculo Liofilizado em Comparação com Técnicas Convencionais de Inoculação do Meio de Fermentação.....	41
3.2.9.3-	Determinação da Concentração Ideal do Inóculo Liofilizado para Inoculação do Meio de Fermentação.....	42
3.2.9.4	Produção de Goma Xantana Utilizando Diferentes Inóculos Liofilizados.....	42
4-	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1-	Dados Morfológicos de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> Linhagem nº 280.....	44
4.2-	Crescimento da Bactéria <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> Linhagem nº 280.....	44
4.2.1-	Influência da Concentração de Sacarose no Crescimento Celular.....	45
4.3-	Produção do Inóculo Liofilizado.....	46
4.3.1-	Fatores que Afetam a Sobrevivência dos Microrganismos na Liofilização...	46
4.3.1.1-	Determinação da Influência das Condições de Crescimento das Bactérias que serão Liofilizadas na Viabilidade do Inóculo Liofilizado.....	46
4.3.1.2-	Influência da Composição do Meio de Produção Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado.....	48
4.3.1.3-	Influência do Meio de Suspensão na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	51
4.3.1.4-	Efeito do Meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	58
4.3.1.5-	Efeito das Condições de Reidratação na Sobrevivência das Células de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	62
4.3.1.5.1-	Efeito do Tempo de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado.....	63
4.3.1.5.2-	Influência do pH do Meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado.....	64
4.3.2-	Influência Combinada dos Meios de Produção, Suspensão e Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	65
4.3.2.1-	Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade dos Inóculos Liofilizados de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> Constituídos por Células Produzidas em Meio YM com Variação no Tipo e nas Concentrações de Sais e Suspensas em Meio YM Padrão	66

4.3.2.2-	Influência do Meio de Reidratação no Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de Sacarose e Suspensas em Meio YM Padrão....	69
4.3.2.3-	Influência do Meio de Reidratação e do Meio de Suspensão na Viabilidade Celular dos Inóculos Liofilizados de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> cujas Células foram Produzidas em Meio YM Padrão.....	70
4.3.3-	Influência do Tempo e da Temperatura de Armazenamento na Viabilidade Celular do Inóculo de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	72
4.3.4-	Influência do Teor de Umidade Residual na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado.....	74
4.4-	Avaliação do Desempenho das Culturas Liofilizadas de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Utilizadas como Inóculos para Produção de Goma Xantana.....	77
4.4.1-	Determinação da Curva de Crescimento da Bactéria Liofilizada.....	77
4.4.2-	Avaliação do Desempenho do Inóculo Liofilizado Comparado com Métodos Convencionais de Inoculação do Meio de Fermentação.....	79
4.4.3-	Influência da Concentração do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 na Produção de Goma Xantana.....	80
4.5-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados.....	80
4.5.1-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas e Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios.....	81
4.5.2-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,1% de NH_4NO_3 , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios.....	82
4.5.3-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 1,0% de NH_4NO_3 , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios.....	83
4.5.4-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,5% de NH_4Cl , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios.....	84

4.5.5-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 1,0% de NH ₄ Cl, Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios.....	85
4.5.6-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,01% de MgSO ₄ .7H ₂ O, Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios.....	85
4.5.7-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas e Reidratados em Diferentes Meios.....	86
4.5.7.1-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Água Destilada e Reidratados em Diferentes Meios.....	87
4.5.7.2-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Sacarose 10% e Reidratados em Diferentes Meios.....	87
4.5.7.3-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10% e Reidratados em Diferentes Meios.....	88
4.5.7.4-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação, Sem Agitação.....	89
4.5.7.5-	Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Recuperadas na Fase de Declínio Celular, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10% e Reidratadas em Diferentes Meios.....	89
4.6-	Influência de Diferentes Métodos de Preservação na Viabilidade de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> linhagem nº 280.....	91
5-	CONCLUSÕES.....	129
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 1- Influência do Meio de Crescimento Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280.....	94
TABELA 2- Influência do Meio de Suspensão Celular na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280.....	95
TABELA 3- Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Produzido e Suspenso em Meio YM Padrão.....	96
TABELA 4- Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de NH_4NO_3 e Liofilizadas em Meio YM Padrão.....	97
TABELA 5- Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de NH_4Cl e Liofilizadas em Meio YM Padrão.....	98
TABELA 6- Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> 280 Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e Liofilizadas em Meio YM Padrão..	99
TABELA 7- Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de Sacarose e Liofilizadas em Meio YM Padrão.....	100
TABELA 8- Influência dos Meios de Reidratação e de Suspensão na Viabilidade dos Inóculos Liofilizados de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Constituídos por Células Cultivadas em Meio YM Padrão.....	101

TABELA 9-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas e Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	102
TABELA 10-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,1% de NH_4NO_3 , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	103
TABELA 11-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 1,0% de NH_4NO_3 , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	104
TABELA 12-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,5% de NH_4Cl , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	105
TABELA 13-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 1,0% de NH_4Cl , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	106
TABELA 14-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	107

TABELA 15-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM, Suspensas em Água Destilada, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	108
TABELA 16-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM, Suspensas em Solução de Sacarose 10%, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	109
TABELA 17-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	110
TABELA 18-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação, sem Agitação.....	111
TABELA 19-	Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Recuperadas após 72 Horas de Incubação (Fase de Declínio Celular) e Suspensas em Meio YM Padrão, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.....	112
TABELA 20-	Influência de Diferentes Métodos de Preservação na Viabilidade Celular de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> n° 280 em Diferentes Períodos de Armazenamento.....	113

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1- Colônias de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> Linhagem nº 280 Cultivadas em Meio YM Ágar a 30°C por 48 horas.....	114
FIGURA 2- Colônias de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> Linhagem nº 280 Plaqueadas em Meio YM Ágar pelo Método de Plaqueamento em Superfície e Incubadas a 30°C por 48 Horas.....	115
FIGURA 3- Curva de Crescimento da Bactéria <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> Linhagem nº 280 Cultivada em Meio YM Padrão a 30°C e 200 rpm.....	116
FIGURA 4- Efeito da Concentração de Sacarose no Meio de Crescimento Celular na Produção de Célula e de Goma Xantana e no Teor de Açúcares Redutores Totais Após 40 Horas de Cultivo a 30°C e 200 rpm.....	117
FIGURA 5- Influência do Tempo de Crescimento das Células Produzidas em Meio YM Padrão na Viabilidade Celular do Inóculo após a Liofilização.....	118
FIGURA 6- Influência da Concentração de Sacarose Utilizada no Meio de Reidratação na Taxa de Sobrevivência de Diferentes Inóculos Liofilizados de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Produzidos em Meio YM Padrão e Suspensos em Diferentes Meios.....	119
FIGURA 7- Influência do Tempo de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Constituído por Células Produzidas e Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratadas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%.....	120
FIGURA 8- Influência do pH do Meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> Linhagem nº 280 Constituído por Células Produzidas e Suspensas em Meio YM Padrão.....	121
FIGURA 9- Influência do Tempo de Armazenamento na Sobrevivência dos Inóculos Liofilizados de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 em Diferentes Meios de Suspensão, Armazenados em Freezer a -20°C.....	122

FIGURA 10-	Influência do Tempo de Armazenamento na Sobrevivência dos Inóculos Liofilizados de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 em Diferentes Meios de Suspensão, Armazenados à Temperatura Ambiente (27°C).....	123
FIGURA 11-	Influência do Teor de Umidade Residual na Sobrevivência das Células Liofilizadas de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> em Diferentes Meios de Suspensão, Após 12 meses de Armazenamento em Freezer a -20°C.....	124
FIGURA 12-	Influência do Teor de Umidade Residual na Sobrevivência das Células Liofilizadas de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 em Diferentes Meios de Suspensão, Após 12 meses de Armazenamento à Temperatura Ambiente (27°C).....	125
FIGURA 13-	Curva de Crescimento da Bactéria <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Liofilizada, Cultivada em Meio YM Padrão e Incubada a 30°C e a 200 rpm.....	126
FIGURA 14-	Avaliação do Desempenho do Inóculo Liofilizado em Comparação com Métodos Convencionais de Inoculação do Meio de Fermentação Utilizando as Condições Estabelecidas por JEANES et alii (1976).....	127
FIGURA 15-	Influência da Concentração do Inóculo Liofilizado de <i>X. campestris</i> pv. <i>manihotis</i> nº 280 Utilizado na Inoculação do Meio de Fermentação (JEANES et alii, 1976) para a Produção de Goma Xantana.....	128

NOMENCLATURA

ART: Açúcares Redutores Totais

MCS: Massa Celular Seca

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia por ml

Ág. Des.: Água Destilada

Sal.: Solução Salina de NaCl

Dex.: Solução de Dextrose

Skm.: Solução de Leite Desnatado Reconstituído (Skim Milk)

Sac.: Solução de Sacarose

Cl.: Solução de NH_4Cl

Nit.: Solução de NH_4NO_3

Mg.: Solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

RESUMO

Inóculos liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 foram produzidos visando à preservação da viabilidade celular e à manutenção da capacidade de produção de goma xantana pelo microrganismo liofilizado.

No estudo de culturas liofilizadas não é possível avaliar somente um parâmetro isoladamente, uma vez que o processo de obtenção dos inóculos liofilizados envolve inúmeras etapas, todas com considerável grau de letalidade.

Desta maneira, foram determinados os efeitos das condições de crescimento, dos diferentes meios de suspensão e de reidratação das células na taxa de sobrevivência do inóculo após a liofilização. A utilização do meio YM padrão como meio de cultivo e de suspensão das células e o uso de solução de leite desnatado reconstituído 10% como fluido de reidratação do inóculo liofilizado resultou na mais alta taxa de viabilidade celular obtida neste estudo. Nestas condições, foi obtido 80% de sobrevivência celular após a liofilização. Com a inoculação da cultura liofilizada em meio de fermentação contendo 2,0 g/l de sacarose foram produzidos 12,89 g/l de goma xantana, representando um aumento significativo na produção deste exopolissacarídeo em relação à produção de goma xantana através de inóculos convencionais líquido e por alçada.

A viabilidade das células liofilizadas foi melhor preservada quando os inóculos foram armazenados a -20°C . O armazenamento em dessecador à temperatura ambiente comprometeu a taxa de sobrevivência das culturas ocasionando uma baixa recuperação de células viáveis. Testes de viabilidade realizados após 12 meses de preservação mostraram que as culturas liofilizadas, mesmo as armazenadas em dessecador à temperatura ambiente não sofreram deterioração morfológica, permanecendo estáveis. Não foi detectado também o aparecimento de sublinhagens mutantes formadoras de colônias de menor diâmetro.

SUMMARY

Freeze-dried inocula were produced from *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 280 strain to have in view the preservation of cell viability and its capability to produce xanthan gum by freeze-dried microorganism.

During production of freeze-dried cultures it was not possible evaluate only one parameter, because the process to obtain the freeze-dried inocula involved several steps which presented a moderated lethal rate.

It was determinated the effects of growth conditions and different suspending and rehydration fluids on the inocula survival rate after lyophilization. When YM broth was used as growth and cell suspension media and skim milk 10% used as rehydration fluid the highest viability rate was found. From this cultural conditions it was found approximately 80,33% of survival rate. When this freeze-dried inocula was inoculated in fermentation media containing 2% sucrose it was produced 12,89 g of xanthan gum per liter of broth. This data indicates a significant increase in the exopolysaccharide production.

The viabilidad of freeze-dried cells showed good preservation when the inocula were stored at -20°C . The storage at room temperature (25°C) compromised the culture survival rate occasionating a lower recovery of viable cells.

Viability tests carried out after 12 months of preservation demonstrated that the freeze-dried culture stored at -20°C and at room temperature did not presented any morphological modification. It was not found any mutant strain capable to form smaller colonies.

1 - INTRODUÇÃO

De acordo com SUTHERLAND (1972 e 1992), GLICKSMAN (1982) e KENNE (1983), os exopolissacarídeos de origem microbiana constituem uma importante fonte de agentes emulsificantes e estabilizantes com adequadas propriedades reológicas para aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. A produção de exopolissacarídeos por técnicas de fermentação industrial e subsequente recuperação e purificação, apresenta vantagens sobre a produção de outras gomas, com propriedades similares encontradas em fontes tradicionais como algas marinhas e plantas terrestres que são extremamente susceptíveis aos fenômenos que ocorrem na natureza.

Os exopolissacarídeos são uma característica comum entre os microrganismos e podem ser encontrados tanto na forma de uma discreta cápsula ao redor da célula como podem ser secretados no meio externo. Embora estes polímeros sejam produzidos, predominantemente pelas bactérias e leveduras isoladas de solo e de outros ambientes naturais, podem ser encontrados também em outras espécies microbianas, incluindo microrganismos patogênicos (KANG et alii, 1983).

A bactéria fitopatogênica, *Xanthomonas campestris* produz grande quantidade de exopolissacarídeo quando cultivada em meio contendo carboidratos. Este polissacarídeo que recebeu a denominação geral de goma xantana é, sem dúvida, a mais excepcional das gomas já desenvolvidas por processos biotecnológicos (BETZ, 1979). A goma xantana é composta por D-glicose, D-manose e ácido D-glicurônico na proporção de 3:3:1, além de resíduos de acetato (4,7%) e de piruvato (3,0 a 3,5%). Sua produção comercial é feita por fermentação em batelada, usando meio bem aerado, contendo sacarose ou glicose, nitrogênio e fosfato (SMILEY, 1966; MORAINÉ e ROGOVIN, 1971a,b; GODET, 1973; SOUW e DEMAIN, 1979).

Devido a grande aplicabilidade industrial da goma xantana e ao seu amplo mercado mundial, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas para a determinação

das condições ótimas de crescimento celular, de produção, recuperação e de purificação deste exopolissacarídeo (SILMAN E ROGOVIN, 1970, 1972; KENNEDY et alii, 1982; FUNAHASHI et alii, 1987 e AHLGREN, 1993).

Segundo BAIRD e PETTITT (1991) o mercado americano anual para as gomas utilizadas em alimentos foi estimado em 405 milhões de dólares e somente para a goma xantana foi avaliado em torno de 60 milhões de dólares. De acordo com dados fornecidos pela Cacex, a importação de goma xantana no Brasil evoluiu de 29,9 toneladas para 132,6 toneladas somente no período de 1984 a 1986 (ABIA, 1989-1993). Estes dados justificam a intensa procura por novos processos mais viáveis e eficientes para a produção de goma xantana em lotes homogêneos com qualidade assegurada.

No entanto, a instabilidade genética da bactéria *X. campestris* ocasionada pelo seu contínuo subcultivo durante as etapas de produção de inóculo é um dos principais fatores que afetam a produção de goma xantana (JEANES et alii, 1976). O aparecimento de linhagens mutantes ao longo do cultivo de *X. campestris* tem sido relatado na literatura (MORAINE e ROGOVIN, 1973; CADMUS et alii, 1978). Estas sublinhagens produzem uma goma xantana claramente diferente da original, com propriedades reológicas inadequadas e com baixo rendimento, ocasionando um alto custo de produção (RAMÍREZ et alii, 1988).

Deste modo, a qualidade do inóculo de *X. campestris* é comercialmente importante, pois, o custo total da fermentação diminui com o aumento da produtividade. Com a utilização de inóculos bem adaptados, estáveis, livres de sublinhagens improdutivas consegue-se além de um aumento na produção, a manutenção e preservação das características originais da cultura bacteriana (LAWRENCE, 1973).

Devido a importância da obtenção de inóculos de *X. campestris* da mais alta qualidade, várias técnicas alternativas têm sido propostas (KIDBY et alii, 1977; SUSLOW e SCHROTH, 1981; GIBSON e KHOURY, 1986). No entanto, a técnica mais segura e eficiente para a produção de inóculos de *X. campestris* é, certamente, através da liofilização (KIDBY et alii, 1977).

De modo geral, na produção de inóculos liofilizados, o tipo e a complexidade dos microrganismos, o estado fisiológico das culturas, os meios de crescimento e suspensão celular, a atmosfera e a temperatura de armazenamento são fatores importantes que influenciam a sobrevivência das bactérias e a manutenção de suas características durante a liofilização. Os tratamentos subsequentes dos microrganismos liofilizados pelo fornecimento de condições adequadas pode resultar no reparo das injúrias e dos danos sofridos e até mesmo recuperar a função normal da célula (MAZUR, 1977; FONT DE VALDÉZ et alii, 1985a,b,c; BOZOGLU et alii, 1987; CHAMPAGNE et alii, 1991a,b; e ISRAELI et alii, 1993).

Este trabalho teve como principal objetivo o estudo dos parâmetros envolvidos na produção de inóculos liofilizados de alta qualidade da bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 para sua utilização como inóculos viáveis para a produção de goma xantana devido seu alto valor comercial.

Uma vez que a produção de goma xantana é diretamente influenciada pelas condições metabólicas das bactérias inoculadas no meio de fermentação, a produção de inóculos liofilizados que contenham células de *X. campestris* geneticamente estáveis, torna-se uma etapa fundamental no processo de produção deste exopolissacarídeo.

Desta forma, as melhores condições de preparo destes inóculos liofilizados foram determinadas com a finalidade de manter uma alta taxa de sobrevivência celular e de minimizar as perdas de viabilidade que ocorrem, inevitavelmente, durante o processo de liofilização das culturas bacterianas.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Histórico

Em 1960, a Northern Utilization Research and Development dos EUA, anunciou o desenvolvimento do polissacarídeo B-1459 como sendo um produto de fermentação da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris*. Este polímero foi identificado como sendo um heteropolissacarídeo extracelular, hidrossolúvel, de alto peso molecular e com propriedades únicas que o diferenciava das demais gomas solúveis em água, conhecidas até aquele momento. Logo após este pronunciamento, algumas indústrias começaram a investigar o polímero B-1459 com relação à sua importância comercial. Mais tarde, o termo goma xantana foi adotado como nome genérico deste polissacarídeo (GODET, 1973).

Em 1969, após inúmeros testes intensivos para comprovar sua segurança como aditivo alimentar, a US Food and Drug Administration (FDA) autorizou o uso da goma xantana em alimentos, sem limitações específicas de quantidade. Estes testes, realizados em ratos e cães, incluíam estudos reprodutivos e nutricionais a curto e longo prazo os quais indicaram que a goma xantana não inibia o crescimento, não provocava alterações significantes no peso dos órgãos ou na constituição sangüínea destes animais, não causava irritação nos olhos nem na pele e não promovia a incidência de tumores. Os testes nutricionais mostraram que a goma xantana não era degradada no sistema digestivo, passando através deste, quase totalmente sem modificação (BETZ, 1979; PETTITT, 1982).

No Brasil, o uso de goma xantana como estabilizante e espessante em alimentos foi permitido pelo Decreto Lei número 55.871 do ano de 1965. O mercado brasileiro é um tradicional importador de polissacarídeos para uso industrial, com exceção dos amiláceos e segue a tendência mundial, na qual o total de importações de biopolímeros vêm crescendo (CRUZ, 1983 e ABIA, 1989/1993).

2.2 - Propriedades e Aplicações Comerciais da Goma Xantana

O sucesso comercial da goma xantana deve-se principalmente, a suas propriedades físicas e químicas inigualáveis, à eficiência do processo de fermentação e ao desenvolvimento contínuo de novas aplicações industriais (SYMES, 1980; KANG et alii, 1983).

Segundo JEANES (1974) e BETZ (1979), as propriedades reológicas da goma xantana e sua estabilidade numa ampla faixa de pH e de temperatura mesmo na presença de sais, a torna um excelente agente estabilizante para alimentos, como cremes, sucos artificiais, sobremesas enlatadas ou em pó, molhos para saladas, carne, frango ou peixe, assim como para xaropes e coberturas para sorvetes e sobremesas. A compatibilidade deste polissacarídeo com a maioria dos colóides usados em alimentos, incluindo o amido, torna a goma xantana ideal para a preparações de pães e outros produtos para panificação (CHRISTIANSON et alii, 1974).

O FDA permite a adição de goma xantana em produtos como: queijos e seus derivados, sobremesas congeladas, alguns produtos a base de leite, molhos especiais para saladas, molhos de tomates, produtos cárneos e seus derivados, produtos de panificação, sobremesas formuladas com amido, bebidas dietéticas, sorvete com baixa caloria, entre outros (PETTITT, 1982).

Outro grande consumidor de goma xantana é a indústria farmacêutica, onde este polissacarídeo é empregado em loções, géis e emulsões. A goma xantana fornece excelente estabilidade para cremes e loções, melhora as propriedades dos “shampoos” e de sabonetes líquidos, suspende pigmentos insolúveis e produz um creme de limpeza estável (BAIRD e PETTITT, 1991; DZIEZAK, 1991).

A boa estabilidade em soluções de ácido e de base fortes permite que a goma xantana seja usada como espessante em produtos de limpeza industrial, em banhos de metais e aplicações similares. A excelente propriedade de suspensão é muito útil em pulverizações agrícolas, em processos de fundição, em emulsões de látex, em

lubrificantes e em outros produtos contendo líquidos e sólidos insolúveis. A tolerância a ampla faixa de temperatura, a reologia e a estabilidade em soluções salinas são propriedades requeridas para aplicações nas indústrias de petróleo e de explosivos. A compatibilidade do biopolímero com uma grande variedade de tintas é muito útil na formulação de pastas de impressão e de soluções para aplicações têxteis (PETTITT, 1982).

De acordo com KENNEDY et alii (1982), a goma xantana tem sido utilizada extensivamente pela indústria do petróleo, na perfuração de novos poços e na recuperação secundária do petróleo. O uso de goma xantana em associação com a lama de perfuração e no fraturamento hidráulico tem resultado num processo de menor custo e maior eficiência para a indústria petroquímica. Na agricultura, a goma xantana tem sido usada como agente de suspensão e estabilizante em herbicidas, pesticidas, fertilizantes e fungicidas.

2.3 - Fatores Envolvidos na Produção de Goma Xantana pela Bactéria *Xanthomonas campestris*.

2.3.1 - Características da Bactéria *Xanthomonas campestris*

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* são microrganismos fitopatogênicos específicos de ocorrência natural. São bactérias Gram negativas, obrigatoriamente aeróbicas, com células exibindo morfologia de bastonetes curtos e delgados. O crescimento destas bactérias em meio YM ágar é caracterizado pela presença de grandes colônias de aspecto mucóide, com ou sem pigmentação (BRADBURY, 1984). As espécies de *Xanthomonas* podem crescer em meio contendo apenas 0,5% de glicose; 0,1% de NH_4Cl ; 0,2% de KH_2PO_4 e 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Metionina, ácido glutâmico e ácido nicotínico serviram apenas para estimular o crescimento, não sendo essenciais para a maioria das linhagens testadas (STARR, 1946).

A espécie *Xanthomonas campestris* é composta por linhagens fitopatogênicas de alta virulência que podem causar uma doença vascular em plantas da família das crucíferáceas, conhecida como podridão negra. O dano no sistema vascular da planta hospedeira é provocado pelo bloqueio do fornecimento dos nutrientes devido a viscosidade produzida pela presença do exopolissacarídeo sintetizado pela bactéria (SUTTON e WILLIAM, 1970). A virulência das linhagens pode estar mais relacionada com a viscosidade da goma do que com a quantidade produzida pelo microrganismo durante a infestação. Dentre os fatores que acarretam a propagação da doença está a infestação das sementes das plantas infectadas pelos microrganismos patogênicos e a persistência das bactérias no solo (FUKUI et alii 1994).

2.3.2 - Biossíntese da Goma Xantana

Segundo SUTHERLAND (1982a) a seqüência bioquímica para a biossíntese de goma xantana é iniciada com a entrada do substrato no interior da célula e sua modificação através de uma série de processos enzimáticos. Nesta etapa, o substrato pode ser entregue tanto para o catabolismo microbiano como para a síntese do polissacarídeo.

Na síntese do exopolissacarídeo, a construção da cadeia formada por unidades repetidas é realizada através da adição de monossacarídeos ativados denominados açúcares nucleotídeos. No caso específico da goma xantana, os açúcares nucleotídeos formados são o GDP- manose, UDP- glicose e UDP-ácido glicurônico. Estes açúcares nucleotídeos doam seqüencialmente seus resíduos de açúcares para o acceptor lipídico isoprenilfosfato C-55 para formar uma unidade de pentassacarídeo-P-P-lipídeo, que é subsequente polimerizado, formando a goma xantana. A seqüência correta é garantida pelos carregadores fosfato-álcool-isoprenóides e lipídeos-isoprenóides. No último estágio da síntese, são introduzidos os grupos acetil e pirúvico. Somente a formação dos açúcares nucleotídeos ocorre no interior do citoplasma, sendo que a biossíntese é completada ao atravessar a membrana citoplasmática atingindo o meio externo. A síntese enzimática da goma xantana através de fermentação sob condições

controladas, fornece um polímero estruturalmente uniforme com limitada variação de peso molecular, característica esta que pode contribuir para a extraordinária estabilidade da solução de goma xantana (IELPI et alii, 1981a,b, 1993; HARDING et alii, 1993, ROSEIRO et alii 1993a). KÖPLIN et alii (1992) e POLLOCK et alii (1994), relataram o mapeamento genético de uma região do DNA envolvida na biossíntese dos açúcares nucleotídeos UDP-glicose e GDP-manose.

Segundo JARMAN e PACE (1984) e RYE et alii (1988), a via de Entner-Doudoroff e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos são as principais rotas metabólicas utilizadas para conversão da glicose a CO₂ em *X. campestris*. Estima-se que para a síntese da goma xantana sejam utilizados 11 ATP para cada subunidade de 5 hexoses polimerizadas. Toda energia excedente do metabolismo de *X. campestris* é direcionada para a biossíntese da goma xantana, resultando no aumento da sua produção (ROSEIRO et alii, 1993a)

2.3.3 - Estrutura da Goma Xantana

A estrutura da goma xantana foi determinada como sendo formada por uma cadeia principal idêntica a da celulose, composta de unidades de D-glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ e cadeias laterais com resíduos alternados de D-manose e ácido D-glicurônico na proporção de 2:1 (SLONEKER et alii, 1964; JANSSON et alii, 1975). Assim, a β -D-manose terminal está ligada por ligações glicosídicas na posição 4 ao ácido β -D-glicurônico que, por sua vez, está ligado na posição 2 da α -D-manose. Em aproximadamente metade das unidades de D-manose terminal, um resíduo de ácido pirúvico está ligado nas posições 4 e 6. A unidade de D-manose não terminal carrega um grupo acetil na posição 6. O polímero original contém cerca de 4,7% de grupos O-acetil e 3,0 a 3,5% de resíduos de ácido pirúvico (ORENTAS et alii, 1963).

Estudos sobre a hidrólise da goma xantana foram realizados por CADMUS et alii (1982); SUTHERLAND (1982b) e SUTHERLAND e MacDONALD (1986). Como a goma xantana é essencialmente formada por uma cadeia principal de celulose, com

cadeias laterais de trissacarídeos ligadas às unidades de D-glicose alternadamente, pensou-se inicialmente, que tais polímeros fossem susceptíveis às celulases ou a outras enzimas $\beta(1,4)$ -glucanohidrolases. Entretanto, somente a goma xantana produzida por linhagens mutantes e aparentemente deficientes em cadeias laterais, mostraram alguma sensibilidade às celulases comerciais. O único sistema enzimático capaz de hidrolisar especificamente a goma xantana é proveniente da bactéria *Bacillus* sp e é constituído por duas enzimas induzidas pelo crescimento desta bactéria em meio contendo goma xantana como substrato. Os produtos da hidrólise da xantana por preparações enzimáticas incluem trissacarídeos, resíduos de manose e glicose.

2.3.4 - Produção de Goma Xantana

A goma xantana foi primeiramente relatada por ROGOVIN et alii (1961), como sendo um produto da fermentação de *X. campestris* NRRL B-1459, utilizando meio contendo 2% de glicose, 0,02% de nitrogênio e 0,2% de fosfato de potássio.

De acordo com SMILEY (1966) e MORAINÉ e ROGOVIN (1966), devido a alta viscosidade desenvolvida no fluido da cultura, somente 3 a 5% de glicose poderia ser usada no meio de fermentação para alcançar maior rendimento e eficiência. Na maioria das fermentações, o crescimento microbiano parava quando a viscosidade do meio alcançava cerca de 2000 cP (Brookfield LVT, 28°C, 30 rpm). Uma possível explicação para este fato estava na formação de uma camada de muco ao redor das células quando a viscosidade aumentava, causando uma resistência ao transporte de nitrogênio para o interior das células e, portanto, restringindo o crescimento e controlando a síntese de polímeros. Na maioria dos estudos realizados, a alta produção de goma favoreceu a emergência de sublinhagens bacterianas menos eficientes, mas que apresentavam um melhor desempenho em meio com alta viscosidade, quando comparadas com as culturas parentais.

SILMAN e ROGOVIN (1970) produziram goma xantana usando a bactéria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 em fermentações contínuas em meio contendo

glicose, uréia, sais minerais e resíduos solúveis de destilaria, por um período de 20 dias, sem reciclagem de nutrientes. Ficou determinado neste estudo que o componente limitante para o crescimento celular de *X. campestris* foi o nitrogênio. As taxas de consumo de glicose e de produção de goma xantana foram relacionadas com o pH e com a taxa de diluição da cultura. Assim, com uma alta taxa de diluição, a produção de xantana foi de 0,36 g/kg/h, com um rendimento de 68% em relação a glicose consumida. De acordo com estes autores, não houve evidência de deterioração da cultura bacteriana durante o período de fermentação analisado.

Estudos sobre a cinética da produção de goma xantana intensificaram-se a partir da década de 70 e foram realizados principalmente por MORAINÉ e ROGOVIN (1971a,b; 1973), SILMAN e ROGOVIN (1972) e JEANES et alii (1976). Nestes estudos, o crescimento celular foi tratado separadamente da formação do produto, sendo caracterizado por uma fase lag de crescimento celular quase ausente, com rápido declínio da taxa de crescimento já no primeiro dia de fermentação. O crescimento de *X. campestris* foi limitado pela exaustão de algum nutriente limitante, muito provavelmente, o nitrogênio. A taxa de formação de polímero foi altamente dependente da temperatura, da concentração de açúcares, do pH, da concentração do oxigênio dissolvido e possivelmente, da viscosidade do meio.

CADMUS et alii (1978) observaram a ocorrência de linhagens variantes menos eficientes que as linhagens parentais durante a produção de goma xantana em meio sintético composto por 2,5% de glicose, 0,5% de K_2HPO_4 e 0,01% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. As linhagens originais formavam colônias de maior diâmetro fornecendo alto rendimento de goma xantana com características reológicas aparentemente normais. As sublinhagens produziram menor quantidade de polissacarídeo e com propriedades reológicas indesejáveis. No entanto, a presença de linhagens que formavam colônias maiores não assegurava a qualidade e nem a quantidade do produto formado. O melhor indicador da qualidade do polissacarídeo produzido foi definido como sendo a quantidade de ácido pirúvico presente na goma. Foi estabelecido que uma goma de boa qualidade apresentava um conteúdo de ácido pirúvico de 4% ou maior. No entanto, os resultados obtidos por TORRESTIANA et alii (1990) apresentaram uma baixa

correlação entre o conteúdo de ácido pirúvico e a qualidade da goma. Para estes autores, o melhor índice para a seleção das melhores cepas produtoras de goma xantana de alta qualidade reológica foi a sensibilidade à penicilina G. Sublinhagens produtoras de goma xantana de baixa qualidade mostraram maior resistência aos antibióticos testados do que as linhagens mais eficientes.

Os requerimentos nutricionais de *X. campestris* NRRL B-1459 para produção ótima de goma xantana foram estudados em um meio quimicamente definido por SOUW e DEMAIN (1979). Das fontes de carbono testadas, um meio contendo 4% de sacarose ou glicose produziu o mais alto conteúdo de goma xantana. A melhor produção ocorreu quando 1% de sacarose, 0,5% de frutose ou 0,5% de xilose foram adicionados a um meio contendo 2% de glicose. Embora a adição de um excesso de sacarose não tenha causado efeito prejudicial ao crescimento celular nem à produção de xantana, a adição de um excesso de frutose ou de xilose inibiu totalmente tanto o crescimento celular como a produção da goma xantana. As maiores quantidades de goma xantana foram produzidas com as concentrações de 0,3% de piruvato; 0,6% de succinato e 0,4% de α -cetoglutarato, sendo que concentrações superiores às adequadas para cada ácido orgânico inibiram a produção de goma xantana.

TAIT et alii (1986) estudando os efeitos do tempo e da exaustão dos nutrientes em fermentação por batelada na produção, composição e viscosidade da goma xantana, mostraram que a produção de polissacarídeo por *X. campestris* S459, em culturas em batelada foi muito maior em meio com deficiência de amônia e menor em meio com deficiência de enxofre, magnésio, fósforo e ferro além de ser insignificante em meio deficiente em carbono. O conteúdo de acetyl e de piruvato na molécula de xantana foi influenciado pelo tempo de fermentação e pela exaustão dos nutrientes no meio de fermentação em culturas em batelada e pela taxa de diluição em culturas contínuas.

FUNAHASHI et alii (1987) descreveram o efeito de altas concentrações de glicose na produção de goma xantana pela bactéria *X. campestris* ATCC 13951. Ficou determinado que a faixa de concentração de glicose entre 30 e 40 g/kg de meio foi a melhor para a produção de goma xantana, sendo que após 96 h de fermentação, foram

obtidos 43 g de goma xantana por kg de meio. Concentrações de glicose acima de 50 g/kg de meio provocaram a inibição do crescimento celular e de produção de goma. Segundo estes autores, a quantidade de glicose no meio de fermentação é um dos mais importantes fatores envolvidos na produção de goma xantana. Quando a concentração inicial de glicose foi de 100 g/kg de meio, o crescimento celular foi inibido e uma longa fase lag foi observada. Somente após 36 horas, a concentração celular atingiu o máximo e a produção de goma foi iniciada. Utilizando a concentração ótima de glicose de 45 g/kg de meio, as células cresceram rapidamente, com um período de fase lag inexpressivo sendo que após 24 horas já houve produção de xantana.

Segundo PIELKEN et alii (1987), a adição de 1,3 mM de metionina no meio de fermentação reduziu em cerca de 40% a produção de goma xantana por *X. campestris*. Mesmo as células que foram apenas pré-cultivadas em meio contendo metionina sintetizaram 8,5 g de goma xantana por litro de meio após 7 dias de fermentação, enquanto que células pré-cultivadas na ausência deste aminoácido produziram 13 gramas de goma xantana por litro de meio. Comparativamente, a adição do aminoácido lisina aumentou a produção de xantana em 25%.

LEE et alii (1989) estudaram o efeito de metais na degeneração celular em fermentações contínuas durante um longo período de tempo. Neste caso, as fermentações foram efetuadas com um aumento da concentração de peptona de 3 para 10 g/l a uma concentração de glicose de 22,5 g/l. A maior taxa de C/N levou a uma concentração final maior de goma xantana. A produtividade foi maior sob limitação de nitrogênio do que sob limitação de carbono, porém a degeneração da cultura ocorreu precocemente. Não houve produção de xantana em meio deficiente em magnésio.

SHU e YANG (1990) observaram que a temperaturas iguais ou menores que 24°C, a formação de goma xantana teve um atraso significativo, ficando atrás do crescimento celular e assemelhando-se a um típico metabolismo secundário. Entretanto, a 27°C ou a temperaturas mais altas, a biossíntese da xantana seguiu o crescimento celular a partir do início da fase exponencial e continuou na fase estacionária. O crescimento celular a 35°C foi muito lento com altas taxas de morte celular. Os

resultados obtidos sugeriram que as temperaturas ótimas para o crescimento celular foram entre 24°C e 27°C, enquanto que para a formação de goma ficou entre 30°C e 33°C. O rendimento final de goma xantana aumentou de 54% a 22°C para cerca de 90% a 33°C. Fermentações com temperaturas superiores a 35°C ocasionaram perdas na viabilidade celular, alta viscosidade do caldo e depleção dos nutrientes essenciais.

GARCIA-OCHOA et alii (1992) avaliaram a influência da composição do meio na produção de goma xantana. Os nutrientes que exerceram efetiva influência sobre o crescimento de *X. campestris* foram: nitrogênio, fósforo e magnésio, enquanto que os nutrientes com influência na produção de xantana foram: nitrogênio, fósforo e enxofre. O nitrogênio e o fósforo em altas concentrações inibiram o crescimento celular e a produção de goma xantana. O enxofre foi utilizado em baixas concentrações também devido sua influência negativa na produção de xantana. Os melhores resultados tanto para o crescimento de *X. campestris* como para a produção de goma xantana, foram obtidos utilizando o meio contendo: 20g de sacarose; 2,1g de ácido cítrico; 1,144g de NH_4NO_3 ; 2,866g de KH_2PO_4 ; 0,507g de MgCl_2 ; 0,089g de Na_2SO_4 ; 0,006g de H_3BO_3 ; 0,006g de ZnO ; 0,0024g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,020g de CaCO_3 ; 0,13 ml de HCl e 1000ml de água destilada. O pH do meio foi ajustado para 7,0.

MOCHI e SCAMPARINI (1993) definiram um meio para a produção de goma xantana composto por: sacarose 2%; K_2HPO_4 0,5% e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% com pH ajustado para 7,0. Neste estudo utilizaram as linhagens *X. campestris* pv. *manihotis* DCA 450 e DCA 459.

PING et alii (1994) e KESSLER et alii (1993), desenvolveram sistemas de fermentação em batelada com alta taxa de transferência de oxigênio para o interior do meio, pois segundo VASHITZ et alii (1989), o acúmulo de goma xantana no meio de cultura aumentou a sua viscosidade, ocasionando um decréscimo na taxa de transferência de oxigênio e o aparecimento de zonas estagnadas a uma curta distância dos agitadores. Nestas condições, foram obtidos, em média, 25 gramas de goma xantana por litro de meio com características ideais de viscosidade, em meio contendo 5% de glicose.

Segundo VASHITZ e SHEINTUCH (1991), processos de fermentação contínuos podem ser uma alternativa econômica na produção de goma xantana pois, o tempo de fermentação pode ser reduzido e a utilização mais eficiente dos nutrientes pode ser obtida. Entretanto, problemas como a contaminação das culturas e a degeneração das linhagens produtivas que vão sendo substituídas por outras sublinhagens de baixa produção e de crescimento mais lento durante fermentações prolongadas constituem as principais desvantagens deste método de fermentação e explica o fato das indústrias ainda não o terem adotado.

Atualmente, a maior parte da produção comercial de goma xantana tem sido feita em fermentação por batelada. As condições e as performances destas fermentações têm sido amplamente estudadas na tentativa de diminuição dos custos do processo e para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na biossíntese deste exopolissacarídeo (De VUYST et alii, 1987; VASHITZ e SHEINTUCH, 1991; ROSEIRO et alii, 1993b).

De modo geral, os estudos cinéticos constituem uma parte vital nas investigações da produção de exopolissacarídeos microbianos. Os modelos matemáticos de tais cinéticas facilitam a análise dos dados e fornece uma estratégia para a resolução dos diversos problemas encontrados durante os processos de fermentações industriais para produção de goma xantana. Uma ampla revisão destes modelos pode ser encontrada nos trabalhos de THOMSON e OLLIS (1980); WEISS e OLLIS (1980); PINCHES e PALLENT (1986); PONS et alii (1989); SUH et alii (1991); ZAIDI et alii (1991); SÁNCHEZ et alii (1992); PETERS et alii (1992) e ROSEIRO et alii (1993b).

2.3.5 - Uso de Fontes Alternativas para a produção de Goma Xantana

Vários trabalhos foram desenvolvidos para aumentar o rendimento de goma xantana juntamente com o emprego de técnicas mais econômicas de produção, recuperação e purificação do polímero, abaixando o custo total do processo.

De acordo com GODET (1973) e LAWRENCE (1973) xarope de milho, melaço de cana-de-açúcar, sacarose e resíduos sólidos de destilarias são os substratos alternativos preferidos para a produção de goma xantana, sendo selecionados com relação ao seus custos. Um meio viável comercialmente para a produção de goma xantana pode ser constituído por sacarose 3%; resíduos de destilaria 0,5%; K_2HPO_4 0,5% e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1%.

No trabalho de KENNEDY et alii (1982) foram pesquisadas fontes de nitrogênio alternativas e mais baratas para a fermentação de *X. campestris*, tais como: água de maceração de milho, peptona, farelo de soja, resíduos de destilaria e extrato de levedura. Os resultados obtidos indicaram claramente que as fontes de nitrogênio que promoveram um maior rendimento foram a água de maceração de milho e a peptona. Os resíduos solúveis de destilaria muito usados em trabalhos anteriores como fonte de nitrogênio na fermentação de *X. campestris* (SILMAN e ROGOVIN, 1970, 1972; MORAINÉ e ROGOVIN, 1971a,b; 1973; GODET, 1973), produziram o mais baixo rendimento de goma xantana quando comparado com as outras fontes pesquisadas. A água de maceração de milho foi particularmente eficiente, produzindo 59% mais goma do que o uso de peptona. De acordo com estes autores, uma vantagem adicional do uso destas fontes de nitrogênio foi a correspondente diminuição do tempo de fermentação, de 92 horas para 69 horas, para obtenção do máximo rendimento. Entretanto, a reologia das soluções da goma xantana sofreu a influência da fonte de nitrogênio usada devido à alteração da estrutura básica do polissacarídeo e à presença de materiais contaminantes como aminoácidos e células bacterianas, precipitáveis pelo uso de álcool.

MOLINA et alii (1993) determinaram o efeito da água de maceração de milho que normalmente é empregada como fonte de carboidratos, nitrogênio e de micronutrientes, na produção de xantana por *X. campestris* NRRL B-1459. A adição de água de maceração de milho, juntamente com a sacarose como fonte de carbono estimulou o crescimento celular e a produção de xantana, quando comparado com as culturas não suplementadas. O acréscimo de 1,0 g/l de água de maceração de milho ao meio basal aumentou a produção de goma xantana para 22 g/l, encurtou o tempo de cultivo e promoveu uma utilização mais eficiente da fonte de carbono para a síntese do

polímero. O efeito estimulante no crescimento celular e na biossíntese do polissacarídeo foi relacionado com os micronutrientes fornecidos pela água de maceração de milho.

EL-SALAM et alii (1994) investigaram a produção de goma xantana pela linhagem de *X. campestris* E-NRC-3 utilizando melaço de cana de açúcar como fonte alternativa de carbono. O meio mais eficiente foi constituído por 2,0% de melaço; 0,3% de K_2HPO_4 ; 0,025% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,15% de $(NH_4)_2HPO_4$ e 0,1% de $CaCO_3$. Em meio contendo 2% de açúcares totais o rendimento obtido foi de 11,5 gramas de goma xantana por litro de meio. Em meio contendo 25% de açúcares totais foram produzidos 41,3 gramas de goma xantana por litro de meio.

DE VUYST e VERMEIRE (1994) formularam um meio industrialmente viável para a produção de goma xantana constituído por 4% de glicose, 4% de sacarose, 10% de melaço (valor correspondente ao uso de 5% de sacarose inicial) ou 2,8% de xarope de glicose como única fonte de carbono; 2% de água de maceração de milho como fonte combinada de nitrogênio e de fosfato e uma concentração adicional de 0,1% de citrato, dependendo da aplicação comercial a que se destina. A produção máxima de xantana foi de 22,8 g/l, utilizando 10% de melaço no meio. O uso de melaço como única fonte de carbono resultou em uma fase lag maior e em um lento aumento da viscosidade do meio de fermentação. A produção de goma xantana utilizando xarope de glicose (2,8%) como única fonte de carbono foi comparável à obtida com a utilização de glicose (2,0%).

Segundo BAIG et alii (1990), outra fonte viável economicamente que pode ser explorada para a produção de goma xantana é o soro de leite eliminado como subproduto pelas indústrias de laticíneos. O soro de leite é constituído por 4 a 5% de lactose; 0,8 a 1,0% de proteínas, sais minerais e ácidos orgânicos. No entanto, a bactéria *X. campestris* possui baixo nível de β -galactosidase e portanto, não é capaz de crescer e produzir significativa quantidade de goma em meio contendo lactose como única fonte de carbono. Na tentativa do aproveitamento do soro de leite na produção de goma xantana, linhagens mutantes de *X. campestris* capazes de metabolizar soro de leite e a lactose foram pesquisadas por SCHWARTZ e BODIE (1986); TAIT e SUTHERLAND (1989), FU e TSENG (1990), KONÍCEK e KONICKOVÁ-RADOCHOVÁ (1992),

KONÍCEK et alii (1993), PAPOUTSOPOULOU et alii (1994) e EKATERINIADOU et alii (1994).

2.3.6 - Recuperação da Goma Xantana

A recuperação dos exopolissacarídeos microbianos é uma etapa crítica durante o processo industrial, determinando em parte, o custo e as propriedades funcionais do produto final. Nesta etapa da produção de goma xantana, os principais objetivos são: a concentração do caldo de fermentação, a precipitação e purificação dos polímeros e a inativação das células e de enzimas indesejáveis (SMITH e PACE, 1982).

Segundo GODET (1973), o método mais usado para a precipitação da goma xantana consiste na adição de qualquer tipo de álcool ao caldo, podendo variar do metanol ao t-butanol. Posteriormente, a goma precipitada pode ser removida do caldo através de métodos convencionais como centrifugação e filtração. Em escala industrial, o solvente residual pode ser reciclado após sua reconcentração e purificação em coluna de destilação.

GONZALES et alii (1989) determinaram as melhores condições de recuperação da goma xantana em soluções aquosas usando a técnica de precipitação com etanol, na presença de sais específicos. Em escala comercial, a precipitação da goma é feita com isopropanol, principalmente porque isto está de acordo com as exigências da FDA para produção de aditivos alimentares. Em laboratório, entretanto, os solventes mais utilizados são o etanol e a acetona. O custo do etanol, a sua aceitação para uso alimentar e a possibilidade de sua reutilização através de destilação são as principais vantagens da utilização do etanol na precipitação da goma. As melhores condições para a recuperação da xantana foram a 15°C pela adição de etanol 65% contendo 1% de KCl.

De acordo com ALBITER et alii (1994), a recuperação da goma xantana é um passo crucial na sua produção devido principalmente aos custos operacionais. Os custos associados com a recuperação destes polímeros, incluindo a concentração, o isolamento

e a purificação, constituem uma parte significativa do custo total da produção, podendo representar até 50% dos custos totais. Somente dados em escala laboratorial podem ser encontrados na literatura disponível, mesmo assim, não há dados relacionados com a influência das condições do processo de recuperação sobre a produtividade e as propriedades funcionais do polímero.

2.4 - Manutenção, Propagação e Produção de Inóculos de *X. campestris*

Na microbiologia industrial, a manutenção de linhagens que produzem metabólitos de interesse comercial tem sido um desafio constante. O fato dos microrganismos altamente produtores serem, em geral, instáveis geneticamente, aumenta a responsabilidade sobre a escolha do método a ser usado na preservação destas culturas.

Atualmente, uma grande variedade de técnicas estão disponíveis para a preservação dos microrganismos e preparo de inóculos bacterianos, também chamados de culturas “starters” para a indústria de alimentos. Todos os métodos de preservação apresentam vantagens e desvantagens e a escolha do método mais indicado deve ser feita considerando os interesses específicos de cada instituição e a finalidade a que se destina. As principais características que devem ser consideradas na escolha do método de preservação são: a manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento, a garantia da não ocorrência de alterações genéticas, nem de perdas de características importantes das culturas, o controle eficiente da pureza, evitando qualquer fonte de contaminação, os custos com os materiais e com os equipamentos, o número das culturas a serem preservadas, o valor comercial dessas culturas, o fornecimento e o transporte das culturas às indústrias e a frequência do uso do microrganismo preservado. Infelizmente, nenhum método de preservação preenche todos estes critérios. Além disso, os microrganismos, mesmo dentro de uma espécie, diferem em sua tolerância aos vários métodos de preservação. É improvável que um único método forneça as condições ideais para todas as linhagens de uma coleção de cultura científica ou industrial (SNELL, 1991).

Segundo JEANES et alii (1976), as evidências da variabilidade genética de *X. campestris* levaram a novas investigações sobre a função dos procedimentos de manutenção na estabilidade das culturas. A preservação das características desejadas de uma linhagem não pode ser assegurada se a técnica usada for propagativa, ou seja, envolver repiques sucessivos ou transferência repetitiva da cultura a um dado intervalo de tempo. Um eficiente e seguro método de preservação deve garantir a manutenção das características das culturas durante todo o período de armazenamento. A instabilidade genética de *X. campestris* é um dos principais fatores que afetam a produção de goma xantana e a correta manipulação e preservação das linhagens torna-se fundamental neste processo.

Mutações espontâneas e aleatórias têm sido relacionadas com o cultivo de *X. campestris* e os procedimentos de manutenção que dependem de propagação semi-contínua aumentam a probabilidade de ocorrência de características fisiológicas alteradas, multiplicada por um fator diretamente proporcional ao número de gerações envolvidas. De modo geral, um inóculo derivado de seis repiques sucessivos de *X. campestris* pode abrigar cerca de 20 vezes o número de células mutantes encontradas numa cultura original (KIDBY et alii, 1977). Quando tais mutantes possuem uma vantagem competitiva, como foi o caso de células variantes do tipo S em *X. campestris*, sérias deteriorações da cultura podem ocorrer com grande rapidez e comprometer a qualidade da goma xantana produzida.

Em geral, os métodos conhecidos para a manutenção de *X. campestris* são classificados apenas como “adequados” ou “inadequados”, sendo que não há dados na literatura relatando seus desempenhos quantitativamente (SALCEDO et alii, 1992).

2.4.1 - Técnicas Alternativas para a Manutenção de *X. campestris*

De acordo com estes princípios, técnicas alternativas para a manutenção, propagação e produção de inóculos de *X. campestris* foram propostas.

Segundo KIDBY et alii (1977), a preservação de *X. campestris* NRRL B-1459 em tiras de papel foi uma técnica simples e adequada para a manutenção não propagativa das células por um período de tempo mais curto. Assim, tiras de papel para cromatografia Whatman com 5,0 x 3,0 cm foram tratadas com ácido etilenodiaminotetraacético dissódico 20 mM e lavadas em água deionizada. Posteriormente, foram secas a 100°C por 24 horas e esterilizadas a 121°C por 15 minutos e imersas numa cultura concentrada de *X. campestris*. Esta técnica de preservação foi aplicada a 36 linhagens de *Xanthomonas* resultando em 79% de culturas viáveis. A produção de polissacarídeo por bactérias preservadas através deste método foi igual à produção através de outras formas tradicionais de inoculação. As células preservadas em tiras de papel produziram um inóculo viável que não mostrou tendência a degeneração durante o curso de uma fermentação. No entanto, a desvantagem desta técnica consistiu no curto prazo de preservação, sendo que um novo lote de inóculos deveria ser preparado a cada três meses, a partir de uma cultura liofilizada. A manutenção não propagativa das culturas estoques em tiras de papel não substitui a preservação por longo prazo no estado liofilizado.

SUSLOW e SCHROTH (1981) desenvolveram um método de preservação por congelamento ou desidratação de bactérias em soluções de metilcelulose. As linhagens bacterianas foram transferidas para soluções de 1% de metilcelulose até formar uma suspensão contendo 10^8 UFC/ml sendo que 3 ml da suspensão foram congelados a -14°C e 15 ml foram desidratados em placas de petri formando um filme fino com 12,7% de umidade residual. A viabilidade de *X. campestris* foi testada em vários intervalos de tempo pela reidratação de 1 cm² do filme desidratado em água destilada e pelo descongelamento de 3 ml da suspensão congelada. Após 38 meses de armazenamento a -14°C, 10^3 a 10^5 UFC/ml foram recuperadas. Em filmes desidratados, houve uma sensível redução da concentração inicial. A preservação das linhagens de *Xanthomonas* em filmes de metilcelulose foi um método simples e eficiente.

SALCEDO et alii (1992) avaliaram a preservação de *X. campestris* em sementes esterilizadas de *Brassica oleracea* obtendo resultados satisfatórios quanto a viabilidade celular e a capacidade de produção de goma xantana. As sementes foram esterilizadas

por radiação gama e por lavagens em hipoclorito de sódio. As sementes tratadas foram colocadas em frascos contendo suspensões de *X. campestris* E-2 contendo 10^9 UFC/ml. Estas sementes, contendo aproximadamente 13.000 células cada, foram armazenadas durante 21 meses a 4°C. A viabilidade das bactérias após este período foi de 10% da inicial. Quando estas sementes foram usadas como pré-inóculo para a produção de goma, a concentração do polímero variou de acordo com o tempo de armazenamento da semente. A produção do polímero ficou em torno de 11 g/l. Como a semente é o habitat natural destas bactérias, a presença de alguns micronutrientes forneceram condições microambientais vantajosas para a preservação da viabilidade e da capacidade de produção da goma xantana de boa qualidade reológica. Este procedimento apresenta como principais vantagens a facilidade de inoculação, a ausência de etapas propagativas através de repiques e a manutenção da bactéria no seu habitat natural.

GIBSON e KHOURY (1986) propuseram um método de preservação através de ultra congelamento de *X. campestris*. Deste modo, uma densa suspensão da cultura bacteriana foi inoculada em frascos contendo 1 ml do meio composto por 3% de triptona; 0,5% de glicose; 2,0% de leite desnatado reconstituído e 4,0% de glicerol sendo imediatamente armazenadas a -80°C. As linhagens preservadas por este método mantiveram sua viabilidade por um período de 28 meses. O método de ultra congelamento foi mais adequado que o de subcultivo em intervalos de tempo, fornecendo um acesso mais fácil e rápido à cultura e reduzindo o tempo e o custo de produção e o de reativação das células. Entretanto, em termos econômicos, consiste em uma técnica cara, necessitando de equipamentos de refrigeração mais sofisticados.

Contrariando todos os demais trabalhos publicados sobre manutenção de culturas de *X. campestris* e sua conhecida instabilidade genética, GALINDO et alii (1994) descreveram a manutenção das características destas culturas quando preservadas em meio YM ágar inclinado, por um período de 11 meses, com repiques mensais. A bactéria *X. campestris* NRRL B-1459 não apresentou deterioração na sua capacidade de produção de goma xantana de alta qualidade. Testes de produtividade usando tais culturas forneceram 9,3 g/l de xantana, sem o aparecimento de mudanças morfológicas nas colônias. De acordo com estes autores, o genoma de *X. campestris* é estável e o

aparecimento de linhagens mutantes poderia estar associado com o crescimento de uma bactéria Gram negativa frequentemente associada com as culturas de *Xanthomonas*.

Dos métodos conhecidos até o momento, a liofilização tem sido considerado a técnica mais eficiente e segura, apresentando resultados excelentes para a preservação de *X. campestris*, por um longo período de tempo (JEANES et alii, 1976; KIDBY et alii, 1977).

2.4.2 - Inóculos Liofilizados

Hammer em 1911, foi o primeiro pesquisador a liofilizar bactérias demonstrando que as culturas liofilizadas sobreviviam por muito mais tempo do que culturas preservadas por métodos tradicionais de manutenção (HECKLY, 1961).

Atualmente, a liofilização é considerada por muitos microbiologistas como sendo o mais completo método para a preservação das culturas microbianas. Milhares de culturas e muitas destas de grande importância comercial têm sido mantidas com sucesso, através da liofilização, por longos períodos de tempo (HECKLY, 1978).

Sob o ponto de vista técnico, a liofilização pode ser definida como sendo a desidratação de um material aquoso previamente congelado, através da sublimação do gelo, envolvendo três fases distintas: 1- Fase de pré-congelamento, onde o material a ser liofilizado é congelado a temperaturas reduzidas; 2- Fase de secagem primária, onde a água presente no material congelado é sublimada, passando diretamente do seu estado sólido para o estado gasoso sob pressão reduzida e baixa temperatura e 3- Fase de secagem secundária, que é conduzida a alto vácuo com temperaturas acima de zero para eliminar qualquer vestígio de água não congelável que tenha permanecido fortemente adsorvida às partículas sólidas do produto (REY, 1964; ROWE, 1971).

No final do processo, o produto liofilizado pode ser estocado quase que indefinidamente, se corretamente produzido e empacotado, livre da presença de vapor

de água e de oxigênio atmosférico. Graças à sua alta permeabilidade, o material liofilizado pode ser facilmente reconstituído pela adição de um fluido reidratante, como por exemplo, a água e recuperar seu aspecto original, bem como suas propriedades iniciais (HACKENBERG, 1964; REY, 1964).

De acordo com GEHRKE et alii (1992) e CHAMPAGNE et alii (1991a), a liofilização é uma das técnicas mais eficientes para a produção de culturas “starters” usadas na indústria de alimento assim como para a preservação de microrganismos por um longo período de tempo, fornecendo um estoque de culturas convenientemente preservado, que pode ser acessado sempre que necessário. Há um crescente emprego desta técnica devido a maior estabilidade das bactérias preservadas e a manutenção das características biológicas comercialmente importantes. Além disso, a liofilização permite uma maior facilidade no transporte e na distribuição dos inóculos para as indústrias. Além destes benefícios, o uso de culturas “starters” liofilizadas possibilita a inoculação direta no caldo de fermentação, sem a necessidade de subcultivos contínuos ou de outros tratamentos caros, complexos ou demorados. Consegue-se portanto, uma diminuição do tempo de fermentação e um aumento na produtividade através do emprego de inóculos liofilizados de alta qualidade.

Segundo RUDGE (1991) e TAN et alii (1995), a maior vantagem da liofilização sobre muitos outros métodos de preservação é que o material pode ser mantido estável por um longo período de tempo, sem a necessidade de condições especiais de armazenamento. A distribuição de culturas liofilizadas também é simplificada, não necessitando de nenhum aparato específico. A estabilidade das culturas liofilizadas armazenadas à temperatura ambiente, sob proteção da luz é, em geral, muito boa, embora ocorra uma diminuição na viabilidade se a temperatura for muito alta.

2.4.2.1 - Danos Provocados pela Liofilização

Durante a liofilização, os microrganismos estão sujeitos a possíveis danos ou injúrias provocados pelos processos de congelamento, desidratação e exposição ao

oxigênio atmosférico. Estas condições são deletérias para uma grande fração da população inicial (HECKLY, 1961, 1978; BRENNAN et alii, 1986).

De acordo com LECHEVALLIER et alii (1985), a injúria celular tem sido definida como uma consequência fisiológica subletal da exposição de um microrganismo a um choque ambiental que pode causar a perda da capacidade desse microrganismo em crescer normalmente sob condições que são satisfatórias para as células não tratadas.

A injúria celular pode ser manifestada pela incapacidade dos microrganismos em formar colônias em meio mínimo e em meio contendo um agente seletivo que não tem ação inibitória aparente sobre as células originais que não foram expostas a condições ambientais adversas. Células danificadas podem exibir uma fase lag muito extensa resultando num lento crescimento associado a um baixo acúmulo de produtos finais. De modo geral, a injúria dos microrganismos representa uma condição temporária. Do contrário, a mudança permanente das suas funções poderia ser interpretada como sendo uma mutação e portanto, de caráter irreversível. As células são classificadas como injuriadas quando podem recuperar seu estado fisiológico normal, concomitantemente com o início do crescimento celular. A restauração da capacidade metabólica perdida pelo “stress” ambiental tem sido definida como processo de reparo das células. Uma vez reparadas, as células injuriadas não mais demonstram qualquer característica que permita diferenciá-las das células originais (BEUCHAT, 1978).

Uma suspensão de células bacterianas submetidas à liofilização pode conter células mortas apresentando injúria letal ou inativação irreversível; células danificadas subletalmente ou injuriadas além de células normais, não injuriadas. A perda da viabilidade na liofilização pode ser causada pelo choque térmico sofrido no congelamento, pela mudança na permeabilidade da parede celular, pela formação de cristais de gelo intracelulares, pela quebra das moléculas de DNA e de RNA, pelos danos nas membranas bacterianas, pela perda das proteínas superficiais e de materiais citoplasmáticos, pela modificação das macromoléculas no interior da célula, além de

outras mudanças moleculares subseqüentes, acarretando perdas irreversíveis ou não, nas atividades metabólicas dos microrganismos (BRENNAN et alii, 1986).

De acordo com GEHRKE et alii (1992) existem dois mecanismos que provocam a inativação celular durante a liofilização: o efeito do aumento da concentração de solutos e o efeito da formação de cristais de gelo. Quando as células são congeladas há uma perda de água pela formação de cristais de gelo. Isto aumenta a concentração de solutos nas células e alguns compostos solúveis podem se precipitar. O aparecimento de altas concentrações de sais causam danos na membrana celular e a desnaturação das proteínas. A formação de grandes cristais de gelo provocam a remoção de água intracelular e a ruptura mecânica das células. Desta maneira, a taxa de congelamento ótima deve ser lenta o suficiente para prevenir a formação de cristais de gelo intracelulares e rápida o bastante para evitar os danos provocados pela alta concentração de solutos.

Sob determinadas condições, as bactérias danificadas podem se recuperar e a variabilidade nas taxas de recuperação reflete as diferenças nos tipos de injúria bem como a complexidade dos mecanismos de reparo de cada microrganismo específico (BUSTA, 1978; HECKLY, 1978).

As condições de crescimento que influenciam a composição da célula ou seu estado fisiológico podem afetar sua susceptibilidade aos danos provocados pela liofilização. Estas mesmas condições podem também influenciar a capacidade de reparo dos microrganismos após a injúria, afetando o crescimento das células danificadas. Os fatores mais importantes envolvidos nos mecanismos de reparo das injúrias são: o pH, a temperatura, a atmosfera gasosa, a presença de nutrientes e sais específicos, a idade da cultura, a atividade de água, a força iônica, além de outras variáveis que podem agir na estrutura e na função das proteínas e por sua vez, influenciar de modo decisivo na injúria e no reparo dos microrganismos (BUSTA, 1978).

O reconhecimento da injúria subletal e a compreensão dos mecanismos de reparo das células danificadas são extremamente importantes para minimizar os efeitos deletérios causados durante a preservação das culturas microbianas (BUSTA, 1978).

Segundo PIERSON et alii (1978), a extensão da fase lag representa o tempo de reconstrução celular durante a qual os organismos injuriados reparam os danos sofridos durante a liofilização. A relação entre os danos sofridos pelo DNA e seu envolvimento na viabilidade dos microrganismos injuriados subletalmente, tem sido estudada e embora haja evidência de que o DNA seja realmente danificado e reparado após os microrganismos terem sido submetidos a processos térmicos, de congelamento e de desidratação, é ainda prematuro apresentar o DNA como a principal estrutura responsável pelo comportamento da injúria bacteriana. Danos físicos que danificam a molécula de DNA resultam geralmente em mutações estáveis ou em inativações irreversíveis.

2.4.2.2 - Fatores que Afetam a Sobrevivência das Células em Culturas Liofilizadas

Inúmeros fatores influenciam a sobrevivência das bactérias durante a liofilização e o armazenamento. Dentre os mais importantes, podem ser destacados: o tipo e a complexidade dos microrganismos; o estado fisiológico da cultura; a concentração celular do inóculo; os meios de crescimento; suspensão e de reidratação utilizados; a taxa de congelamento; a temperatura de secagem; a extensão do tempo de liofilização; a atmosfera e a temperatura de armazenamento além do método de reidratação (HECKLY, 1961; BUSTA, 1978; CHAMPAGNE et alii, 1991b).

Segundo CHOATE e ALEXANDER (1967) e SINHA et alii (1982), dos vários fatores envolvidos na sobrevivência dos microrganismos após a liofilização, um dos mais importantes é o processo de reidratação celular, durante o qual ocorrem muitas variações na concentração dos solutos. Estas mudanças não somente afetam o equilíbrio osmótico das células como também podem afetar sistemas biológicos inteiros presentes nos microrganismos. Um organismo que sobreviveu a vários processos adversos como o

congelamento, a secagem e o armazenamento, pode perder sua viabilidade por completo durante uma reidratação mal sucedida. A finalidade da reidratação é tentar substituir a água do interior da célula do mesmo modo como ela foi removida durante a liofilização.

Uma série de estudos dos mecanismos envolvidos na remoção da água celular dos microrganismos durante o processo de liofilização foi realizada por NEI (1966), com particular interesse na relação entre umidade residual e a sobrevivência da célula durante a liofilização. Estes experimentos mostraram que a taxa de sobrevivência foi pouco afetada pela sublimação da água congelada ao redor das células. Porém a taxa de sobrevivência foi grandemente afetada pela remoção da fração de água não congelável da célula, que permanece adsorvida após o processo de sublimação. Das condições para o armazenamento dos microrganismos liofilizados, as mais importantes foram a influência da atmosfera, a temperatura e a umidade residual. Em culturas armazenadas, quanto menor o conteúdo de umidade residual, menor a taxa de sobrevivência celular pois, a presença de uma insignificante quantidade de água residual pode propiciar o reinício das atividades metabólicas de células liofilizadas. O efeito deletério causado pelo oxigênio atmosférico na armazenagem provavelmente é causado pelo processo de oxidação dos componentes celulares.

BOZOGLU et alii (1987), determinaram a cinética de sobrevivência de culturas “starters” durante e após a liofilização. A porcentagem dos microrganismos sobreviventes aumentou com o aumento da concentração da biomassa celular levada para o liofilizador. Neste caso, o aumento das taxas de sobrevivência foi atribuído à proteção mútua dos microrganismos contra as severas condições do ambiente externo. A sobrevivência dos microrganismos liofilizados durante o período de armazenamento, foi aumentada pela presença de células mortas, que reduziram a área interfacial entre as células vivas e o meio externo. O emprego de agentes crioprotetores no meio de suspensão celular foi fundamental para aumentar as taxas de viabilidade celular após a liofilização e o armazenamento. A capacidade de proteção dos aditivos mais eficientes foi atribuída a sua capacidade de ligação com a água, seu poder de inibição da formação de cristais de gelo intra e extracelularmente e a sua contribuição na estabilidade da estrutura do microambiente ao redor dos elementos estruturais da parede celular.

De acordo com TEIXEIRA et alii (1995), a observação das características específicas de cada bactéria pode ajudar na eficiência da liofilização durante a produção de culturas “starters”. É interessante verificar a resistência da cultura ao choque térmico, a fase de crescimento em que as bactérias são menos sensíveis aos processos adversos sofridos durante o congelamento e a secagem, controlar o processo de reidratação e evitar o máximo possível os danos na membrana citoplasmática.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - Equipamentos

Liofilizador Labconco, modelo Lyph-Lock 18

Incubador - Agitador com ambiente controlado New Brunswick Scientific Co, modelo G25 e G27

Espectrofotômetro marca Beckman, modelo DU-70

Estufa de secagem e esterilização marca Fanem, modelo 315 SE

Estufa de incubação de cultura marca Fanem, modelo 002 CB

Autoclave vertical marca Phoenix, modelo AV-75

Câmara de fluxo laminar marca Tecnal, modelo 115

Centrífuga refrigerada marca Shimadzu, modelo CR21

Potenciômetro marca Digimed, modelo DMPH-2

Microscópio óptico binocular Olympus-CBA

Balança semi-analítica marca Micronal, modelo B-600

Balança analítica A & D, modelo FR-200

3.1.2 - Material de Consumo

Os reagentes utilizados neste experimento foram das marcas Merck, Sigma, Synth e Ecibra. Os componentes dos meios de cultura foram todos da marca Difco.

3.1.3 - Meios de Cultura

Foram utilizados os meios YM padrão (Yeast-Malt) ágar ou líquido descrito por HAYNES (1955) e o meio NYGB ágar descrito por MANIATIS et alii (1982).

O meio YM padrão é constituído por (p/v): extrato de malte 0,3%; extrato de levedura 0,3%; peptona bacteriológica 0,5%; glicose 1,0% e ágar 2,0%. A glicose foi substituída por sacarose na mesma concentração devido ao custo e à disponibilidade deste carboidrato em relação à glicose, no Brasil.

O meio NYGB ágar é constituído por: peptona 0,5% (p/v); extrato de levedura 0,3% (p/v); glicerol 2,0% (v/v) e ágar 1,5% (p/v).

3.1.4 - Microrganismo

A bactéria utilizada neste experimento foi a linhagem nº 280 de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, adquirida na Coleção de Cultura da seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico de Campinas - SP.

3.2 - MÉTODOS

3.2.1 - Preservação e Manutenção do Microrganismo

Para evitar possíveis perdas na viabilidade celular e ter maior segurança na manutenção das características da bactéria, a linhagem foi preservada através de liofilização e armazenada a baixas temperaturas. Quando necessário, as culturas foram reativadas e transferidas para tubos de ensaio contendo meio YM ágar inclinado. Após o crescimento, as linhagens foram armazenadas a 4°C.

Para efeito de comparação e determinação da influência de diferentes métodos de preservação na taxa de sobrevivência celular de *X. campestris* pv. *manihotis*, a bactéria foi armazenada a 4°C em meio NYGB ágar inclinado e em meio YM ágar inclinado, ambos contendo óleo mineral (Nujol). A cultura também foi preservada em meio YM líquido contendo glicerol 15% (v/v) (MANIATIS et alii, 1982) e como suspensões bacterianas em solução de sacarose 10% (p/v), em solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v) e em água destilada, as quais foram mantidas congeladas a -20°C. Para isso, as células foram cultivadas em meio YM padrão líquido e após 40 horas de incubação, foram centrifugadas a 16.000 x g por 30 minutos a 4°C e suspensas em solução de sacarose, de leite desnatado reconstituído e em água destilada, além do próprio meio YM padrão.

3.2.2 - Preparo do Inóculo Inicial

Para a determinação da cinética de crescimento da bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 foi utilizado um inóculo inicial obtido através da inoculação de um frasco Erlenmeyer com 100 ml de meio YM padrão líquido com uma alçada padrão (alça de platina com 3,0 mm de diâmetro) da cultura bacteriana, crescida em tubo de ensaio contendo meio YM ágar inclinado (JEANES et alii, 1976). O meio inoculado foi incubado a 30°C por 48 horas a 200 rpm.

Testes de pureza para monitoramento da qualidade dos inóculos foram realizados através da coloração de Gram e crescimento em placa com meio YM ágar para observação das características das colônias de *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280.

3.2.3 - Determinação da Curva de Crescimento

Para determinação da curva de crescimento da bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280, foram utilizados Erlenmeyers de 250 ml contendo um volume de 100 ml de meio YM padrão inoculados com 5% (v/v) do inóculo inicial produzido de acordo com o item 3.2.2.

Uma vez inoculados todos os frascos de forma homogênea, a cada intervalo de tempo, foram coletadas amostras para avaliação dos seguintes parâmetros de crescimento: pH final, crescimento celular, teor de açúcares redutores totais e quantidade de goma xantana.

3.2.3.1 - Determinação do pH Final do Meio de Crescimento

Imediatamente após a retirada de cada amostra foi feita a leitura do pH, em potenciômetro.

3.2.3.2 - Determinação do Crescimento Celular

Depois de realizada a leitura do pH, a amostra foi centrifugada a 16000 x g por 30 minutos a 4°C. Para determinação do crescimento celular a cada intervalo de tempo, a massa celular (“pellet”) obtida na centrifugação foi lavada três vezes consecutivas utilizando água destilada. Após a terceira lavagem, a massa celular foi levada para

estufa a 55°C até peso constante, para avaliação da massa celular seca. Os resultados foram expressos em gramas de células por litro de meio.

3.2.3.3 - Determinação do Teor de Açúcares Redutores Totais

Para análise do teor de açúcares redutores totais foi empregada a técnica do DNS (MILLER, 1959). Como a sacarose usada no meio de cultura não é um açúcar redutor foi feita a hidrólise ácida das amostras. Para a conversão do substrato em açúcares redutores, 2 ml de HCl 2N foram adicionados a 2 ml do sobrenadante centrifugado e levados para um banho em ebulição por 5 minutos. Após resfriamento em banho de gelo, 2 ml de NaOH 2N foram adicionados para neutralizar a amostra. Desta amostra hidrolisada, foi retirado 1 ml para análise de DNS.

O valor obtido da absorbância de cada amostra foi convertido em açúcares redutores totais utilizando uma curva padrão de açúcares redutores em função dos valores de absorbância, previamente estabelecida. A leitura da absorbância foi feita a 540 nm em espectrofotômetro Beckman DU 70. O branco foi feito substituindo a amostra hidrolisada por 1 ml de água destilada.

3.2.3.4 - Determinação da Quantidade de Goma Xantana

Para a determinação da quantidade de goma produzida durante a fermentação, ao sobrenadante obtido com a centrifugação das amostras de acordo com o item 3.2.3.2 foi adicionado etanol comercial, na proporção de 1 parte de sobrenadante para 3 partes de etanol. A goma precipitada foi filtrada e seca em estufa a 55°C, até peso constante. Os valores foram expressos em gramas de polissacarídeo por litro de meio. O rendimento da produção da goma xantana foi calculado em relação a quantidade de sacarose presente no meio e os valores expressos em porcentagem, segundo JEANES et alii (1976).

3.2.4 - Produção do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis*

Após a determinação da curva de crescimento da linhagem nº 280 e conhecidas as suas exigências nutricionais, foi realizada a produção dos inóculos liofilizados.

3.2.4.1 - Produção do Inóculo Inicial

A produção do inóculo foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml de meio YM padrão líquido inoculado com uma alçada padrão da cultura de *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 crescida em tubo de ensaio contendo meio YM ágar inclinado, incubada a 30°C por 48 horas. Após a inoculação, o meio foi incubado a 30°C por 40 horas a 200 rpm.

3.2.4.2 - Determinação da Influência do Meio de Produção Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis*

Para a determinação da influência do meio de produção ou de crescimento celular na viabilidade dos inóculos liofilizados foi utilizado o meio YM líquido com algumas variações em sua composição original e a inoculação foi feita como descrita no item 3.2.4.1. A concentração de inóculo inicial inoculada em cada meio de cultura foi de 5% (v/v).

Foram testados os sais: NH_4Cl , nas concentrações (p/v) de 0,1%, 0,5% e 1,0%; NH_4NO_3 , nas concentrações (p/v) de 0,1%, 0,5% e 1,0%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% e 0,1% (p/v) e K_2HPO_4 nas concentrações (p/v) de 0,5% e 1,0%. Foram testados também o meio YM sem sacarose, com sacarose 6% (p/v) e YM padrão e com lecitina de soja 1,0% (p/v). Em todos os casos, a incubação ocorreu a 30°C por 40 horas a 200 rpm. Para testar a influência do meio de produção celular, o meio de suspensão e de reidratação dos inóculos foram mantidos constantes. As células produzidas nestes meios foram centrifugadas e ressuspensas em meio YM padrão e liofilizadas conforme item

3.2.4.5 e 3.2.4.6. O meio de reidratação usado neste estudo foi a solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v). A reidratação foi feita à temperatura ambiente por 10 minutos. A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.4.3 - Determinação da Influência do Tempo de Crescimento Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado

As células inoculadas e incubadas em meio YM padrão conforme item 3.2.4.1 foram coletadas nos tempos: 12, 24, 40, 48 e 72 horas de crescimento. As células foram centrifugadas, suspensas em meio YM padrão e liofilizadas conforme item 3.2.4.5 e 3.2.4.6. Após a liofilização, os inóculos foram reidratados com solução de leite desnatado reconstituído 10% à temperatura ambiente por 10 minutos. A porcentagem de células sobreviventes foi calculada conforme item 3.2.8.

3.2.4.4 - Determinação da Influência do Meio de Suspensão Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado

Para testar a influência dos meios de suspensão das células na viabilidade do inóculo liofilizado, foram mantidos constantes os meios de produção celular (YM padrão) e o meio de reidratação (solução de leite desnatado reconstituído 10%). Após 40 horas de incubação, o meio de cultura foi centrifugado a 16.000 x g por 30 minutos a 4°C. A massa celular obtida foi ressuspensa em diferentes meios de suspensão, para avaliação da influência dos fluidos de suspensão celular na viabilidade das culturas liofilizadas. Foram testados os seguintes meios de suspensão: água destilada; solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v); peptona 10% (p/v); sacarose 1%, 10% e 40% (p/v); dextrose 10% (p/v); solução salina de NaCl 0,9% (p/v); glicerol 10% (v/v); solução de xantana 0,001%, 0,01% e 0,1% (p/v), solução de NH₄NO₃ 1% (p/v), NH₄Cl 1% (p/v), MgSO₄.7H₂O 0,01% (p/v); YM padrão e YM contendo 0,1% (p/v) de lecitina de soja.

3.2.4.5 - Processo de Suspensão das Células

A fim de se obter um número satisfatório de células para a produção de inóculos viáveis, estas devem ser coletadas a partir do meio de produção e concentradas em meio de suspensão adequado para serem liofilizadas e manterem uma alta taxa de sobrevivência.

Desta maneira, após atingirem a fase estacionária de crescimento, as células foram centrifugadas nas condições descritas no item 3.2.4.4. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” (células) foi ressuspendido em 50 ml de cada um dos fluidos de suspensão definidos no item 3.2.4.4. Após a adição do meio de suspensão, as células foram homogeneizadas e 5 ml dessa suspensão foram transferidos para frascos próprios para liofilização com capacidade de 60 ml, de acordo com BOZOGLU et alii (1987). Os frascos contendo a suspensão celular foram imediatamente congelados em freezer a -20°C.

3.2.4.6 - Liofilização dos Inóculos

As suspensões celulares congeladas foram liofilizadas em Liofilizador Labconco Lymph-Lock com capacidade para 18 litros por 20 horas, com temperatura inicial de -30°C e temperatura final de +20°C.

Após a liofilização, um lote de inóculos liofilizados foi armazenado em freezer, outro lote foi armazenado em dessecador, à temperatura ambiente (27°C) e um último lote foi imediatamente reidratado para determinação da contagem celular, conforme item 3.2.8.

3.2.5 - Estudo da Influência do Teor de Umidade Residual na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado

O meio de suspensão celular é um dos fatores mais importantes na determinação do teor de umidade residual do inóculo liofilizado.

Dessa maneira, inóculos liofilizados constituídos por células produzidas em meio YM padrão e suspensas em água destilada, sacarose 10% (p/v), leite desnatado reconstituído 10% (p/v), dextrose 10% (p/v), solução de NH_4NO_3 1,0% (p/v) e NH_4Cl 1,0% (p/v) e em meio YM padrão foram escolhidos para esta análise. Estes inóculos foram armazenados em freezer e em dessecador à temperatura ambiente. Imediatamente após a liofilização e após 12 meses de armazenagem, o teor de umidade residual foi determinado de acordo com NEI et alii (1966). O conteúdo de umidade residual foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\frac{A - B}{B} \times 100$$

onde, A é o peso do espécime após a liofilização e

B é o peso da matéria seca obtida após 3 horas a 60°C.

3.2.6 - Processo de Reidratação dos Inóculos Liofilizados

Para a determinação da influência do fluido de reidratação na viabilidade celular, foram escolhidas as culturas liofilizadas constituídas por células produzidas e suspensas em meio YM padrão que mostraram as maiores taxas de sobrevivência, de acordo com estudos anteriores. Os inóculos foram reidratados com os seguintes meios: água destilada; solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v); meio YM padrão; soluções de sacarose nas concentrações 1%, 5%, 10%, 20%, 40% e 60% (p/v); lactose 10% (p/v); dextrose 10% (p/v); solução salina de NaCl 0,9% (p/v) e soluções de goma xantana nas concentrações 0,001% e 0,01% (p/v).

A reidratação dos inóculos foi realizada à temperatura ambiente, com a adição de 5 ml do meio de reidratação em cada frasco contendo a cultura liofilizada de *X. campestris* pv. *manihotis*, restaurando o seu volume original. Após a reidratação foram feitas contagens do número de células viáveis pelo método descrito no item 3.2.8.

3.2.6.1 - Determinação da Influência do Tempo de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado

Para determinação da influência do tempo de reidratação na viabilidade celular foi utilizado o inóculo produzido, suspenso e liofilizado em meio YM padrão e reidratado com 5 ml de solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v) à temperatura ambiente conforme item 3.2.6. O inóculo assim produzido e reidratado revelou ser o mais adequado em termos de sobrevivência celular, após a liofilização. O inóculo ficou em contato com a solução de reidratação durante 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 180 minutos. A cada intervalo de tempo considerado foram feitas as contagens do número dos microrganismos presentes por ml e calculada a viabilidade celular correspondente conforme item 3.2.8.

3.2.6.2 - Determinação da Influência da Concentração de Sacarose Presente no Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado

Inóculos liofilizados constituídos por células produzidas em meio YM padrão e suspensas em solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v); sacarose 10%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, em meio YM padrão e em água destilada, foram reidratados utilizando soluções de sacarose nas concentrações (p/v): 1, 5, 10, 20, 40 e 60%, à temperatura ambiente por 10 minutos. O cálculo da porcentagem de células viáveis foi feito de acordo com item 3.2.8.

3.2.6.3 - Determinação do pH Ideal do Meio de Reidratação

A influência do pH do meio de reidratação foi avaliada utilizando inóculo produzido, suspenso e liofilizado em meio YM padrão e reidratado com meio YM líquido nos seguintes valores de pH: 3,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0, 8,5 e 10,0. A reidratação ocorreu à temperatura ambiente, por um período de 10 minutos, de acordo com item 3.2.6. A viabilidade celular foi calculada de acordo com o item 3.2.8.

3.2.7 - Determinação da Influência do Tempo e da Temperatura de Armazenamento na Viabilidade do Inóculo Liofilizado

As culturas liofilizadas produzidas em meio YM padrão e suspensas nos seguintes meios de suspensão: YM padrão, água destilada, sacarose 10% (p/v), dextrose 10% (p/v), leite desnatado reconstituído 10% (p/v), solução salina de NaCl 0,9% (p/v), solução de NH_4NO_3 1,0% (p/v) e de NH_4Cl 1,0% (p/v) foram divididas em dois lotes. Um lote foi armazenado em dessecador à temperatura ambiente (27°C) e o outro lote foi armazenado em freezer (-20°C), durante um período de 12 meses.

Para determinar a influência do tempo e da temperatura de armazenamento na viabilidade celular, amostras dos dois lotes foram reidratadas com 5 ml de solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v). O tempo de reidratação foi de 10 minutos, à temperatura ambiente conforme item 3.2.6. A determinação do número de células viáveis foi feita de acordo com o item 3.2.8.

3.2.8 - Contagem de Microrganismos e Cálculo da Taxa de Sobrevivência Celular

Foram realizadas contagens dos microrganismos presentes nas suspensões celulares antes do processo de liofilização e em todas as ocasiões em que os inóculos foram reidratados para a realização de um ensaio.

Para a contagem dos microrganismos, as amostras foram submetidas a diluições decimais em série, transferindo-se 1 ml da amostra para tubos de ensaio contendo 9 ml de água destilada estéril, sucessivamente, até as diluições desejadas. As diluições de 10^{-4} a 10^{-7} foram plaqueadas em superfície. Todos os testes de contagem foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em Unidade Formadora de Colônia por ml (UFC/ml).

A sobrevivência foi calculada com relação à concentração inicial de células presentes no inóculo e os resultados expressos em porcentagem, de acordo com CHOATE e ALEXANDER (1967).

3.2.9 - Testes de Fermentação para a Produção de Goma Xantana Empregando os Inóculos Liofilizados

3.2.9.1 - Determinação da Curva de Crescimento de *X. campestris* pv. *manihotis* Liofilizada

Depois de definidas as melhores condições de liofilização e de reidratação do inóculo, nova curva de crescimento foi realizada empregando a bactéria liofilizada.

O inóculo utilizado para a determinação dos parâmetros de crescimento da cultura liofilizada era composto por células produzidas e suspensas em meio YM padrão e reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v). A cultura liofilizada reidratada foi inoculada (1,0% v/v) diretamente no meio YM padrão e incubada a 30°C e a 200 rpm. A coleta das amostras e a determinação dos parâmetros de crescimento celular e produção de goma foi feita de acordo com item 3.2.3.

3.2.9.2 - Avaliação do Desempenho do Inóculo Liofilizado em Comparação com Técnicas Convencionais de Inoculação do Meio de Fermentação

Neste experimento foram comparadas as seguintes formas de inoculação: a técnica de inoculação por alçada a partir de uma cultura crescida em meio YM ágar inclinado, a técnica usando inóculo 5% (v/v) a partir de culturas líquidas preparadas conforme item 3.2.2 e o emprego do inóculo liofilizado. O número inicial de microrganismos inoculado foi, aproximadamente, o mesmo em todos os meios de fermentação, calculados conforme o item 3.2.8. Todos os inóculos possuíam em média 10^9 UFC/ml.

Desta forma, frascos de Erlenmeyer contendo 100 ml de meio YM líquido foram inoculados com 1% de inóculo liofilizado reidratado formado por células produzidas e suspensas em meio YM padrão e reidratadas com solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v), conforme item 3.2.6. Outros 100 ml de meio YM foram inoculados com 5% (v/v) do inóculo preparado como no item 3.2.2 e finalmente outro frasco Erlenmeyer contendo 100 ml de meio YM foi inoculado com duas alçadas da cultura cultivada em tubo com meio YM ágar inclinado.

Após 24 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm, aos Erlenmeyers contendo as culturas foram adicionados 200 ml de meio de fermentação descrito por JEANES et alii (1976) constituído por (p/v): sacarose 2,0%; K_2HPO_4 0,5% e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%, com pH ajustado para 7,0 com H_2SO_4 2N. A fermentação prosseguiu por um período de 120 horas a 30°C e a 200 rpm.

Após este período, o caldo de fermentação foi centrifugado a 16.000 x g por 45 minutos a 4°C e os parâmetros de crescimento celular e de produção de goma xantana foram determinadas de acordo com o item 3.2.3.

3.2.9.3 - Determinação da Concentração Ideal de Inóculo Liofilizado para Inoculação do Meio de Fermentação.

Para determinar a influência da concentração do inóculo liofilizado inoculado no meio de fermentação, foi empregado o inóculo liofilizado constituído por células produzidas e liofilizadas em meio YM padrão e reidratadas com solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v) conforme item 3.2.6. Após a contagem do número de microrganismos viáveis neste inóculo, de acordo com o item 3.2.8, Erlenmeyers de 500 ml contendo 100 ml de meio de fermentação foram inoculados com 1%, 2%, 3%, 4% e 5% (v/v) do inóculo reidratado por 10 minutos à temperatura ambiente. Os testes foram feitos em duplicatas. Foram determinados os valores de pH, massa celular seca, quantidade de goma produzida e a concentração de açúcares redutores totais não consumida, conforme item 3.2.3.

3.2.9.4 - Produção de Goma Xantana Utilizando Diferentes Inóculos Liofilizados

Os inóculos liofilizados utilizados neste experimento foram escolhidos de acordo com as diferentes taxas de sobrevivência celular apresentadas. Foram utilizados os inóculos constituídos por células cultivadas em meio YM padrão, em meio YM contendo (p/v): NH_4NO_3 0,1% e 1,0%; NH_4Cl 0,5% e 1,0%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% e suspensos em meio YM padrão e também inóculos formados por células cultivadas em meio YM e suspensas em água destilada, sacarose 10% (p/v) e em solução de leite desnatado reconstituído 10% (p/v). Os inóculos foram reidratados com os meios relacionados no item 3.2.6 e inoculados em meio de fermentação para avaliação de seus desempenhos na produção de goma xantana.

Em cada frasco de Erlenmeyer contendo 100 ml de meio foi adicionado 1% (v/v) do inóculo reidratado, sendo então, incubado por 24 horas a 30°C e a 200 rpm. Após este período, foram adicionados 200 ml do meio de fermentação descrito no item 3.2.9.2. O meio de fermentação foi o mesmo para todos os experimentos realizados.

A fermentação ocorreu em 120 horas a 30°C a 200 rpm. Foram analisados o pH final do meio de fermentação, a quantidade de massa celular seca, a quantidade de goma produzida e o teor de açúcares redutores totais, conforme metodologia descrita no item 3.2.3.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Dados Morfológicos de *X. campestris* pv. *manihotis* Linhagem Nº 280

Quando cultivada em meio YM ágar, a linhagem nº 280 de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* apresenta colônias convexas, circulares, com bordos inteiros, sem reentrâncias, possuindo superfície lisa, com aspecto mucóide e brilhante. Esta linhagem não apresenta pigmentação, característica esta que a diferencia da maioria das espécies conhecidas pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. As colônias são visíveis após 48 horas de incubação, como pode ser visto nas Figuras 1 e 2. No decorrer deste trabalho não foi observado o aparecimento de sublinhagens mutantes com formação de colônias de menor diâmetro, nem uma variação das características das colônias formadas.

4.2 - Crescimento da Bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* Linhagem Nº 280

A curva de crescimento da bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 cultivada em meio YM padrão a 30°C pode ser observada na Figura 3. A bactéria exibiu uma fase lag muito curta passando rapidamente para a fase de crescimento exponencial, cujo ápice ocorreu com 24 horas de cultivo. A fase estacionária ocorreu durante o período de 24 a 48 horas de incubação. Após este período pode ser observado a fase de declínio ou morte celular. Enquanto o crescimento celular mostrou uma distinta fase exponencial seguida por uma fase estacionária, a biossíntese de goma xantana ocorreu durante todo o processo de crescimento celular intensificando-se após 12 horas de cultivo. Após 48 horas de cultivo, o meio tornou-se mais viscoso devido a maior concentração de goma xantana. O pH do meio de cultura variou de 6,82 a 7,67 durante o tempo da análise. Houve um consumo de aproximadamente 5,0 gramas de sacarose em 56 horas de crescimento.

De acordo com a literatura, no cultivo de *X. campestris* podem ser distinguidas duas fases distintas: a trofofase, na qual há um rápido crescimento celular e pequena formação de goma xantana e a idiofase, na qual não ocorre crescimento celular, mas grandes quantidades de goma são produzidas (SHU e YANG,1990).

4.2.1 - Influência da Concentração de Sacarose no Crescimento Celular

Uma vez que a quantidade inicial de células obtida é fundamental para a viabilidade do inóculo após a liofilização, diferentes concentrações de sacarose no meio de crescimento foram testadas para a determinação de sua influência na produção de biomassa de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280. De acordo com a Figura 4, houve uma pequena variação na concentração de células e de goma xantana produzida nas diferentes concentrações de sacarose testadas. Entretanto, a quantidade de açúcares redutores totais não consumidos presentes após 40 horas de incubação foi diretamente proporcional à concentração de sacarose adicionada inicialmente. Utilizando altas taxas de sacarose, grande quantidade de carboidrato não foi metabolizada pela célula. Com a adição de 1% de sacarose ao meio de crescimento, houve a produção de 1,07 g/l de células e 2,99 g/l de goma xantana sendo que a quantidade de açúcares redutores não consumida foi de 4,49 g/l. Com a utilização de 6% de sacarose, apontada em trabalhos anteriores como a concentração ideal para *X. campestris* pv *manihotis* nº 280, houve a produção de 1,96 g/l de célula e 3,19 g/l de goma xantana enquanto que a quantidade de açúcares redutores totais foi de aproximadamente 15 g/l. Com a adição de 10% de sacarose ao meio de crescimento houve a produção de 1,42 g/l de células e 3,99 g/l de goma xantana, sendo que a quantidade de açúcares redutores totais foi de 23 g/l. Dessa maneira, após 40 horas, uma grande quantidade de sacarose não foi metabolizada nem para o crescimento celular nem para a produção de polissacarídeo. A produção de células e de goma xantana foi praticamente constante nos meios contendo de 1 a 4% de sacarose. Como o objetivo desta etapa do trabalho foi apenas a produção de células até que estas atingissem a fase estacionária e considerando-se os custos do processo, a concentração de sacarose escolhida foi de 1%.

4.3 - Produção do Inóculo Liofilizado

4.3.1 - Fatores que Afetam a Sobrevivência dos Microrganismos na Liofilização

4.3.1.1 - Determinação da Influência das Condições de Crescimento das Bactérias que Serão Liofilizadas na Viabilidade do Inóculo Liofilizado

Um dos mais importantes fatores na determinação da taxa de sobrevivência de culturas liofilizadas são as condições de cultivo dos microrganismos (HECKLY, 1961; KUSAY, 1972).

As condições de crescimento que influenciam a composição da célula e seu estado fisiológico podem afetar sua susceptibilidade aos danos causados pela exposição a um processo estressante como a liofilização. O crescimento celular em condições adequadas não só aumenta a produção de biomassa como também aumenta a sobrevivência das células após a liofilização (CHAMPAGNE et alii, 1991b).

Fatores como os nutrientes presentes no meio de crescimento, o pH, a temperatura, a fase de crescimento das culturas, entre outros que influenciam o crescimento das células também influenciam a taxa de sobrevivência das células liofilizadas (BUSTA, 1978).

Com base nestas observações, foram escolhidas as melhores condições de crescimento para *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 determinadas através de testes prévios e de trabalhos anteriores realizados no laboratório (MOCHI e SCAMPARINI, 1993). Assim, as células foram cultivadas em YM padrão a 30°C, por 40 horas a 200 rpm.

A idade da cultura é outro fator determinante na taxa de sobrevivência da célula submetida a qualquer tipo de tratamento deletério, seja ele térmico ou químico.

As diferenças encontradas nas respostas à liofilização para bactérias Gram negativas e Gram positivas também podem ser atribuídas a fatores estruturais das paredes celulares de ambas as bactérias. As bactérias Gram negativas possuem uma única camada de mureína na parede celular enquanto que as Gram positivas apresentam múltiplas camadas desta substância. Como a espessura desta camada determina as características de permeabilidade da parede celular, as bactérias Gram positivas são mais resistentes às alterações que ocorrem durante a liofilização do que as Gram negativas (GEHRKE et alii, 1992).

As bactérias Gram negativas, de modo geral, apresentam uma alteração na resistência térmica quando as culturas passam de uma fase de crescimento para outra. Desta forma, as células que estão na fase exponencial de crescimento são geralmente mais sensíveis às injúrias e à inativação quando expostas a temperaturas reduzidas do que as células que estão na fase estacionária (BEUCHAT, 1978).

De acordo com a Figura 5, as células de *X. campestris* pv. *manihotis* recuperadas após 40 h de incubação em meio YM padrão, quando liofilizadas, estando no meio da fase estacionária, apresentaram uma taxa de sobrevivência maior do que as células recuperadas após 12, 24, 48 e 72 horas de crescimento. Inóculos liofilizados contendo células recuperadas após 40 horas de incubação apresentaram 80,33% de sobrevivência enquanto que as células recuperadas após 12 horas de incubação apresentaram somente 12% de sobrevivência celular. De fato, as células que estão na fase exponencial de crescimento apresentam menor sobrevivência do que as células que estão na fase estacionária ou na fase de declínio. Com base nestes resultados, a recuperação das células foi realizada na fase estacionária de crescimento (com 40 horas de incubação) para produção de todos os inóculos.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com HECKLY (1961) que mostrou uma correlação direta entre a idade da cultura de *E. coli* e a taxa de células sobreviventes após a liofilização. A sobrevivência aumentou de 0,02% para uma cultura de 1,25 horas para 12,9% para uma cultura com 18 horas de incubação. Entretanto, KIDBY et alii (1977) observou que inóculos de *X. campestris* produzidos em tiras de

papel contendo células na fase log de crescimento tiveram maior viabilidade que os inóculos constituídos por células na fase estacionária.

Segundo TEIXEIRA et alii (1995) o aumento da resistência das células que estão na fase estacionária de crescimento pode ser explicado pelo reduzido número de moléculas de DNA ainda envolvidas no processo de replicação. Para GEHRKE et alii (1992) este efeito pode ser atribuído a maior espessura da parede celular em células que estão na fase estacionária de crescimento e que portanto, não mais passam pelo processo de divisão celular.

4.3.1.2 - Influência da Composição do Meio de Produção Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado

Os compostos específicos presentes no meio de crescimento celular influenciam a taxa de sobrevivência das células após a liofilização. A escolha do meio de produção deve ser dirigida, sobretudo, pela eficiência deste meio no crescimento das células, pela facilidade de obtenção e pelo seu custo. Desta maneira, a produção das culturas num meio adequado também contribui para a diminuição das perdas de viabilidade celular que ocorrem durante a liofilização (CHAMPAGNE et alii, 1991b).

Segundo a literatura, o meio de cultura mais apropriado para o cultivo de *X. campestris* é o meio YM (HAYNES, 1955). Portanto, este meio foi adotado como meio padrão em todos os processos de produção celular, apresentando apenas algumas variações em seus componentes e em suas concentrações.

Como pode ser visto na Tabela 1, as células cultivadas em meio YM sem sacarose, quando liofilizadas, apresentaram um índice de sobrevivência muito baixo, em torno de 0,16%, enquanto que os inóculos liofilizados constituídos por células crescidas nos meios YM padrão (contendo 1% de sacarose) e YM contendo 6% de sacarose apresentaram 80,33% e 78,67% de sobrevivência, respectivamente. Os resultados de sobrevivência obtidos no meio YM contendo 1% e 6% de sacarose reforçaram a escolha

pela utilização de 1% de sacarose no meio de crescimento, diminuindo os custos da produção do inóculo, sem afetar sua qualidade e eficiência.

Uma vez que a liofilização causa danos na parede celular, os minerais que contribuem para manter a sua estrutura podem ter um efeito positivo na sobrevivência das células após a liofilização (CHAMPAGNE et alii, 1991b). Desta maneira, foram testados os sais: NH_4NO_3 , NH_4Cl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e K_2HPO_4 adicionados ao meio de produção celular.

Comparativamente, os sais que apresentaram os melhores resultados na sobrevivência quando adicionados ao meio YM foram NH_4NO_3 , nas concentrações 0,5% e 0,1% apresentando 79,67% e 56,67% de sobrevivência celular, respectivamente e o NH_4Cl na concentração 0,5%, que apresentou 44,00% de sobrevivência e na concentração 1,0%, com 50,33% de células sobreviventes.

O acréscimo de 0,01% e de 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ não foi apropriado para o cultivo e sobrevivência das bactérias, mesmo sendo apontado em literatura como um componente importante no crescimento de *X. campestris* (STARR, 1946; KENNEDY et alii, 1982). A taxa de sobrevivência das células cultivadas na presença deste sal foi de 3,80% e 6,23%, respectivamente.

A adição de K_2HPO_4 no meio de crescimento celular também não foi adequada para manter a viabilidade do inóculo liofilizado. Para células cultivadas em meio YM contendo 0,5% de K_2HPO_4 a porcentagem de sobrevivência foi de 3,86% e para as células cultivadas em meio YM contendo 1,0% de K_2HPO_4 foi de 12,00% de sobrevivência.

De acordo com os dados obtidos, o melhor meio de cultivo para as células de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 utilizadas na produção de inóculos liofilizados foi o YM padrão. O meio YM contendo 0,5% NH_4NO_3 foi o segundo melhor meio, seguido pelo meio YM com 6% de sacarose. A menor taxa de sobrevivência foi obtida com as células produzidas no meio YM sem sacarose.

Há poucos dados na literatura sobre a influência do meio de crescimento na sobrevivência das células durante a liofilização tornando inviável qualquer comparação quantitativa com os dados obtidos neste estudo.

Segundo MORRIS et alii (1988), as respostas das células de *Saccharomyces cerevisiae* ao “stress” da liofilização também foram influenciadas pelas condições de crescimento da levedura antes da liofilização. Alguns dos fatores que influenciaram o crescimento foram a temperatura de incubação, a idade da cultura e a composição do meio de cultivo.

De acordo com GOLDBERG e ESCHAR (1977) a viabilidade de *Streptococcus lactis* e de *Lactobacillus* sp após congelamento a -17°C foi melhor preservada quando as células foram cultivadas em meio suplementado com ácido oléico ou Tween 80. A sensibilidade destas bactérias aos danos causados pelo congelamento pode estar correlacionada com alterações na constituição dos ácidos graxos da parede celular.

Para testar se os danos causados pelo congelamento das células de *Xanthomonas* estariam relacionados às alterações na constituição lipídica da parede celular foi utilizado como meio de crescimento o meio YM contendo 1,0% de lecitina. A taxa de sobrevivência dos inóculos produzidos neste meio foi de 17,33%, significando que a alteração lipídica da parede celular não foi a causa principal da perda de viabilidade do inóculo de *X. campestris* pv. *manihotis*.

Sais de magnésio não forneceram proteção às culturas de *Lactobacillus bulgaricus* durante o congelamento, a liofilização e armazenamento. Aparentemente, o acúmulo de cátions divalentes é necessário para a manutenção da estrutura da parede celular (WRIGHT e KLAENHAMMER, 1983). No entanto, a adição de sais ao meio de crescimento pode ter efeito positivo ou negativo na estabilidade das células, dependendo da linhagem considerada (ABRAHAM et alii, 1990).

A formação e a manutenção de uma estrutura celular intacta pode predispor as células bacterianas a um estado de maior resistência durante a liofilização. A cultura a ser liofilizada deve ter, antes de tudo, a mais alta qualidade morfológica, fisiológica e nutricional (REY, 1964).

4.3.1.3 - Influência do Meio de Suspensão na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis*

Uma vez que o processo de liofilização envolve etapas de congelamento e de desidratação, o meio de suspensão deve proteger as células durante estes dois eventos. Desta maneira, um meio de suspensão adequado deve conferir crioproteção para as células durante o congelamento, além de possibilitar um aumento na velocidade de desidratação durante a liofilização e de reidratação após a liofilização. A proteção dada por um aditivo adicionado às culturas varia de linhagem para linhagem. Os efeitos positivos da adição de agentes protetores na liofilização dos microrganismos têm sido descritos em inúmeros trabalhos (LION e BERGMANN, 1961; SINHA et alii, 1974; DAMODARAN e KINSELLA, 1981; FONT DE VALDÉZ et alii, 1985a; ISRAELI et alii, 1993; TAN et alii, 1995).

De acordo com a Tabela 2, o melhor meio de suspensão celular para *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 foi o YM padrão. As células suspensas neste meio apresentaram 82,00% de sobrevivência após a liofilização.

A solução de sacarose 10% foi o segundo melhor meio de suspensão para as células de *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 fornecendo 79,33% de sobrevivência celular após a liofilização.

Inóculos liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* constituídos por células suspensas em peptona 10% apresentaram 33,67% de sobrevivência enquanto que as células suspensas em solução de leite desnatado reconstituído na concentração de 10%

apresentaram 59,67%. A suspensão em solução de dextrose 10% e em glicerol 10% levou a taxas de sobrevivências de 26,33% e 25,33%, respectivamente.

As soluções de sacarose 1%, de goma xantana 0,001%; 0,01% e 0,1%, além da solução de NH_4Cl 1%, também forneceram proteção contra as injúrias da liofilização com taxas de sobrevivência entre 20 e 40%.

Os piores meios de suspensão para *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 foram a sacarose 40% com índice de sobrevivência igual a 0,01% e a solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01% com 3,60% de células sobreviventes. Quando a água destilada foi usada como meio de suspensão, aproximadamente 93% das células foram inativadas provavelmente devido a ausência de um agente protetor.

Sais de magnésio exibem variações na sua capacidade de reparar danos celulares, dependendo da espécie considerada. O efeito estimulante do magnésio foi mais evidente em bactérias lácticas com taxas de sobrevivência de 93 a 100% (CHAMPAGNE et alii, 1991b).

Segundo HURST e HUGHES (1981) choques subletais em células de *Staphylococcus aureus* causam danos nas membranas celulares que são manifestados pela perda da tolerância à presença de sais no meio de crescimento e também podem provocar danos no ácido teicóico que são manifestados pela perda de D-alanina e de Mg^{+2} .

Sabe-se que a sacarose pode ligar-se através de pontes de hidrogênio a grupos hidroxílicos, carbonílicos, carboxílicos, imídicos, amídicos, amínicos, dentre outros, portanto, pode ser adsorvida na parede celular diminuindo o problema de super secagem das amostras. Altas concentrações de sacarose durante o congelamento pode retirar água do interior das células, danificando-as irreversivelmente.

Segundo GEHRKE et alii (1992) durante a liofilização, os danos não ocorrem na fase de sublimação mas durante a fase de desorção da água e são devidos a super

secagem das amostras. O maior ou menor grau de comprometimento das estruturas celulares que ocorre nesta etapa depende diretamente da composição do meio de suspensão utilizado.

Os aditivos acrescentados ao meio de suspensão exercem proteção a nível metabólico nas células e não apenas a nível estrutural. Além da proteção contra os cristais de gelo, as substâncias protetoras também podem restabelecer ligações das macromoléculas que foram quebradas pela remoção da água durante a liofilização (HECKLY, 1961).

Segundo LION e BERGMANN (1961) culturas de *E. coli* liofilizadas em água destilada foram completamente inativadas. No entanto, a adição de agentes protetores no meio de suspensão aumentou a taxa de viabilidade destes microrganismos. Os dissacarídeos foram os agentes de proteção mais eficientes para *E. coli*, contudo, não foi encontrada nenhuma correlação entre a eficiência de proteção do carboidrato com sua estrutura química ou sua fermentabilidade pela bactéria. Utilizando sacarose no meio de suspensão 73% de células de *E. coli* foram recuperadas após a liofilização.

De acordo com CALCOTT e MACLEOD (1974) a presença de 5% de sacarose no meio de suspensão forneceu mais de 90% de viabilidade para inóculos de *E. coli*, em todas as condições de liofilização testadas. No entanto, esta bactéria foi altamente afetada pela presença de NaCl, KCl, LiCl, Na₂SO₄ e K₂SO₄. A razão para a ação deletéria dos sais é desconhecida.

Estudos conduzidos por BRENNAN et alii (1986) indicaram que o processo de liofilização provocou danos nas proteínas da parede e da membrana celular em *Lactobacillus acidophilus*. Esses danos não somente afetaram as funções biológicas normais das células como também as tornaram mais susceptíveis aos tratamentos posteriores, tais como a reidratação e o armazenamento.

Para *Lactococcus*, o meio usado para o cultivo das células não foi eficiente como meio de suspensão, sendo que mais de 90% das bactérias morreram durante a

liofilização. Esta alta taxa de mortalidade está provavelmente, relacionada com a presença de substâncias tóxicas produzidas pelas bactérias durante o crescimento, como por exemplo, o lactato de sódio (CHAMPAGNE et alii, 1991b).

A maioria dos pesquisadores que trabalham com culturas liofilizadas utilizam a solução de leite desnatado reconstituído 10% como meio de suspensão devido a proteção garantida e sua facilidade de desidratação. As proteínas presentes no leite desnatado reconstituído fornece uma matriz protetora para as macromoléculas celulares danificadas durante a liofilização. Além das proteínas, outros componentes como o soro do leite e a lactose aumentam a sobrevivência das bactérias durante a liofilização. Para *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280, o uso de leite desnatado reconstituído como meio de suspensão forneceu um inóculo com 59,67% de sobrevivência (Tabela 2).

A sacarose tem sido recomendada como um agente adequado para substituir o leite desnatado reconstituído tanto pelo seu custo como pela facilidade de obtenção. No entanto, as soluções de sacarose e de glicose, quando utilizadas na liofilização de culturas bacterianas, tendem a formar uma superfície vítrea, com formação de espuma e colapso da estrutura dos cristais de gelo. Aparentemente, estas características, não afetam a sobrevivência das bactérias, mas dificultam a liofilização, tornando-a mais demorada (HECKLY, 1978).

Os polímeros, como por exemplo a goma xantana e a dextrana, utilizados em baixas concentrações aceleram a secagem dos inóculos. No sistema de liofilização usado por FONT DE VALDÉZ et alii (1985a), as culturas de bactérias lácticas suspensas em polímeros como o polietilenoglicol e a dextrana alcançaram uma umidade residual de 1,1 a 1,7% logo após a liofilização, com uma taxa de sobrevivência superior a 80%. De acordo com estes autores, a adição de compostos que influenciam a taxa de secagem ou o nível de umidade residual e de água disponível do produto pode certamente influenciar a taxa de sobrevivência das culturas liofilizadas.

Segundo REY (1964) os carboidratos são os constituintes mais importantes presentes em qualquer meio de liofilização. Dos muitos açúcares testados, a sacarose

tem sido a mais eficiente, não somente pela alta taxa de sobrevivência inicial mas também por manter a sobrevivência das culturas mesmo quando expostas a altas temperaturas de armazenamento. Com relação ao uso da glicose, embora ocorra uma alta taxa de sobrevivência imediatamente após a liofilização, não há uma manutenção da viabilidade por um período mais longo de armazenamento a altas temperaturas.

O meio de suspensão é essencial para prevenir a secagem excessiva da cultura e para proteger as células dos danos mecânicos e físicos que ocorrem durante a liofilização e o armazenamento (FONT DE VALDEZ e GIORI, 1993).

Segundo CHAMPAGNE et alii (1991b), a sacarose foi um excelente agente crioprotetor para inúmeras linhagens de bactérias lácticas testadas. Os carboidratos como a sacarose e a lactose inibem a produção de radicais livres que são freqüentemente associados com a perda de viabilidade das bactérias liofilizadas. Também podem formar pontes de hidrogênio com a proteína, substituindo a água removida. Através deste mecanismo ocorre uma diminuição do número de grupos polares e apolares presentes na molécula das proteínas que estão expostas ao meio extracelular. Além da estabilização das proteínas, o efeito protetor do carboidrato presente no meio de suspensão durante o congelamento pode ser atribuído a sua capacidade de ligação com a água, prevenindo ou reduzindo a formação de cristais de gelo tanto intra como extracelularmente.

Os efeitos da composição do meio de suspensão na viabilidade dos esporos do fungo *Arthrobotrys superba* liofilizados foram estudados por TAN et alii (1995). A viabilidade dos esporos liofilizados foi profundamente influenciada pela presença de carboidratos no meio de suspensão. A taxa de germinação foi ótima com o uso de lactose, inositol, trealose, maltose e sacarose. A presença de açúcares protegeu as membranas durante o congelamento e a liofilização pela formação de pontes de hidrogênio com os fosfolípidos presentes na membrana citoplasmática. Os carboidratos repelem as partes hidrofóbicas das cadeias de aminoácidos prevenindo o desdobramento da molécula proteica. A presença de cátions divalentes foi insignificante. A adição de magnésio, cobre e zinco foi mais tóxica do que propriamente benéfica para os esporos

pois, estes compostos estimularam a produção de radicais hidroxilas, resultando na peroxidação das membranas.

A peptona e o extrato de levedura aumentam a sobrevivência da maioria das linhagens liofilizadas quando comparado com a água, mas são geralmente menos eficientes do que a solução de leite desnatado reconstituído ou do que a sacarose (CHAMPAGNE et alii, 1991b).

Segundo BEUCHAT (1978) existem várias hipóteses para explicar o processo de injúria em células liofilizadas. As mais aceitas são a formação de gelo intracelular, a desidratação, o choque térmico, o efeito dos solutos intracelulares e o efeito da concentração dos solutos extracelulares. Alguns compostos como carboidratos, proteínas, entre outros, podem fornecer proteção contra esses danos. Os mecanismos pelos quais estes compostos fornecem proteção não estão bem estabelecidos, mas muitos agentes crioprotetores contêm grupos -OH e grupos -NH₂ com forte tendência para formar pontes de hidrogênio com a água e com as macromoléculas celulares. Os peptídeos e as peptonas podem estabilizar as ligações hidrofóbicas e corrigir algumas alterações estruturais das proteínas e dos lipídeos presentes nas membranas citoplasmáticas. Produtos complexos como o leite desnatado reconstituído, os carboidratos, o glicerol, a dextrana e a albumina, por exemplo, são alguns dos agentes que apresentam a capacidade de proteger as bactérias Gram negativas contra as injúrias provocadas pela liofilização, reduzindo seus efeitos letais. Num contexto geral, fatores como a idade das culturas, o pH do meio de suspensão e a taxa de congelamento também influenciam a proteção dada por estes compostos.

A introdução de um agente crioprotetor numa suspensão celular reduz a taxa de congelamento máxima tolerável e aumenta a taxa de recuperação das células. O mecanismo de ação destes agentes ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que a presença de agentes crioprotetores como a sacarose e o leite desnatado reconstituído, altera as características de permeabilidade da membrana celular permitindo o fluxo de solutos do meio extracelular para o meio intracelular durante o congelamento e o fluxo inverso durante o descongelamento das suspensões. Dessa forma, a eficiência dos

agentes crioprotetores está em sua capacidade de permitir a perda de solutos, reversivelmente, pela membrana durante um choque osmótico (MERYMAN, 1971).

Alguns carboidratos como a sacarose, a glicose e a lactose têm sido utilizados para a manutenção da atividade biológica das macromoléculas celulares através da sua ação estabilizante (ARAKAWA e TIMASHEFF, 1982).

De acordo com GREIFF (1971) e CROWE et alii (1987), a água é indispensável para a manutenção da integridade das membranas biológicas, das bicamadas de fosfolipídeos e de muitas proteínas hidrossolúveis. No entanto, durante a liofilização é possível remover quase toda água das células suspensas em meio contendo carboidratos, especialmente dissacarídeos. Possivelmente, a estabilização das proteínas em soluções aquosas seja devido a um mecanismo conhecido como exclusão preferencial do carboidrato quando este entra em contato com a superfície da proteína. O resultado deste processo é o aparecimento de uma estrutura proteica extremamente compacta e estável, com a manutenção da sua atividade biológica mesmo quando a água é removida. Em termos celulares, este processo pode ser observado através das altas taxas de sobrevivência obtidas após a liofilização do inóculo.

Durante a liofilização, a remoção da água altera profundamente as propriedades físicas dos fosfolipídeos presentes na membrana celular, levando a eventos destrutivos como por exemplo, a fusão das vesículas de lipídeos, a transição da fase líquido cristalina para a fase de gel e a elevação da permeabilidade com o escoamento do conteúdo das vesículas para o meio externo. Alguns carboidratos presentes no meio de suspensão são capazes de prevenir tais danos não somente pela inibição da fusão entre as vesículas adjacentes durante a liofilização mas também pela manutenção da fase fluida dos lipídeos na ausência de água celular. Como resultado imediato, as mudanças na permeabilidade e as separações de fase que geralmente acompanham a desidratação não ocorrem. Estes efeitos promovidos pelos carboidratos na estabilidade das bicamadas e nas proteínas são importantes para a sobrevivência das células e para a manutenção de suas atividades biológicas normais (CROWE et alii, 1987 e CROWE et alii, 1990).

ISRAELI et alii (1993) estudaram a proteção das células liofilizadas pela adição de agentes crioprotetores como a tiouréia, sais, glicose e outros carboidratos no meio de suspensão celular. A melhor proteção foi obtida com o emprego de trealose, um dissacarídeo composto por duas unidades de glicose. A trealose protegeu as biomembranas e as proteínas do congelamento e da secagem. Exerceu também um efeito protetor através da estabilização da fase líquido-cristalina, provavelmente, substituindo as moléculas de água entre os fosfolipídeos das membranas celulares.

4.3.1.4 - Efeito do Meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis*.

A reidratação é uma das etapas mais importantes na recuperação dos microrganismos liofilizados. As células que foram submetidas a injúrias subletais podem ser completamente inativadas ou recuperadas dependendo das condições de reidratação impostas. Tanto a composição do meio como sua temperatura, seu pH, volume e osmolaridade podem afetar a recuperação das células.

Com os dados mostrados nas Tabelas 1 e 2, ficou determinado que as maiores taxas de sobrevivência apresentadas pelo inóculo liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 foram obtidas com a utilização de células cultivadas e suspensas em meio YM padrão. Utilizando somente inóculos produzidos nestas condições foram realizados testes para a determinação da influência do meio de reidratação na viabilidade das culturas liofilizadas.

Como pode ser visto na Tabela 3, todos os fluidos de reidratação testados contribuíram para a obtenção de taxas de recuperação celular acima de 25%, com exceção dos inóculos reidratado com lactose 10%, com solução salina 0,9%, com sacarose 60% e dextrose 10% que apresentaram apenas 11,66%; 15,67%; 21,33% e 23,66% de sobrevivência, respectivamente.

O melhor meio de reidratação para o inóculo de *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 foi a solução de leite desnatado reconstituído 10% que apresentou 80,00% de sobrevivência celular.

Foram testadas soluções de sacarose em diferentes concentrações para verificar a influência da pressão osmótica na recuperação celular durante a reidratação. A bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* liofilizada mostrou-se extremamente resistente a altas concentrações de sacarose presente no meio de reidratação. Houve a recuperação de 21,33% de células viáveis no inóculo reidratado com uma solução de 60% de sacarose. O inóculo reidratado com solução de sacarose 10% apresentou uma taxa de 68,33% de sobrevivência.

Mesmo a utilização de água destilada, considerada um fluido de reidratação inadequado, promoveu a recuperação de 35,66% de células viáveis. Entretanto, a combinação da água destilada como meio de suspensão e como meio de reidratação celular foi inadequada, ocasionando aproximadamente 100% de morte celular (Tabela 8).

O emprego de soluções de goma xantana como meio de reidratação do inóculo também mostrou-se eficiente com taxas de sobrevivência celular superior a 30% (Tabela 3).

A influência de diferentes meios de reidratação na viabilidade de linhagens pertencentes ao gênero *Streptococcus* foram analisados por SINHA et alii (1982). A máxima viabilidade celular neste caso foi obtida usando solução de sacarose 10% como meio de reidratação, seguido pela solução de leite desnatado reconstituído 10%. Com a utilização de água destilada, um número muito baixo de células viáveis foi recuperado. A baixa proteção dada pela água destilada às células liofilizadas pode ser similar aos distúrbios no balanço osmótico causado pela exposição das células a soluções hipotônicas. Além do temporário desbalanço osmótico, alguns outros fenômenos podem estar envolvidos, pois, as células liofilizadas reidratadas com solução salina e com

tampão fosfato que são conhecidos por manter o equilíbrio osmótico, apresentaram uma baixa taxa de sobrevivência.

Segundo FONT DE VALDÉZ et alii (1985 b,c) o meio de reidratação é muito importante no reparo das injúrias sofridas por um microrganismo exposto a condições desfavoráveis ou a danos subletais. Segundo estes autores, a reidratação é o mais importante de todos os fatores determinantes da viabilidade celular do inóculo liofilizado. O uso das soluções concentradas de sacarose 20% ou de fluidos com alto teor de sólidos como a solução 10% de leite desnatado reconstituído promoveu a melhor recuperação das bactérias do gênero *Lactobacillus*. Este efeito favorável pode ser atribuído à capacidade de tais soluções em regular a entrada da água extracelular para o interior das células liofilizadas.

A Figura 6 ilustra a influência da concentração de sacarose na taxa de sobrevivência celular de diferentes inóculos reidratados. Cada tipo de inóculo reidratado exibiu uma resposta diferenciada para cada concentração de sacarose usada. No geral, a reidratação do inóculo com solução de sacarose 10% foi a que apresentou os melhores resultados em termos de recuperação celular, com exceção dos inóculos suspensos em solução de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01% e em água destilada.

O inóculo liofilizado contendo células produzidas e suspensas em meio YM padrão apresentou uma taxa mais elevada de sobrevivência celular (aproximadamente 60%) quando foi reidratado com soluções de sacarose até 20%. Com o uso de soluções de sacarose em concentrações superiores a 20% houve um aumento na inativação das células. Comportamento idêntico foi observado para células suspensas em solução de leite desnatado reconstituído 10%, sendo que a taxa máxima de sobrevivência foi de 54%, quando reidratadas com solução de sacarose 10%.

O inóculo constituído por células produzidas em meio YM padrão e suspensas em solução de sacarose 10% apresentou a mais alta taxa de sobrevivência celular, de 73,3% quando foi reidratado com solução de sacarose 10%.

As células produzidas em meio YM e suspensas em solução 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ apresentaram uma taxa de sobrevivência muito baixa, em todas as concentrações de sacarose testadas. Apenas o inóculo reidratado com solução de sacarose 20% apresentou uma recuperação de 20% de células viáveis, valor este, o máximo obtido para este tipo inóculo.

As células suspensas em água destilada exibiram cerca de 20% de sobrevivência quando reidratadas em sacarose 20%. Na concentração de 10% de sacarose, a taxa de sobrevivência foi de aproximadamente 14%.

Segundo CHOATE e ALEXANDER (1967), durante a reidratação ocorrem muitas mudanças na concentração dos solutos e estas mudanças não somente afetam o equilíbrio osmótico das células como também podem afetar os componentes celulares específicos do organismo. Para a reidratação de *Spirillum atlanticum*, uma bactéria muito sensível a liofilização, foi escolhida a solução de sacarose 24% como meio de reidratação devido seu conhecido efeito protetor durante a liofilização e suas propriedades osmóticas. A taxa máxima de recuperação para esta bactéria foi de 0,5% de sobrevivência.

Segundo BEUCHAT (1978), uma bactéria é danificada quando as diferenças de pressão osmótica no meio intra e extracelular são suficientemente altas ou baixas para retardar a taxa de crescimento ou afetar sua capacidade de reprodução. As bactérias Gram negativas possuem uma concentração de solutos intracelulares comparativamente menor e são portanto, mais susceptíveis à plasmólise do que outros tipos de microrganismos. A capacidade das células em reter a viabilidade quando expostas a um ambiente com maior ou menor concentração de solutos depende da integridade da membrana celular. Durante um choque osmótico podem ocorrer perdas de proteínas associadas às membranas, tais como as proteases e conseqüentemente, provocar uma diminuição na viabilidade das células.

A definição de uma taxa de reidratação mais adequada para reter a integridade funcional e estrutural do organismo é ainda um desafio pois os métodos usados não

permitem a detecção dos danos sofridos pelos microrganismos durante a liofilização e a reidratação (BRYAN et alii, 1991).

Foi demonstrado por LEACH e SCOTT (1959) que a capacidade de fermentação das leveduras desidratadas era destruída por certos procedimentos de reidratação que aparentemente não afetavam a viabilidade celular. Procedimentos especiais de reidratação foram necessários para a retenção das propriedades de fermentação.

A reidratação das culturas liofilizadas em meio líquido é completada em poucos segundos, assim, as células são submetidas a mudanças muito rápidas do estado desidratado para um estado coloidal. A complexidade das mudanças e a velocidade na qual elas ocorrem torna extremamente difícil medir ou controlar os eventos que se sucedem rapidamente. Conclusões definitivas com relação ao modo de ação de cada fluido reconstituente não podem ser traçadas a partir dos resultados obtidos neste estudo. Em alguns organismos, os fluidos podem regular a velocidade na qual a água entra nas células, enquanto que em outras linhagens podem provocar fenômenos osmóticos desfavoráveis (LEACH e SCOTT, 1959; CLEGG et alii, 1982; FONT DE VALDÉZ, 1985c).

Para a reidratação dos demais inóculos e para testar a influência do processo de reidratação na viabilidade celular foram escolhidos os meios que apresentaram melhores resultados para a recuperação celular conforme a Tabela 3: YM padrão, solução de leite desnatado reconstituído 10%, sacarose 1, 5, 10, 20 e 40% e solução de goma xantana 0,001% e 0,01%. A água destilada foi usada como fluido padrão para reidratação.

4.3.1.5 - Efeito das Condições de Reidratação na Sobrevivência das Células de *X. campestris* pv. *manihotis*.

De modo geral, as condições sob as quais o processo de reidratação é realizado também exercem um efeito marcante na recuperação das células viáveis. Em linhas gerais, uma baixa taxa de recuperação de células viáveis após a liofilização pode ser

atribuída a procedimentos inadequados de reidratação. Dentre as condições mais importantes encontram-se o tempo de reidratação e o pH do meio de reidratação.

4.3.1.5.1 - Efeito do Tempo de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado

Neste estudo, foi utilizado o inóculo constituído por células cultivadas e suspensas em meio YM padrão e reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10%.

De acordo com a Figura 7, as mais altas taxas de sobrevivência celular de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 foram obtidas quando a cultura liofilizada foi reidratada por 10 e 20 minutos, com aproximadamente 80% de sobrevivência. A taxa de sobrevivência decaiu após 20 minutos de exposição. Com 30, 40 e 50 minutos de reidratação, a taxa de sobrevivência ficou em torno de 50%. Após 180 minutos de reidratação foi obtida a menor taxa de sobrevivência que foi de cerca de 18%.

Resultados similares foram encontrados para *Lactobacillus casei*, *L. plantarum* e *Streptococcus lactis*. Num estudo envolvendo 16 linhagens de *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* os resultados foram dependentes da espécie ou da linhagem pesquisada. De modo geral, a taxa de sobrevivência celular após 10 minutos de exposição ao fluido de reidratação foi maior do que a encontrada após 5, 15 ou 30 minutos. Para *Lactobacillus acidophilus* a taxa de sobrevivência após 10 minutos de reidratação foi de 68%, enquanto que após 30 minutos de reidratação houve a recuperação de apenas 4% de células sobreviventes. Para *Leuconostoc mesenteroides* a taxa de sobrevivência foi de 70% após 10 minutos de reidratação e de 57% após 30 minutos de exposição ao fluido reconstituente (FONT DE VALDÉZ et alii, 1985a).

Aparentemente, não há uma explicação para este fenômeno. Algumas hipóteses apontam o efeito similar ao que ocorre no descongelamento de culturas concentradas congeladas. A alta densidade bacteriana provoca uma rápida fermentação e compostos

inibidores são formados. O mesmo poderia ocorrer com as culturas liofilizadas. Os períodos de reidratação mais longos poderiam permitir uma rápida atividade metabólica, danificando as células e seus componentes estruturais. Conseqüentemente, os fatores que influenciam a velocidade do metabolismo das células também podem afetar sua viabilidade após a reidratação (CHAMPAGNE et alii, 1991b).

4.3.1.5.2 - Influência do pH do Meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado

Assim como o pH do meio de cultura exerce forte influência sobre o crescimento celular, este parâmetro durante o processo de reidratação também influencia a taxa de sobrevivência do inóculo liofilizado.

O meio de reidratação usado para a determinação da influência do pH na viabilidade celular foi o meio YM padrão em diferentes valores de pH ajustados com NaOH 2N e HCl 2N.

Os dados obtidos para *X. campestris* pv. *manihotis* neste experimento mostraram nitidamente o efeito do pH do meio de reidratação na sobrevivência das células liofilizadas. Estes resultados podem ser observados na Figura 8. Os meios de reidratação com pH 3,0; 8,0; 8,5 e 10,0 foram extremamente prejudiciais para a sobrevivência celular se comparado com os valores de pH 6,0; 6,5 e 7,0. Foi observada uma sensibilidade muito maior das células liofilizadas ao pH ácido do que ao pH mais alcalino. Possivelmente, os componentes da parede celular são mais susceptíveis à degradação em meio ácido do que em meio básico. É também provável que o cátion da base utilizada para elevar o pH do meio de reidratação, tenha interferido nos resultados obtidos, possibilitando uma maior recuperação celular quando a cultura liofilizada foi reidratada em meio com pH ajustado para 10,0 do que para 3,0, onde também pode estar havendo a influência do ânion do ácido (HCl 2N) usado para abaixar o pH do fluido de reidratação.

Para o inóculo de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 o pH ótimo do meio de reidratação foi de 6,5 apresentando uma taxa de 60% de sobrevivência. O meio de reidratação com pH 3,0 promoveu quase 100% de inativação celular. Portanto, para *X. campestris* pv. *manihotis*, o pH do meio de reidratação deve ser ajustado na faixa de 6,0 a 7,0.

De acordo com SINHA et alii (1982), o máximo de células viáveis de *Streptococcus cremoris* liofilizadas foi de 596×10^5 UFC/ml obtido quando o pH do meio de reidratação foi ajustado na faixa de 5,0 a 7,5.

Na literatura há escassas informações disponíveis sobre o efeito do pH do meio de reidratação, mas o pH 6,5 parece ser ótimo para a reidratação de uma ampla variedade de microrganismos (CHAMPAGNE et alii, 1991b).

4.3.2 - Influência Combinada dos Meios de Produção, Suspensão e Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis*.

Numerosos parâmetros estão envolvidos nas respostas das células aos danos provocados pela liofilização. Embora estes parâmetros tenham sido identificados individualmente, os efeitos interativos que agem em conjunto e que determinam a taxa de recuperação celular permanecem difíceis de serem analisados (SCHWARTZ e DILLER, 1983).

Uma vez definidos os melhores meios de produção e de suspensão celular e os melhores fluidos de reidratação das culturas liofilizadas (Tabelas 1, 2 e 3), foram realizados testes para determinar a influência combinada destes múltiplos fatores na sobrevivência das células liofilizadas.

4.3.2.1 - Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade dos Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* Constituídos por Células Produzidas em Meio YM com Variação no Tipo e nas Concentrações de Sais e Suspensas em Meio YM Padrão

Como pode ser visto na Tabela 4, inóculos liofilizados formados por células produzidas em meio YM contendo 0,5% e 1,0% de NH_4NO_3 , suspensas em YM padrão e reidratadas com diferentes meios apresentaram variação na taxa de sobrevivência de acordo com o meio de reidratação utilizado.

A mais alta taxa de sobrevivência foi obtida quando o inóculo constituído por células produzidas em meio YM contendo 0,5% de NH_4NO_3 foi reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10%, apresentando 75,00% de células sobreviventes.

O uso de um meio ótimo para a produção de células como foi o meio YM contendo 0,5% de NH_4NO_3 , aliado ao uso de um meio de reidratação excelente como o leite desnatado reconstituído 10%, promoveu a recuperação de altas taxas de células viáveis, perfeitamente reparadas da injúria sofrida durante a liofilização. No entanto, o uso de um fluido de reidratação não muito adequado como a sacarose 40%, afetou negativamente a recuperação celular resultando em apenas 4,26% de células viáveis mesmo estas sendo produzidas num meio de crescimento ótimo.

Com base nestes dados, foi possível concluir que, embora as células tivessem sido produzidas e liofilizadas nas condições ótimas, o processo final de reidratação exerceu também um grande efeito sobre estas culturas, determinando inclusive a recuperação ou não das células injuriadas.

As células produzidas em meio YM contendo 1% de NH_4NO_3 exibiram uma grande diferença na taxa de sobrevivência quando comparadas com as células produzidas em YM contendo 0,5% de NH_4NO_3 . A mais alta taxa de sobrevivência foi de 34,33% obtida com o inóculo reidratado com sacarose 10%. Neste caso, se os meios de reidratação utilizados foram os mesmos do caso anterior, o meio de suspensão foi

mantido constante, assim como todas as condições de liofilização, parece provável supor que o principal fator que influenciou negativamente a taxa de sobrevivência foi o meio de produção das células. Assim, as células produzidas no meio contendo 1,0% de NH_4NO_3 podem ter desenvolvido alguma característica metabólica que tornou-se letal ao longo do processo de produção do inóculo e que pode ser refletida na viabilidade do inóculo após a reidratação.

Para o inóculo produzido em meio contendo 1,0% de NH_4NO_3 , o uso de água destilada como líquido de reidratação forneceu uma taxa de sobrevivência de 11,00%. Até o leite desnatado reconstituído, reconhecidamente um ótimo meio de reidratação, não ofereceu um bom resultado se comparado com a reidratação com solução de sacarose 5, 10 e 20%. A menor porcentagem de células viáveis foi de 0,33%, obtida com o emprego da solução de sacarose 40%.

A Tabela 5 mostra a influência do meio de reidratação no inóculo constituído por células produzidas em meio YM contendo 0,5% e 1,0% de NH_4Cl e suspensas em meio YM padrão.

Para o inóculo constituído por células cultivadas em meio contendo 0,5% de NH_4Cl , o melhor meio de reidratação foi a solução de leite desnatado reconstituído 10%, apresentando 44,00% de células viáveis. Novamente, o pior meio de reidratação foi a sacarose 40%, com apenas 1,13% de sobrevivência. Neste caso, houve a combinação de um meio de crescimento não ideal com um meio de reidratação insatisfatório resultando em danos celulares e conseqüentemente, em uma baixa taxa de sobrevivência.

Para as culturas de *X. campestris* pv. *manihotis* produzidas em meio YM contendo 1,0% de NH_4Cl e suspensas em meio YM padrão, o melhor meio de reidratação também foi o leite desnatado reconstituído 10% com 50,33% de sobrevivência. Uma taxa de apenas 2,66% de sobrevivência foi obtida com o emprego da solução de goma xantana 0,01%. Houve, portanto, uma grande variação nas taxas de sobrevivência celular de 2 a 50% de acordo com o meio de reidratação usado. Como os

meios de produção e de suspensão foram mantidos constantes, esta variação pode ser atribuída à influência do fluido de reidratação na viabilidade do inóculo liofilizado.

Os resultados obtidos com a utilização de NH_4NO_3 e de NH_4Cl no meio de crescimento do microrganismo, nas concentrações testadas, foram substancialmente diferentes. Utilizando-se NH_4NO_3 no meio de crescimento, as melhores taxas de sobrevivência dos inóculos foram obtidas a uma concentração de 0,5%, enquanto que na utilização de NH_4Cl , as melhores taxas de sobrevivência foram obtidas a uma concentração de 1,0%. Estes resultados indicam que há uma possível relação entre o teor de nitrogênio inorgânico presente no meio de crescimento e a taxa de viabilidade celular do inóculo liofilizado. Não se deve contudo deixar de salientar a influência de cátions e ânions componentes dos sais, como discutido para ácidos e bases no item 4.3.1.5.2.

Como pode ser constatado na Tabela 6, o uso de magnésio na forma de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, muito citado na literatura como um nutriente essencial para o crescimento de *X. campestris*, ocasionou uma das mais baixas porcentagens de sobrevivência.

Os inóculos produzidos com células crescidas em meio contendo 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ apresentaram níveis muito baixos de sobrevivência celular, mesmo quando reidratados com solução de leite desnatado reconstituído 10% ou de sacarose 10%. Utilizando solução de leite desnatado reconstituído 10% como fluido de reidratação, a taxa de recuperação deste inóculo foi de 3,80%. Utilizando YM padrão foi observado uma taxa de apenas 0,53% de sobrevivência celular. A maior taxa de recuperação foi de 20,67% utilizando como fluido de reidratação uma solução de sacarose 20%.

As células que foram cultivadas em meio contendo 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ produziram inóculos liofilizados com diferentes níveis de sobrevivência quando comparados com aqueles formados por células cultivadas em meio contendo 0,01% deste sal. Os inóculos liofilizados contendo células cultivadas em meio com adição de 0,01% e 0,1% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, quando foram reidratados com solução de leite

desnatado reconstituído 10% apresentaram 3,80% e 6,23% de sobrevivência e com sacarose 10% apresentaram 2,33% e 7,66% de sobrevivência, respectivamente. Utilizando a solução de sacarose 40% como fluido de reidratação houve a recuperação de somente 0,03% de células viáveis para a concentração de 0,1% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e de 6,23% para a concentração de 0,01%. Como os meios de reidratação foram mantidos constantes, a variação nas taxas de sobrevivência deve ter sido causada pela diferença na concentração de magnésio no meio de produção das células.

De modo geral, as baixas taxas de sobrevivência obtidas com o uso de YM padrão contendo $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ como meio de crescimento celular mostraram que este meio foi inadequado para a produção de células usadas na elaboração de inóculos liofilizados.

4.3.2.2 - Influência do Meio de Reidratação no Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de Sacarose e Suspensas em Meio YM Padrão

De acordo com a Tabela 7, inóculos liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 constituídos por células cultivadas em meio YM padrão e em meio YM contendo 6% de sacarose apresentaram as melhores taxas de sobrevivência, independente do meio de reidratação usado.

De um modo geral, as células produzidas em meio YM padrão suportaram melhor os danos sofridos durante a liofilização, refletindo numa maior taxa de sobrevivência do inóculo. Utilizando solução de leite desnatado reconstituído 10% como meio de reidratação foi alcançado 80% de sobrevivência celular ($2,40 \times 10^9$ UFC/ml), enquanto que a menor taxa de sobrevivência foi de 33,3% ($1,00 \times 10^9$ UFC/ml) usando solução de goma xantana 0,001% como meio de reidratação.

Comparativamente, inóculos liofilizados formados por células produzidas em meio YM com ausência total de sacarose apresentaram os menores índices de

sobrevivência também independente do meio de reidratação usado. O inóculo reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10% apresentou apenas 0,16% de sobrevivência, com solução de sacarose 10% apresentou 0,26% de sobrevivência e com YM padrão apresentou 0,10%. Para os inóculos reidratados com os demais meios, a taxa média de sobrevivência celular ficou na faixa de 0,01% a 0,04%.

De acordo com CHAMPAGNE et alii (1991b), na produção de inóculos liofilizados, a perda de viabilidade está diretamente relacionada ao emprego de condições de cultivo inadequadas.

Provavelmente, as células crescidas sem a presença de sacarose apresentaram um comprometimento geral das funções e dos componentes celulares ficando portanto, mais susceptíveis aos choques físico-químicos que ocorrem durante a liofilização e a reidratação. A ausência de uma fonte de carboidrato pode ter determinado a falta ou a escassez de material capsular ao redor das células, que, como se sabe, funciona como um eficiente mecanismo protetor contra as injúrias do processo de congelamento, liofilização e armazenamento.

4.3.2.3 - Influência do Meio de Reidratação e do Meio de Suspensão na Viabilidade Celular dos Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* cujas Células Foram Produzidas em Meio YM Padrão

Na Tabela 8 encontram-se os resultados referentes ao efeito combinado do meio de suspensão das células com os meios de reidratação dos inóculos liofilizados. As células foram produzidas em meio YM padrão e liofilizadas em três diferentes meios de suspensão: água destilada, sacarose 10% e leite desnatado reconstituído 10%. Os meios e as condições de reidratação foram mantidos constantes.

As células suspensas em água destilada apresentaram as menores taxas de sobrevivência quando comparadas com as células suspensas em solução de leite desnatado reconstituído 10% e em sacarose 10%. As células de *X. campestris* pv.

manihotis que foram suspensas e reidratadas em água destilada foram as que apresentaram maior perda de viabilidade, apresentando em média 0,03% de sobrevivência.

De modo geral, quando a sacarose 10% foi utilizada como meio de suspensão celular, uma maior taxa de células sobreviventes foi obtida. Os valores máximos de recuperação celular foram observados quando o inóculo foi reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10% e sacarose 10% com respectivamente, 79,33% e 73,33% de sobrevivência.

Quando o leite desnatado reconstituído 10% foi empregado como meio de suspensão as taxas de sobrevivência também foram elevadas, ficando entre 29 e 60%. O melhor meio de reidratação neste caso, também foi o leite desnatado reconstituído com 59,67% de sobrevivência.

Comparando os fluidos de reidratação, quando a água destilada foi usada como meio de reidratação, o inóculo constituído por células suspensas em água destilada apresentou 0,03% de sobrevivência; o inóculo constituído por células suspensas em leite desnatado reconstituído 10% apresentou 17,00% de sobrevivência e o inóculo formado por células suspensas em sacarose 10% apresentou 35,00% de sobrevivência.

Quando o leite desnatado reconstituído foi usado como fluido de reidratação, o inóculo suspenso em água destilada apresentou 6,40% de sobrevivência; o inóculo suspenso em leite desnatado reconstituído 10% apresentou 59,67% de células viáveis e o inóculo suspenso em sacarose 10% forneceu 79,33% de sobrevivência. Assim, como o meio de reidratação e o meio de produção foram os mesmos em todos os inóculos, a variação na taxa de sobrevivência foi relacionada exclusivamente com o meio no qual as células foram suspensas.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os meios de reidratação e de suspensão podem potencializar as perdas de viabilidade celular ou manter uma elevada taxa de sobrevivência.

4.3.3 - Influência do Tempo e da Temperatura de Armazenamento na Viabilidade Celular do Inóculo de *X. campestris* pv. *manihotis*

O armazenamento em condições não apropriadas e por um longo período pode reduzir drasticamente a atividade e a eficiência das culturas liofilizadas. A estabilidade de uma cultura liofilizada a longo prazo depende tanto da atmosfera de armazenamento como da umidade residual do inóculo (GEHRKE et alii, 1992).

A influência do tempo de armazenamento na sobrevivência dos inóculos liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* armazenados em freezer a -20°C pode ser observada na Figura 9.

Juntamente com o estudo da influência do tempo e da temperatura de armazenamento foi feita a correlação do meio de suspensão do inóculo liofilizado com seu desempenho durante a armazenagem. Assim, diferentes inóculos foram testados quanto sua capacidade de resistir durante 12 meses a temperatura de congelamento e à temperatura ambiente.

Para este teste foram escolhidos inóculos liofilizados constituídos pelas células produzidas em meio YM padrão e suspensas em diferentes meios, tais como: meio YM padrão, solução de sacarose 10%, leite desnatado reconstituído 10%, solução de dextrose 10%, solução salina de NaCl 0,9%, solução de NH_4NO_3 1,0%, solução de NH_4Cl 1,0% e água destilada.

Os melhores resultados foram encontrados para o inóculo produzido e suspenso em meio YM padrão, mesmo perdendo em torno de 50% de sua viabilidade celular durante o armazenamento. Imediatamente após a liofilização, as células suspensas neste meio apresentaram 80% de sobrevivência, entretanto, após 12 meses de armazenamento a -20°C esta taxa caiu para 41,67% de sobrevivência.

Os inóculos compostos por células suspensas em soluções de sacarose 10% e de leite desnatado reconstituído 10%, apresentaram 30% e 19% de sobrevivência, respectivamente, quando armazenadas a -20°C .

A água destilada, novamente, foi o meio de suspensão que menos proteção propiciou para as células durante o processo de armazenamento dos inóculos.

Os inóculos do mesmo lote que os armazenados em freezer a -20°C foram armazenados em dessecador à temperatura ambiente (27°C). Como pode ser observado na Figura 10, houve uma queda generalizada na taxa de sobrevivência celular de todos os inóculos armazenados à temperatura ambiente, inclusive daqueles inóculos cujas células foram produzidas e suspensas em meio YM padrão (com 80% de sobrevivência inicial) que, após 12 meses, apresentaram uma taxa de sobrevivência de apenas 18%. Os inóculos suspensos em água destilada foram completamente inativados após o armazenamento em dessecador à temperatura ambiente.

Desta forma, a melhor temperatura para o armazenamento destas culturas liofilizadas, independente do tratamento prévio ao qual foram submetidas, foi a temperatura abaixo da temperatura de congelamento. Em todos os tratamentos, o melhor meio de suspensão celular foi o meio YM padrão.

De acordo com SINHA et alii (1974), o uso de leite desnatado reconstituído suplementado com ácido ascórbico, tiouréia e cloreto de amônio aumentou a sobrevivência de bactérias lácticas pertencentes ao gênero *Streptococcus*, após a liofilização e durante o armazenamento a 30°C , por dois meses. Entre as linhagens examinadas, *Streptococcus faecalis* S-30 exibiu máxima sobrevivência celular após a liofilização (93,9%) e após a estocagem (77,9%) quando suspensas em solução de leite desnatado reconstituído. A baixa sobrevivência observada em algumas linhagens pode ser atribuída às características morfológicas e não apenas à sensibilidade destas linhagens ao processo de liofilização e de armazenamento. De modo geral, as linhagens que apresentavam bastonetes curtos foram mais resistentes do que as que possuíam bastonetes mais longos.

Segundo TAN et alii (1995), a viabilidade dos esporos de *Arthrotrrys superba* liofilizados diminuiu em média 20% durante o armazenamento a 30°C, em meio contendo lactose. As diferenças na estabilidade dos meios de suspensão durante a liofilização explicam sua maior ou menor eficiência na preservação da viabilidade das células.

Segundo GEHRKE et alii (1992) a viabilidade de células liofilizadas de *Lactobacillus plantarum* diminuiu com o aumento da temperatura de armazenamento. A máxima taxa de sobrevivência foi obtida com o armazenamento a -20°C, com 90% de células viáveis após 10 meses de estocagem. A 20°C, houve 100% de inativação celular. Contudo, a temperatura de armazenamento não é o único fator envolvido na manutenção de altas taxas de sobrevivência. A taxa de umidade residual também é muito importante.

Segundo GREAVES (1964) a instabilidade das células liofilizadas armazenadas por um longo período é causada pelas reações dos grupos carbonilas presentes nas membranas bacterianas. As reações destes grupos podem ser neutralizados pela adição de sacarose.

4.3.4 - Influência do Teor de Umidade Residual na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado

A eliminação da água intracelular e a taxa de umidade residual do inóculo exercem uma importante influência nas injúrias sofridas pelas células após a liofilização e determinam a taxa de sobrevivência celular. Estes fenômenos têm ainda maior relevância quando se é considerada a etapa de armazenamento dos inóculos.

A influência do teor de umidade residual na taxa de sobrevivência celular dos inóculos de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 armazenados em freezer a -20°C pode ser observada na Figura 11.

Foram armazenados inóculos cujas células foram liofilizadas em diferentes meios de suspensão. A taxa de umidade residual imediatamente após o processo de liofilização variou de 2,0 a 3,0%. Segundo HAGEN (1971) a umidade residual nunca pode ser inferior a 1%. Esta taxa pode ser facilmente obtida com a adição de 10% de sacarose ou de glicose às células que serão liofilizadas.

Após 12 meses de armazenamento, a taxa de umidade residual dos inóculos ficou entre 10 e 12%. No entanto, não houve correlação entre o teor de umidade e a taxa de sobrevivência dos inóculos. O parâmetro que determinou a taxa de sobrevivência foi, sem dúvida, o meio de suspensão das células.

Para o inóculo contendo células suspensas em meio YM padrão, o teor de umidade após 12 meses foi de 10,87% e a taxa de sobrevivência celular foi de 41,67%. Para o inóculo constituído por células liofilizadas em água destilada, o teor de umidade foi de 12,07% e a taxa de sobrevivência foi de 0,30%. Já para os inóculos suspensos em soluções de sacarose 10%, leite desnatado reconstituído 10%, dextrose 10%, NH_4NO_3 1,0% e NH_4Cl 1,0%, os teores de umidade ficaram na faixa de 11%, porém houve uma grande variação nos valores de sobrevivência obtidos para cada inóculo. Neste caso, a taxa de sobrevivência variou de 30% em inóculos suspensos em sacarose 10% para 3,9% em inóculos suspensos em solução de NH_4NO_3 1,0%.

Os resultados obtidos em termos de teor de umidade residual e taxa de sobrevivência dos inóculos armazenados à temperatura ambiente (27°C) estão ilustrados na Figura 12. Para estes inóculos, tanto os valores de sobrevivência como os de umidade foram menores que aqueles observados para os inóculos armazenados a -20°C.

Os inóculos suspensos em meio YM padrão armazenados em dessecador apresentaram 7,7% de umidade, com apenas 18,16% de sobrevivência celular. O inóculo constituído por células suspensas em água destilada apresentou um teor de umidade de 8,9%, no entanto, não houve células sobreviventes após 12 meses de manutenção à temperatura ambiente.

De acordo com FONT DE VALDÉZ e DIECKMANN (1993), a presença de glicose, maltose e de glutamato de sódio no meio de suspensão aumentou a retenção de água em todos os inóculos de bactérias lácticas liofilizados e a variação do conteúdo de umidade residual foi relacionado com o grau de afinidade do meio de suspensão para com a água durante a liofilização.

De acordo com NEI et alii (1966), quanto maior a temperatura de armazenamento e menor o conteúdo de umidade, maior o número de células injuriadas e, portanto, menor a taxa da sobrevivência. A hipótese para o mecanismo de injúria celular durante a armazenagem baseia-se nestas observações. Uma vez que a atmosfera não exerce influência sobre as células no vácuo, parece provável que somente uma pequena quantidade de água residual produza as mudanças autolíticas nas células. Na presença de ar atmosférico, as células que retêm menor taxa de umidade apresentam uma menor taxa de sobrevivência e nestes casos, a injúria deve ser ocasionada pela oxidação promovida pelo contato com o oxigênio do ar, resultando numa mudança drástica das funções celulares. Nestas condições, as células que apresentam menor teor de umidade residual são mais susceptíveis a reações com o oxigênio do que aquelas que apresentam maior teor de umidade.

Segundo os resultados de FONT DE VALDÉZ et alii (1985b), a quantidade de água remanescente após a secagem afeta não somente a viabilidade das bactérias imediatamente após a liofilização como também determina a taxa de perda de viabilidade durante o período de armazenamento. Cerca de 80% das reações fisiológicas dos microrganismos dependem da água ligada às estruturas celulares e não da água livre presente nas suspensões. O conteúdo ótimo de umidade residual está diretamente relacionado com a composição do fluido no qual o organismo foi liofilizado e com a atmosfera de armazenamento.

A água livre é eliminada por sublimação durante a liofilização primária e uma vez que as pontes de hidrogênio são relativamente fracas, uma porção de água ligada é também eliminada por evaporação no início da liofilização secundária. A maior parte da água ligada permanece no produto liofilizado devido a dificuldade em removê-la. Sob

condição de alta umidade residual, a água livre pode interagir com as proteínas celulares, resultando na perda da estrutura típica da proteína. A secagem excessiva também prejudica a sobrevivência. A alta taxa de morte celular pode estar relacionada com a eliminação das três frações de água celular: a água livre, a água intermediária e a água estrutural (BRENANN et alii, 1986; FONT DE VALDÉZ et alii, 1985 b).

Durante a etapa de armazenamento dos microrganismos, o oxigênio exerce um efeito letal sobre os microrganismos liofilizados que são rapidamente inativados. A adição de alguns compostos antes da liofilização pode eliminar o efeito do oxigênio. Dentre estes compostos, os monossacarídeos, os dissacarídeos e os sais inorgânicos são os mais importantes. No caso de sais inorgânicos, o efeito protetor deve ser dado pelo cátion. Os cátions Na^+ e Mg^{++} , fornecem maior proteção contra o oxigênio, quando comparado com os cátions Ca^{++} e NH_4^+ (LION e BERGMANN, 1961).

4.4 - Avaliação do Desempenho das Culturas Liofilizadas de *X. campestris* pv. *manihotis* N^o 280 Utilizadas como Inóculos para Produção de Goma Xantana

4.4.1 - Determinação da Curva de Crescimento da Bactéria Liofilizada

A Figura 13 exibe a curva de crescimento em meio YM padrão de *X. campestris* pv. *manihotis* n^o 280 após a liofilização. Para a determinação dos parâmetros de crescimento da bactéria foi utilizado o inóculo constituído por células produzidas e suspensas em meio YM padrão e reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10%. Este inóculo foi o que apresentou os melhores resultados de sobrevivência celular.

A bactéria liofilizada exibiu uma curva de produção de biomassa semelhante a desenvolvida pela bactéria cultivada tradicionalmente, em meio YM líquido. O crescimento de *X. campestris* pv. *manihotis* n^o 280 foi marcado por uma fase lag quase ausente. Geralmente, células liofilizadas mostram uma fase lag muito extensa quando

inoculadas diretamente no meio de cultura. Após 6 horas de cultivo já pode ser detectada a produção de biomassa celular. O ápice da fase logarítmica ocorreu com 20 horas de incubação e a fase estacionária se prolongou até 34 horas. A grande diferença observada neste caso foi a maior produção de goma xantana quando comparada com as culturas recentes. Durante o crescimento das bactérias liofilizadas, a produção de goma xantana ocorreu desde o início, aumentando rapidamente ao longo do período de incubação.

Após 24 horas de cultivo houve a produção de 1,63 g/l de células e de 1,61 g/l de goma xantana, enquanto que após 54 horas, houve a recuperação de 1,06 g/l de células e de 3,32 g/l de goma xantana. Observando novamente a Figura 3, pode-se verificar que após 24 horas de crescimento houve a produção de 1,17 g/l de células e 1,24 g/l de goma xantana, enquanto que após 54 horas de cultivo houve a recuperação de 1,12 g/l de células e 2,82 g/l de biopolímero.

Segundo JANUZEWICZ (1957) citada por HECKLY (1961) as culturas liofilizadas de *Leuconostoc mesenteroides* produziram maior quantidade de dextrana do que as culturas originais, não liofilizadas. Este fato foi atribuído à ação da liofilização que atuou como um fator seletivo, eliminando as células com baixa atividade metabólica e com baixo poder de produção de dextrana. A liofilização de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 também pode ter resultado na eliminação das células menos aptas e selecionado somente aquelas com elevada atividade metabólica e com alto poder de produção de goma xantana.

De acordo com VASHITZ e SHEINTUCH (1991) a síntese do polímero não é um processo simplesmente associado ao crescimento da célula, mas é interdependente do seu balanço energético e da formação de metabólitos celulares, principalmente dos ácidos orgânicos. Desta maneira, a conversão da glicose via ciclo dos ácidos tricarbóxicos é competitiva com a conversão da glicose para a síntese do exopolissacarídeo.

4.4.2 - Avaliação do Desempenho do Inóculo Liofilizado Comparado com Métodos Convencionais de Inoculação do Meio de Fermentação

O inóculo liofilizado utilizado neste estudo foi constituído por células produzidas e suspensas em meio YM e reidratadas com solução de leite desnatado reconstituído 10%.

Na Figura 14, as três formas de inoculação do meio de fermentação podem ser comparadas, utilizando as mesmas condições de fermentação estabelecidas por JEANES et alii (1976). Quando 1% do inóculo liofilizado foi utilizado notou-se uma sensível superioridade destas culturas quanto a produção de goma xantana em comparação com o inóculo por alçada e o inóculo líquido (5%). Em termos de produção de biomassa, o meio com menor produção foi o inoculado com as células liofilizadas, sendo que a quantidade de biomassa variou de 0,55 e 0,89 g/l. Quanto ao teor de açúcares redutores totais não consumido, o meio de fermentação inoculado com o inóculo líquido e por alçada apresentou 7,30 e 7,11 g/l de açúcares residuais, respectivamente, enquanto que para o meio inoculado com as culturas liofilizadas foi obtido 2,01 g/l de açúcares redutores totais.

Após 120 horas de fermentação, o meio inoculado com o inóculo líquido e por alçada produziu 9,4 g/l e 8,29 g/l de goma xantana, respectivamente. No entanto, a utilização do inóculo liofilizado promoveu a produção de 12,89 g/l de goma xantana. Portanto, houve um aumento de 37,13% na produção de goma xantana em relação ao inóculo líquido e um aumento de 55,49% em relação ao inóculo por alçada.

A partir destes resultados ficou comprovado que as células liofilizadas de *X. campestris* pv. *manihotis* n° 280 não apenas preservaram sua viabilidade como também mantiveram sua capacidade biológica de produção de goma xantana. É interessante notar que apesar do inóculo liofilizado produzir menor quantidade de massa celular, este inóculo produziu a maior quantidade de goma xantana em relação aos outros dois inóculos. A maior produção de goma pode ser explicada pelo fato da liofilização alterar o metabolismo das células favorecendo a produção de exopolissacarídeo em detrimento

da massa celular. Em fermentações realizadas em nossos laboratórios, utilizando bactérias do gênero *Beijerinckia* foi observado que quanto menor o número de células inoculadas, maior era a quantidade de goma produzida.

4.4.3 - Influência da Concentração do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* N^o 280 na Produção de Goma Xantana

Como pode ser observado na Figura 15 a produção de goma xantana e de biomassa celular não se relacionam diretamente com a concentração de inóculo testado. O inóculo liofilizado utilizado neste estudo foi constituído com células produzidas e suspensas em meio YM padrão e reidratadas com solução de leite desnatado reconstituído 10%.

O meio inoculado com inóculo 1% (v/v), após 120 horas de fermentação produziu 0,96 g/l de células e 10,49 g/l de goma xantana. Com inóculo 2% (v/v) foram produzidos 0,69 g/l de células e 11,14 g/l de biopolímero. Inoculando o meio de fermentação com 5% (v/v) do inóculo reidratado foram obtidos 0,42 g/l de células e 11,81 g/l de goma xantana.

Deste modo, não foi observada uma diferença significativa na quantidade de goma xantana produzida quando a concentração do inóculo variou de 1% a 5% no meio de fermentação. Por isso, a concentração de 1% de inóculo foi escolhido nos demais testes para produção de goma xantana.

4.5 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados

Os inóculos liofilizados que mostraram diferenças nos resultados em termos de viabilidade celular foram inoculados no meio de fermentação descrito por JEANES et alii (1976), sendo previamente reidratados com os melhores meios de reidratação obtidos.

Nas Tabelas 9 até 19 encontram-se os resultados obtidos com os testes de fermentação utilizando diferentes inóculos cujas células foram produzidas, suspensas e reidratadas em diversas condições. A concentração de inóculo utilizada foi de 1% (v/v).

Em linhas gerais, o desempenho destes inóculos após 120 horas de fermentação sofreu a influência dos meios de produção, de suspensão e de reidratação utilizados.

4.5.1 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas e Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios

A Tabela 9 mostra o desempenho dos inóculos liofilizados constituídos por células cultivadas e suspensas no meio YM padrão e reidratadas em diferentes meios. Em geral, estes inóculos apresentaram os melhores resultados de sobrevivência celular e de produção de goma xantana.

Quando este inóculo foi reidratado com água destilada apresentou 35,66% de sobrevivência. Após 120 horas de fermentação, produziu 0,03 g/l de célula e 10,79 g/l de goma xantana, com um rendimento de 53,9%.

O inóculo reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10% apresentou 80,00% de sobrevivência logo após a reidratação. Após o período de fermentação, houve a produção de 0,12 g/l de célula e de 12,98 g/l de goma xantana com rendimento de 64,9%.

A menor taxa de sobrevivência (33,33%) foi obtida quando o inóculo foi reidratado com solução de goma xantana 0,001%. No entanto, após 120 horas de fermentação houve uma produção de 10,71 g/l de goma, com rendimento de 53,5%.

A menor produção de biopolímero (9,87 g/l) não coincidiu com a menor taxa de sobrevivência celular (33,33%) portanto, não é possível estabelecer qualquer relação

entre taxa de recuperação celular e produção de biopolímero. No geral, houve a retenção da capacidade de produção de goma xantana pelas células liofilizadas. As células após a inoculação recuperaram rapidamente suas atividades metabólicas, crescendo normalmente, com produção normal de goma xantana.

A alta produção de goma tornou o meio viscoso, com uma pequena quantidade de massa celular. Como relatado anteriormente, meios de fermentação com elevada taxa de goma xantana não favorecem o crescimento bacteriano a partir de determinado valor de viscosidade. Segundo MORAINÉ e ROGOVIN (1966 e 1971) e SILMAN e ROGOVIN (1970), o crescimento bacteriano cessa quando a viscosidade do meio de fermentação alcança cerca de 2000 cP. Isto explica a baixa quantidade de massa celular presente no final da fermentação. O pH final do caldo de fermentação ficou em torno de 6,6.

4.5.2 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,1% de NH_4NO_3 , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios

A Tabela 10 mostra o desempenho fermentativo dos inóculos liofilizados constituídos por células produzidas em meio YM contendo 0,1% de NH_4NO_3 , suspensas em meio YM padrão e reidratados em diferentes meios. Estes inóculos também mostraram elevadas taxas de sobrevivência celular. Neste caso, para todos os inóculos reidratados com diferentes meios, a produção de goma xantana foi de aproximadamente 7 g/l, independente da taxa de sobrevivência celular.

As únicas exceções foram observadas para o inóculo reidratado com solução de sacarose 10% que apresentou 41,66% de sobrevivência inicial e 8,15 g/l de goma xantana após a fermentação e para o inóculo reidratado com solução de goma xantana 0,01% com 42,22% de células viáveis, produzindo apenas 6,56 g/l de biopolímero.

Novamente, uma alta de sobrevivência celular não implicou necessariamente numa maior produção de goma xantana pela bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* n° 280 liofilizada.

4.5.3 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 1,0% de NH₄NO₃, Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios

Na Tabela 11 estão os resultados obtidos para os inóculos constituídos por células produzidas em meio YM contendo 1,0% de NH₄NO₃ e suspensas em meio YM padrão que apresentaram uma taxa de sobrevivência mais baixa quando comparada com os inóculos produzidos com 0,1% de NH₄NO₃ (Tabela 10). Neste caso houve uma redução geral na produção de goma xantana.

O inóculo reidratado com água destilada que apresentou uma taxa inicial de 11,00% de sobrevivência, após 120 horas produziu 6,71 g/l de goma xantana, com um rendimento de 33,5%. O inóculo que produziu maior quantidade de biopolímero foi o inóculo reidratado com sacarose 10%, apresentando 34,33% de sobrevivência e 7,25 g/l de goma.

O inóculo reidratado com sacarose 1% apresentou 8,67% de sobrevivência e foi o responsável pela menor produção de goma que ficou em torno de 2,35 g/l com um rendimento de apenas 11,7%.

Pelos resultados apresentados na Tabela 11 pode-se observar que não houve relação entre a taxa de sobrevivência celular e a quantidade de goma produzida, com exceção do inóculo reidratado com solução de sacarose 10% que apresentou as maiores taxas de sobrevivência e de produção de goma xantana.

Os inóculos constituídos por células crescidas em meio contendo 0,1% de NH_4NO_3 apresentaram melhores resultados que os inóculos formados com células cultivadas em meio contendo 1,0% de NH_4NO_3 .

4.5.4 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM contendo 0,5% de NH_4Cl , suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios

Na Tabela 12 estão os resultados obtidos pelos inóculos constituídos por células produzidas em meio YM contendo 0,5% de NH_4Cl e suspensas em meio YM padrão.

Neste caso, as mais altas taxas de sobrevivência foram obtidas apenas com os inóculos reidratados com leite desnatado reconstituído 10% e com sacarose 1% que apresentaram 44,00% e 32,67% de sobrevivência, respectivamente. No entanto, estes dois inóculos produziram apenas 6,78 g/l e 6,30 g/l de goma xantana, respectivamente, enquanto que o inóculo reidratado com sacarose 5% que apresentou apenas 3,63% de sobrevivência, após 120 horas de fermentação, produziu 7,72 g/l de goma xantana, valor este o mais elevado para os inóculos obtidos nestas condições.

Comparando os inóculos reidratados com água destilada e com meio YM padrão, é possível observar que embora ambos tenham dado valores quase idênticos de sobrevivência celular, após suas inoculações em caldo de fermentação, o inóculo reidratado com água destilada produziu 0,11 g/l de células e 6,52 g/l de xantana enquanto que o inóculo reidratado com meio YM produziu 0,87 g/l de células e apenas 1,57 g/l de xantana, havendo um nítido favorecimento para a produção de células do que para a produção de goma xantana neste último caso.

4.5.5 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 1,0% de NH_4Cl , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios

A Tabela 13 mostra o desempenho dos inóculos liofilizados cujas células foram cultivadas em meio YM contendo 1,0% de NH_4Cl e suspensas em meio YM padrão. Neste caso, houve uma maior taxa de sobrevivência celular quando comparado com os resultados obtidos para os inóculos produzidos em meio YM contendo 0,5% de NH_4Cl , com exceção do inóculo reidratado com solução de sacarose 1% que não apresentou diferença significativa na taxa de viabilidade celular em ambos os meios de produção. O mesmo comportamento foi observado na produção de goma xantana.

O inóculo reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10% apresentou a mais alta taxa de sobrevivência inicial, que foi de 50,33% e após o período de fermentação, produziu 0,28 g/l de célula e 7,19 g/l de goma com um rendimento de 35,9%.

Quando o inóculo foi reidratado com solução de goma xantana 0,01% obteve-se o menor índice de recuperação celular. A taxa de sobrevivência foi de somente 2,66%. No entanto, quando este inóculo reidratado foi inoculado no meio de fermentação, houve a produção de 7,57 g/l de biopolímero, superando a produção alcançada pelo inóculo que apresentou a máxima viabilidade celular.

4.5.6 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM contendo 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios

A Tabela 14 mostra o desempenho surpreendente dos inóculos cujas células foram cultivadas em meio contendo 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e suspensas em meio YM padrão. Houve um grande contraste entre as taxas mínimas de sobrevivência obtidas

com a elevada produção de goma xantana, quando comparadas com os demais tratamentos.

O inóculo que produziu a maior quantidade de goma xantana foi reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10%. Este inóculo apresentou somente 3,80% de sobrevivência celular, enquanto que a produção final de goma xantana foi de 11,97 g/l e de células foi de 0,71 g/l. O inóculo reidratado com sacarose 20% apresentou a mais alta taxa de sobrevivência (20,67%) mas não exibiu o melhor desempenho em termos de produção de goma xantana que foi de 11,30 g/l.

Valores similares foram obtidos com inóculos reidratados com sacarose 1; 5 e 10% que apresentaram taxas de sobrevivência igual a 3,13; 2,23 e 2,33% e produção de goma de 10,92; 11,19 e 11,16 g/l, respectivamente. Apenas os inóculos reidratados com água destilada e solução de goma xantana 0,001% e 0,01% produziram entre 5 e 7 g/l de biopolímero. O inóculo reidratado com o meio YM padrão forneceu apenas 0,53% de células viáveis e produziu 8,89 g/l de goma xantana após o período de fermentação.

4.5.7 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas e Reidratados em Diferentes Meios

As Tabelas 15, 16 e 17 exibem o desempenho de inóculos liofilizados constituídos por células suspensas em água destilada, em solução de sacarose 10% e em solução de leite desnatado reconstituído 10%, respectivamente.

4.5.7.1 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Água Destilada e Reidratados em Diferentes Meios

Na Tabela 15 encontram-se os resultados obtidos para os inóculos liofilizados em água destilada. A baixa taxa de sobrevivência celular não afetou a produção de goma. O inóculo reidratado com água destilada que apresentou a mais baixa taxa de sobrevivência celular (0,03%) produziu 7,77 g/l de goma xantana, equivalente a um rendimento de 38,8%.

Comparativamente, o inóculo reidratado com solução de sacarose 10% forneceu a segunda maior taxa de sobrevivência (14,67%). Porém, a produção de goma xantana em meio de fermentação inoculado com estas células foi de 7,77 g/l, ou seja, foi idêntica à produção de goma xantana propiciada pelo inóculo que apresentou somente 0,03% de células viáveis.

4.5.7.2 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Sacarose 10% e Reidratados em Diferentes Meios

A Tabela 16 mostra o desempenho dos inóculos constituídos por células suspensas em solução de sacarose 10%. Após o período de fermentação, os inóculos produziram acima de 10 g/l de goma, com rendimento superior a 50%, independente do fluido de reidratação usado e da taxa de sobrevivência obtida.

Destaque deve ser feito para o inóculo reidratado com sacarose 40% que apresentou a mais baixa taxa de sobrevivência e a mais alta produção de goma. Apenas 15,33% de células viáveis produziram 11,24 g/l de goma, apresentando um rendimento de 56,2%.

O inóculo reidratado com solução de leite desnatado reconstituído 10% que apresentou a maior taxa de sobrevivência celular (79,33%) produziu 10,53 g/l de biopolímero, com um rendimento de 52,6%. Inóculos com taxa de recuperação celular muito inferior a 79% produziram igual rendimento de goma xantana no final da fermentação.

4.5.7.3 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10% e Reidratados em Diferentes Meios

Os resultados obtidos com a inoculação das culturas liofilizadas em leite desnatado reconstituído 10% no meio de fermentação estão expostos na Tabela 17. A diferença mais marcante deste tratamento em comparação com os demais vistos anteriormente está na elevada produção de massa celular durante a fermentação.

O inóculo suspenso e reidratado em solução de leite desnatado reconstituído 10% que forneceu a maior taxa de sobrevivência celular (59,67%) produziu apenas 6,07 g/l de goma xantana e 1,25 g/l de biomassa celular, após 120 horas de fermentação. A maior produção de goma xantana foi obtida com o inóculo reidratado com solução de sacarose 10%. Neste caso, houve a sobrevivência de 54,00% das células e a produção de 9,84 g/l de exopolissacarídeo e 0,19 g/l de células. Deste modo, a mesma concentração de células viáveis iniciais exibiu um comportamento muito diferenciado ao longo da fermentação com relação a produção de goma xantana, uma vez que uma quantidade 10% maior de células viáveis produziram cerca de 40% menos de biopolímero.

4.5.7.4 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação, Sem Agitação

A Tabela 18 mostra o desempenho fermentativo dos inóculos suspensos em solução de leite desnatado reconstituído 10% quando inoculados diretamente no meio de fermentação, porém, sem agitação.

Na fermentação sem agitação, quase não houve produção de goma xantana. Contudo, houve máxima produção de células de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280. Após 120 horas de fermentação, o inóculo reidratado com água destilada produziu 6,87 g/l de células e 1,50 g/l de goma xantana, com rendimento de 7,5%. O inóculo reidratado com leite desnatado reconstituído 10% apresentou a maior taxa de sobrevivência (59,67%) e produziu 2,29 g/l de células e 2,69 g/l de goma xantana. O inóculo reidratado com sacarose 10% produziu 2,36 g/l de células e 3,37 g/l de goma xantana, com o maior rendimento em termos de goma xantana que foi de 16,83%. Quando reidratado com meio YM padrão, apesar de apresentar 45% de células viáveis e produzir 1,86 g/l de células após a fermentação, não produziu goma xantana.

Os resultados obtidos comprovam a importância da agitação no processo de produção de goma xantana. Na ausência de agitação, há um desvio quase total do metabolismo exclusivamente para a formação de biomassa celular.

4.5.7.5 - Testes de Fermentação Utilizando Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Recuperadas na Fase de Declínio Celular, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10% e Reidratados em Diferentes Meios

A Tabela 19 mostra os resultados obtidos com a utilização de inóculos constituídos por células recuperadas após 72 horas de incubação, ou seja, após atingirem

a fase de morte celular. Os resultados referentes à produção de goma xantana foram menores embora as taxas de sobrevivência dos inóculos liofilizados tenham sido muito reduzidas, quando comparados aos dos inóculos formados por células recuperadas na fase estacionária de crescimento (Tabela 9). O inóculo reidratado com leite desnatado reconstituído 10% apresentou a maior taxa de sobrevivência (50,00%) e produziu 0,06 g/l de células e 7,93 g/l de goma xantana. O inóculo reidratado com solução de goma xantana 0,001% que apresentou uma taxa de sobrevivência de apenas 4,46% produziu 0,03 g/l de célula e 7,70 g/l de goma xantana no final da fermentação, com rendimento igual 38,5%.

Surpreendentemente, inóculos com baixas taxas de sobrevivência celular foram eficientes na produção de goma xantana, indicando que a concentração inicial de células viáveis no meio de fermentação não foi o parâmetro mais importante no processo para a produção do biopolímero.

De modo geral, pode-se observar através dos resultados obtidos o efeito marcante do fluido de reidratação apenas na viabilidade do inóculo liofilizado. Na produção de goma, se é que houve a influência do meio de reidratação, foi quase imperceptível. Mesmo os inóculos que apresentaram uma baixa porcentagem de células viáveis produziram quase que a mesma quantidade de goma xantana se comparado com inóculos com altas taxas de sobrevivência.

Estes resultados estão de acordo com a teoria de BOZOGLU et alii (1987) de que a liofilização pode ser considerada um sucesso se um número de 0,1% de células viáveis reconstituídas for capaz de produzir uma nova cultura com as mesmas características da cultura original.

Os efeitos interativos dos inúmeros parâmetros que determinam a taxa de sobrevivência do inóculo liofilizado e o seu desempenho na fermentação não podem ser estudados separadamente. A associação das melhores condições de produção, de suspensão e de reidratação foi a responsável pela maior taxa de sobrevivência e pela maior produção de goma xantana. Para *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 os melhores

resultados em termos de produção de goma aliado à sobrevivência celular foram observados com a utilização do meio YM padrão como meio de produção e de suspensão celular e da solução de leite desnatado reconstituído 10% como meio de reidratação.

De modo geral, as condições que danificam as células durante seu cultivo somam-se às operações letais para a obtenção dos inóculos liofilizados, resultando em taxas de viabilidade quase nulas.

4.6 - Influência de Diferentes Métodos de Preservação na Viabilidade de *X. campestris* pv. *manihotis* Linhagem N° 280

A influência dos métodos de preservação na viabilidade da bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 pode ser observada na Tabela 20.

A utilização de óleo mineral em culturas crescidas em meio ágar inclinado não foi um método eficiente para a preservação desta bactéria. Após 6 meses de armazenamento, as culturas perderam totalmente a viabilidade. Houve uma diferença quanto ao meio utilizado para o crescimento da cultura. O meio NYGB ágar foi menos adequado para a preservação do que o meio YM ágar. De acordo com a literatura, o meio NYGB é indicado para o cultivo e o armazenamento de culturas que produzem polissacarídeos, pois inibe a sua produção (MANIATIS et alii, 1982). Neste meio ocorre um aumento na produção de células e uma diminuição na produção de goma xantana. No entanto, para *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280, o cultivo após três meses foi completamente inviabilizado, devido a perda total da cultura assim preservada. Em meio YM ágar com adição de óleo mineral, após 3 meses de armazenamento, houve a recuperação de apenas $3,30 \times 10^5$ UFC/ml e após 6 meses a cultura estava totalmente inativada.

O emprego de glicerol 15% em culturas de *X. campestris* pv. *manihotis* n° 280 cultivadas em meio YM padrão líquido foi um método adequado, uma vez que foram obtidas $2,20 \times 10^8$ UFC/ml após 12 meses de armazenamento da cultura a -20°C .

Suspensões congeladas de células também foi uma técnica viável de preservação dos inóculos. Foram obtidas cerca de 10^8 a 10^9 UFC/ml durante o período de armazenamento avaliado. Das soluções testadas, o congelamento em solução de leite desnatado reconstituído 10% foi o que apresentou os melhores resultados, fornecendo $2,31 \times 10^9$ UFC/ml após 12 meses. Inóculos congelados em água destilada após 12 meses de armazenamento forneceram somente $1,87 \times 10^6$ UFC/ml, reforçando a importância da necessidade de adição de um agente crioprotetor ao meio de suspensão das células.

Comparando o método de preservação por congelamento das células em solução de leite desnatado reconstituído 10% com o método por liofilização em meio YM padrão e manutenção a -20°C , verifica-se que após 12 meses a viabilidade das células apenas congeladas ($2,31 \times 10^9$ UFC/ml) foi ligeiramente maior que as células liofilizadas ($1,25 \times 10^9$ UFC/ml). Este fato indica que no processo de liofilização ocorrem danos irreversíveis nas células bacterianas.

Apesar dos melhores resultados apontarem como melhor método de preservação o congelamento das células em solução de leite desnatado reconstituído a 10%, a combinação de custo com qualidade leva a propor como melhor método de preservação das culturas de *X. campestris* pv. *manihotis* n° 280 a liofilização com posterior armazenamento em freezer a -20°C . Os inóculos contendo células produzidas e liofilizadas em meio YM padrão armazenadas a -20°C , quando reidratados com solução de leite desnatado reconstituído 10%, apresentaram $1,25 \times 10^9$ UFC/ml, após 12 meses de armazenamento. Entretanto, quando estes inóculos foram armazenados à temperatura ambiente (27°C) houve uma perda significativa do número de células viáveis ($1,85 \times 10^8$ UFC/ml).

O inóculo original de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 adquirido no Instituto Biológico apresentou $4,2 \times 10^6$ UFC/ml. Desta forma, através da metodologia desenvolvida neste estudo para a produção e preservação dos inóculos liofilizados foi observado um maior número de células viáveis. De acordo com as condições utilizadas houve a recuperação de até $2,41 \times 10^9$ UFC/ml (Tabela 1). Considerando que a cultura foi liofilizada pela segunda vez, a taxa de células viáveis foi excelente, superando a cultura original. As condições de preparo do inóculo liofilizado pelo Instituto Biológico não foram fornecidas.

TABELA 1 - Influência do Meio de Crescimento Celular na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280.

Meio de Produção Celular	Meio de Suspensão	Meio de Reidratação	UFC/ml	Sobrevivência (%)
YM sem sacarose	YM	Leite Desnat.10%	$5,00 \times 10^6$	0,16
YM Padrão	YM	Leite Desnat.10%	$2,41 \times 10^9$	80,33
YM + 6% sacarose	YM	Leite Desnat.10%	$2,36 \times 10^9$	78,67
YM + 0,1% NH_4NO_3	YM	Leite Desnat.10%	$1,70 \times 10^9$	56,67
YM + 0,5% NH_4NO_3	YM	Leite Desnat.10%	$2,39 \times 10^9$	79,67
YM + 1,0% NH_4NO_3	YM	Leite Desnat.10%	$5,50 \times 10^8$	18,33
YM + 0,1% NH_4Cl	YM	Leite Desnat.10%	$7,80 \times 10^8$	26,00
YM + 0,5% NH_4Cl	YM	Leite Desnat.10%	$1,32 \times 10^9$	44,00
YM + 1,0% NH_4Cl	YM	Leite Desnat.10%	$1,51 \times 10^9$	50,33
YM + 0,01% MgSO_4	YM	Leite Desnat.10%	$1,14 \times 10^8$	3,80
YM + 0,1% MgSO_4	YM	Leite Desnat.10%	$1,87 \times 10^8$	6,23
YM + 0,5% K_2HPO_4	YM	Leite Desnat.10%	$1,16 \times 10^8$	3,86
YM + 1,0% K_2HPO_4	YM	Leite Desnat.10%	$3,60 \times 10^8$	12,00
YM + 1,0% Lecitina	YM	Leite Desnat.10%	$5,20 \times 10^8$	17,33

A reidratação do inóculo liofilizado ocorreu por 10 minutos à temperatura ambiente.

A concentração inicial de células antes da liofilização foi de $3,0 \times 10^9$ UFC/ml.

Leite Desnat.: Solução de Leite Desnatado Reconstituído.

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/ml.

Sobrevivência (%): Porcentagem de células viáveis após a liofilização.

TABELA 2 - Influência do Meio de Suspensão Celular na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280.

Meio de Suspensão Celular	Meio de Produção	Meio de Reidratação	UFC/ml	Sobrevivência (%)
Sacarose 40%	YM	Leite Desnat. 10%	$3,10 \times 10^5$	0,01
MgSO ₄ 0,01%	YM	Leite Desnat. 10%	$1,08 \times 10^8$	3,60
Água Destilada	YM	Leite Desnat. 10%	$1,92 \times 10^8$	6,40
YM + 0,1% Lecitina	YM	Leite Desnat. 10%	$3,40 \times 10^8$	11,33
Solução Salina 0,9%	YM	Leite Desnat. 10%	$3,40 \times 10^8$	11,33
NH ₄ NO ₃ 1%	YM	Leite Desnat. 10%	$5,90 \times 10^8$	19,67
NH ₄ Cl 1%	YM	Leite Desnat. 10%	$6,20 \times 10^8$	20,67
Glicerol 10%	YM	Leite Desnat. 10%	$7,60 \times 10^8$	25,33
Dextrose 10%	YM	Leite Desnat. 10%	$7,90 \times 10^8$	26,33
Xantana 0,1%	YM	Leite Desnat. 10%	$8,70 \times 10^8$	29,00
Sacarose 1%	YM	Leite Desnat. 10%	$9,80 \times 10^8$	32,67
Xantana 0,001%	YM	Leite Desnat. 10%	$1,00 \times 10^9$	33,33
Peptona 10%	YM	Leite Desnat. 10%	$1,01 \times 10^9$	33,67
Xantana 0,01%	YM	Leite Desnat. 10%	$1,13 \times 10^9$	37,67
Leite Desnat. 10%	YM	Leite Desnat. 10%	$1,79 \times 10^9$	59,67
Sacarose 10%	YM	Leite Desnat. 10%	$2,38 \times 10^9$	79,33
YM Padrão	YM	Leite Desnat. 10%	$2,46 \times 10^9$	82,00

A reidratação do inóculo liofilizado ocorreu por 10 minutos à temperatura ambiente.

A concentração inicial de células antes da liofilização foi de $3,0 \times 10^9$ UFC/ml.

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/ml.

Sobrevivência (%): Porcentagem de células viáveis após a liofilização.

TABELA 3 - Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 Produzido e Suspenso em Meio YM Padrão.

Meio de Reidratação Celular	Meio de Produção e Suspensão Celular	UFC/ml	Sobrevivência (%)
Lactose 10%	YM Padrão	$3,50 \times 10^8$	11,66
Solução Salina 0,9%	YM Padrão	$4,70 \times 10^8$	15,67
Sacarose 60%	YM Padrão	$6,40 \times 10^8$	21,33
Dextrose 10%	YM Padrão	$7,10 \times 10^8$	23,66
Xantana 0,001%	YM Padrão	$1,00 \times 10^9$	33,33
Água Destilada	YM Padrão	$1,07 \times 10^9$	35,66
Xantana 0,01%	YM Padrão	$1,11 \times 10^9$	37,00
Sacarose 40%	YM Padrão	$1,49 \times 10^9$	49,67
Sacarose 1%	YM Padrão	$1,66 \times 10^9$	55,33
Sacarose 5%	YM Padrão	$1,78 \times 10^9$	59,33
YM Padrão	YM Padrão	$1,82 \times 10^9$	60,67
Sacarose 20%	YM Padrão	$1,90 \times 10^9$	63,33
Sacarose 10%	YM Padrão	$2,05 \times 10^9$	68,33
Leite Desnat. 10%	YM Padrão	$2,40 \times 10^9$	80,00

A reidratação do inóculo liofilizado ocorreu por 10 minutos à temperatura ambiente.

A concentração inicial de células antes da liofilização foi de $3,0 \times 10^9$ UFC/ml.

Leite Desnat.: Solução de Leite Desnatado Reconstituído.

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/ml.

Sobrevivência (%): Porcentagem de células viáveis após a liofilização.

TABELA 4 - Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de NH_4NO_3 e Liofilizadas em Meio YM Padrão.

Meio de Reidratação Celular	Meio de Produção Celular: YM + NH_4NO_3 0,5%		Meio de Produção Celular: YM + NH_4NO_3 1,0%	
	UFC/ml	Sobreviv.(%)	UFC/ml	Sobreviv.(%)
Água Destilada	$3,50 \times 10^8$	11,67	$3,30 \times 10^8$	11,00
YM Padrão	$3,10 \times 10^8$	10,33	$1,40 \times 10^8$	4,67
Leite Desnatado 10%	$2,25 \times 10^9$	75,00	$5,50 \times 10^8$	18,33
Sacarose 1%	$7,10 \times 10^8$	23,67	$2,60 \times 10^8$	8,67
Sacarose 5%	$7,20 \times 10^8$	24,00	$6,30 \times 10^8$	21,00
Sacarose 10%	$8,40 \times 10^8$	28,00	$1,03 \times 10^9$	34,33
Sacarose 20%	$4,30 \times 10^8$	14,33	$6,90 \times 10^8$	23,00
Sacarose 40%	$1,28 \times 10^8$	4,26	$1,00 \times 10^7$	0,33
Xantana 0,001%	$6,50 \times 10^8$	21,67	$1,50 \times 10^8$	5,00
Xantana 0,01%	$4,40 \times 10^8$	14,67	$7,20 \times 10^8$	24,00

A reidratação do inóculo liofilizado ocorreu por 10 minutos à temperatura ambiente.

A concentração inicial de células antes da liofilização foi de $3,0 \times 10^9$ UFC/ml.

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/ml.

Sobrevivência (%): Porcentagem de células viáveis após a liofilização.

TABELA 5 - Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de NH₄Cl e Liofilizadas em Meio YM Padrão.

Meio de Reidratação Celular	Meio de Produção Celular: YM + NH ₄ Cl 0,5%		Meio de Produção Celular: YM + NH ₄ Cl 1,0%	
	UFC/ml	Sobrevivência (%)	UFC/ml	Sobrevivência (%)
Água Destilada	2,85 x 10 ⁸	9,50	4,60 x 10 ⁸	15,33
YM Padrão	2,80 x 10 ⁸	9,33	1,11 x 10 ⁹	37,00
Leite Desnatado 10%	1,32 x 10 ⁹	44,00	1,51 x 10 ⁹	50,33
Sacarose 1%	9,80 x 10 ⁸	32,67	9,90 x 10 ⁸	33,00
Sacarose 5%	1,09 x 10 ⁸	3,63	4,20 x 10 ⁸	14,00
Sacarose 10%	5,90 x 10 ⁸	19,67	1,45 x 10 ⁹	48,33
Sacarose 20%	1,90 x 10 ⁸	6,33	9,70 x 10 ⁸	32,33
Sacarose 40%	3,40 x 10 ⁷	1,13	5,40 x 10 ⁸	18,00
Xantana 0,001%	2,60 x 10 ⁸	8,67	1,12 x 10 ⁹	37,33
Xantana 0,01%	2,25 x 10 ⁸	7,50	8,00 x 10 ⁷	2,66

A reidratação do inóculo liofilizado ocorreu por 10 minutos à temperatura ambiente.

A concentração inicial de células antes da liofilização foi de 3,0 x 10⁹ UFC/ml.

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/ml.

Sobrevivência (%): Porcentagem de células viáveis após a liofilização.

TABELA 6 - Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* n° 280 Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e Liofilizadas em Meio YM Padrão.

Meio de Reidratação Celular	Meio de Produção Celular: YM + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01%		Meio de Produção Celular: YM + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1%	
	UFC/ml	Sobrevivência (%)	UFC/ml	Sobrevivência (%)
Água Destilada	$1,71 \times 10^8$	5,70	$2,50 \times 10^7$	0,83
YM Padrão	$1,60 \times 10^7$	0,53	$1,00 \times 10^7$	0,33
Leite Desnatado 10%	$1,14 \times 10^8$	3,80	$1,87 \times 10^8$	6,23
Sacarose 1%	$9,40 \times 10^7$	3,13	$1,03 \times 10^7$	0,34
Sacarose 5%	$6,70 \times 10^7$	2,23	$1,80 \times 10^7$	0,60
Sacarose 10%	$7,00 \times 10^7$	2,33	$2,30 \times 10^8$	7,66
Sacarose 20%	$6,20 \times 10^8$	20,67	$1,05 \times 10^6$	0,04
Sacarose 40%	$1,87 \times 10^8$	6,23	$1,00 \times 10^6$	0,03
Xantana 0,001%	$3,40 \times 10^7$	1,13	$3,00 \times 10^7$	1,00
Xantana 0,01%	$2,21 \times 10^7$	0,73	$2,80 \times 10^6$	0,09

A reidratação do inóculo liofilizado ocorreu por 10 minutos à temperatura ambiente.

A concentração inicial de células antes da liofilização foi de $3,0 \times 10^9$ UFC/ml.

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/ml.

Sobrevivência (%): Porcentagem de células viáveis após a liofilização.

TABELA 7 - Influência do Meio de Reidratação na Viabilidade do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 Constituído por Células Produzidas em Meio YM Contendo Diferentes Concentrações de Sacarose e Liofilizadas em Meio YM Padrão.

Meio de Reidratação Celular	Meio de Produção: YM Sem Sacarose		Meio de Produção: YM Padrão		Meio de Produção: YM + 6% Sacarose	
	UFC/ml	Sobrev.(%)	UFC/ml	Sobrev.(%)	UFC/ml	Sobrev.(%)
Água Destilada	1,20 x 10 ⁶	0,04	1,07 x 10 ⁹	35,66	1,53 x 10 ⁹	51,00
YM Padrão	3,10 x 10 ⁶	0,10	1,82 x 10 ⁹	60,67	1,35 x 10 ⁹	45,00
Leite Desnatado 10%	5,00 x 10 ⁶	0,16	2,40 x 10 ⁹	80,00	2,18 x 10 ⁹	72,67
Sacarose 1%	4,70 x 10 ⁵	0,01	1,66 x 10 ⁹	59,33	1,70 x 10 ⁹	56,67
Sacarose 5%	6,80 x 10 ⁵	0,03	1,78 x 10 ⁸	55,33	8,70 x 10 ⁸	29,00
Sacarose 10%	8,00 x 10 ⁶	0,26	2,05 x 10 ⁹	68,33	1,50 x 10 ⁹	50,00
Sacarose 20%	5,00 x 10 ⁵	0,02	1,90 x 10 ⁹	63,33	1,48 x 10 ⁹	49,33
Sacarose 40%	3,10 x 10 ⁵	0,01	1,49 x 10 ⁹	49,67	1,21 x 10 ⁹	40,33
Xantana 0,001%	8,20 x 10 ⁵	0,03	1,00 x 10 ⁹	33,33	9,40 x 10 ⁸	31,33
Xantana 0,01%	7,10 x 10 ⁵	0,02	1,11 x 10 ⁹	37,00	1,52 x 10 ⁹	50,67

A reidratação do inóculo liofilizado ocorreu por 10 minutos à temperatura ambiente.

A concentração inicial de células antes da liofilização foi de 3,0 x 10⁹ UFC/ml.

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/ml.

Sobrevivência (%): Porcentagem de células viáveis após a liofilização.

TABELA 8 - Influência dos Meios de Reidratação e de Suspensão na Viabilidade dos Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 Constituídos por Células Cultivadas em Meio YM Padrão.

Meio de Reidratação	Meio de Suspensão: Água Destilada		Meio de Suspensão: Leite Desnatado 10%		Meio de Suspensão: Sacarose 10%	
	UFC/ml	Sobrev.(%)	UFC/ml	Sobrev.(%)	UFC/ml	Sobrev.(%)
Água Destilada	1,10 x 10 ⁶	0,03	5,10 x 10 ⁸	17,00	1,05 x 10 ⁹	35,00
YM Padrão	2,04 x 10 ⁸	6,80	1,35 x 10 ⁹	45,00	1,46 x 10 ⁹	48,67
Leite Desnatado 10%	1,92 x 10 ⁸	6,40	1,79 x 10 ⁹	59,67	2,38 x 10 ⁹	79,33
Sacarose 1%	1,73 x 10 ⁸	5,77	1,05 x 10 ⁹	35,00	7,80 x 10 ⁸	26,00
Sacarose 5%	1,55 x 10 ⁸	5,17	1,30 x 10 ⁹	43,33	9,60 x 10 ⁸	32,00
Sacarose 10%	4,40 x 10 ⁸	14,67	1,62 x 10 ⁹	54,00	2,20 x 10 ⁹	73,33
Sacarose 20%	6,80 x 10 ⁸	22,67	1,57 x 10 ⁹	52,33	1,38 x 10 ⁹	46,00
Sacarose 40%	6,50 x 10 ⁷	2,17	9,60 x 10 ⁸	32,00	4,60 x 10 ⁸	15,33
Xantana 0,001%	3,90 x 10 ⁸	13,00	1,15 x 10 ⁹	38,33	1,09 x 10 ⁹	36,33
Xantana 0,01%	2,77 x 10 ⁸	9,23	8,70 x 10 ⁸	29,00	9,10 x 10 ⁸	30,33

A reidratação do inóculo liofilizado ocorreu por 10 minutos à temperatura ambiente.

A concentração inicial de células antes da liofilização foi de 3,0 x 10⁹ UFC/ml.

UFC/ml: Unidade Formadora de Colônia/ml.

Sobrevivência (%): Porcentagem de células viáveis após a liofilização.

TABELA 9 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas e Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	35,66	6,65	1,30	0,03	10,79	53,9
YM Padrão	60,67	6,68	1,51	0,03	11,17	55,9
Leite Desnat 10%	80,00	6,59	1,35	0,12	12,98	64,9
Sacarose 1%	59,33	6,68	0,86	0,19	10,95	54,7
Sacarose 5%	55,33	6,68	0,81	0,03	10,61	53,0
Sacarose 10%	68,33	6,64	1,40	0,01	12,89	64,4
Sacarose 20%	63,33	6,64	1,49	0,01	11,94	59,7
Sacarose 40%	49,67	6,67	0,95	0,01	10,12	50,6
Xantana 0,001%	33,33	6,65	1,26	0,01	10,71	53,5
Xantana 0,01%	37,00	6,62	1,81	0,01	9,87	49,4

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 10 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,1% de NH_4NO_3 , Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	42,50	5,91	1,16	0,06	7,56	37,8
YM Padrão	37,50	6,10	1,36	0,12	7,39	37,0
Leite Desnat 10%	47,22	6,19	1,21	0,13	7,50	37,5
Sacarose 1%	60,55	5,81	1,06	0,08	7,23	36,1
Sacarose 5%	24,16	5,84	1,25	0,07	7,55	37,8
Sacarose 10%	41,66	5,91	1,08	0,08	8,15	40,7
Sacarose 20%	41,11	6,68	2,91	1,15	7,46	37,3
Sacarose 40%	33,61	5,67	1,09	0,11	7,83	39,1
Xantana 0,001%	26,11	5,96	1,11	0,09	7,34	36,7
Xantana 0,01%	42,22	5,24	1,16	0,17	6,56	32,8

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 11 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 1,0% de NH_4NO_3 , Suspensas em Meio YM Padrão, Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	11,00	5,97	1,39	0,20	6,71	33,5
YM Padrão	4,67	6,23	2,46	0,65	5,93	29,6
Leite Desnat 10%	18,33	6,18	4,81	0,55	6,87	34,4
Sacarose 1%	8,67	6,83	5,07	1,21	2,35	11,7
Sacarose 5%	21,00	6,00	1,94	0,23	6,46	32,3
Sacarose 10%	34,33	5,74	3,27	0,13	7,25	36,3
Sacarose 20%	23,00	5,97	8,37	0,26	4,52	22,6
Sacarose 40%	0,33	5,81	5,91	0,36	6,85	34,2
Xantana 0,001%	5,00	5,96	5,17	0,48	6,49	32,5
Xantana 0,01%	24,00	6,15	6,65	1,18	3,54	17,7

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 12 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,5% de NH₄Cl, Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	9,50	6,27	3,22	0,11	6,52	32,6
YM Padrão	9,33	6,25	9,61	0,87	1,57	7,8
Leite Desnat 10%	44,00	6,19	2,98	0,53	6,78	33,9
Sacarose 1%	32,67	6,11	3,33	0,73	6,30	31,5
Sacarose 5%	3,63	6,24	2,17	0,05	7,72	38,6
Sacarose 10%	19,67	6,23	10,71	0,78	2,16	10,8
Sacarose 20%	6,33	6,00	3,28	0,02	7,21	36,1
Sacarose 40%	1,13	6,23	11,63	0,98	1,43	7,1
Xantana 0,001%	8,67	6,35	5,02	0,51	5,14	25,7
Xantana 0,01%	7,50	6,27	3,68	0,20	6,63	33,1

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 13 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 1,0% de NH₄Cl, Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	15,33	6,20	1,09	0,18	7,35	36,7
YM Padrão	37,00	6,21	1,01	0,12	7,31	36,6
Leite Desnat 10%	50,33	6,37	1,19	0,28	7,19	35,9
Sacarose 1%	33,00	6,20	1,16	0,18	7,45	37,2
Sacarose 5%	14,00	6,14	1,17	0,13	6,59	33,0
Sacarose 10%	48,33	6,08	1,17	0,18	6,64	33,1
Sacarose 20%	32,33	6,04	1,17	0,10	7,62	38,1
Sacarose 40%	18,00	5,79	1,66	0,30	7,57	37,9
Xantana 0,001%	37,33	6,26	1,02	0,10	7,22	36,1
Xantana 0,01%	2,66	6,16	1,18	0,08	7,57	37,9

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 14 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Contendo 0,01% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratados em Diferentes Meios, Quando Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	5,70	6,88	3,45	0,56	6,67	33,4
YM Padrão	0,53	6,81	2,00	0,12	8,89	44,4
Leite Desnat 10%	3,80	7,01	2,71	0,71	11,97	59,8
Sacarose 1%	3,13	6,43	1,10	0,04	10,92	54,6
Sacarose 5%	2,23	6,49	1,15	0,06	11,19	55,9
Sacarose 10%	2,33	6,45	1,21	0,05	11,16	55,8
Sacarose 20%	20,67	6,43	1,07	0,06	11,30	56,5
Sacarose 40%	6,23	6,38	1,11	0,07	11,18	55,9
Xantana 0,001%	1,13	6,30	2,54	0,12	7,00	34,9
Xantana 0,01%	0,73	6,57	4,61	1,24	5,81	29,0

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 15 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM, Suspensas em Água Destilada, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	0,03	6,71	1,12	0,11	7,77	38,8
YM Padrão	6,80	6,69	1,74	0,06	7,36	36,8
Leite Desnat 10%	6,40	6,71	1,11	0,16	7,51	37,5
Sacarose 1%	5,77	6,74	1,11	0,10	8,11	40,6
Sacarose 5%	5,17	6,68	1,15	0,05	7,35	36,8
Sacarose 10%	14,67	6,70	1,16	0,07	7,77	38,8
Sacarose 20%	22,67	6,62	1,11	0,07	8,02	40,1
Sacarose 40%	2,17	6,57	1,44	0,02	7,72	38,6
Xantana 0,001%	13,00	6,68	1,11	0,03	7,30	36,5
Xantana 0,01%	9,23	6,68	1,22	0,03	7,53	37,7

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 16 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM, Suspensas em Solução de Sacarose 10%, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo(%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	35,00	5,80	2,35	0,08	10,47	52,3
YM Padrão	48,67	5,84	2,28	0,09	10,59	52,9
Leite Desnat 10%	79,33	6,10	2,34	0,09	10,53	52,6
Sacarose 1%	26,00	5,80	2,08	0,04	10,52	52,6
Sacarose 5%	32,00	5,79	2,31	0,06	10,29	51,4
Sacarose 10%	73,33	5,75	2,31	0,05	10,60	53,0
Sacarose 20%	46,00	5,82	2,41	0,06	10,85	54,3
Sacarose 40%	15,33	5,66	2,72	0,05	11,24	56,2
Xantana 0,001%	36,33	5,85	2,23	0,06	10,52	52,6
Xantana 0,01%	30,33	5,91	2,26	0,07	10,69	53,5

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 17 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%, Reidratados em Diferentes Meios de Reidratação e Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	17,00	6,32	2,82	1,29	5,57	27,9
YM Padrão	45,00	6,31	1,59	1,19	6,06	30,3
Leite Desnat 10%	59,67	6,30	2,62	1,25	6,07	30,3
Sacarose 1%	35,00	6,24	2,51	1,33	5,99	30,0
Sacarose 5%	43,33	6,28	2,37	1,20	5,97	29,8
Sacarose 10%	54,00	6,12	2,26	0,19	9,84	49,2
Sacarose 20%	52,33	6,23	4,16	1,06	6,69	33,4
Sacarose 40%	32,00	5,95	2,25	0,81	6,23	31,2
Xantana 0,001%	38,33	6,17	2,43	1,06	5,93	29,7
Xantana 0,01%	29,00	6,18	2,48	0,74	6,36	31,8

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 18 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Padrão, Suspensas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação, Sem Agitação.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	17,00	7,12	0,54	6,87	1,50	7,5
YM Padrão	45,00	6,38	6,52	1,86	0	0
Leite Desnat 10%	59,67	6,67	3,55	2,29	2,69	13,4
Sacarose 1%	35,00	6,69	3,22	2,23	3,15	15,8
Sacarose 5%	43,33	6,71	3,31	2,32	2,55	12,8
Sacarose 10%	54,00	6,68	3,84	2,36	3,37	16,8
Sacarose 20%	52,33	6,67	3,51	2,22	2,90	14,5
Sacarose 40%	32,00	6,74	6,34	2,24	1,41	7,1
Xantana 0,001%	38,33	6,68	4,52	2,38	2,69	13,4
Xantana 0,01%	29,00	6,70	4,31	2,24	1,59	7,9

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C, sem agitação. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 19 - Avaliação do Desempenho dos Inóculos Liofilizados Constituídos por Células Produzidas em Meio YM Recuperadas Após 72 horas de Incubação (fase de declínio celular) e Suspensas em Meio YM Padrão, Reidratados em Diferentes Meios e Inoculados em Meio de Fermentação para a Produção de Goma Xantana.

Meio de Reidratação Celular	Viabilidade Celular do Inóculo (%)	pH Final do Caldo	Açúcares Redutores Totais (g/l)	Massa Celular Seca (g/l)	Goma Xantana (g/l)	Rendimento de Goma Xantana (%)
Água Destilada	28,33	5,75	2,30	0,03	7,92	39,6
YM Padrão	9,46	5,75	2,49	0,02	7,59	37,9
Leite Desnat 10%	50,00	5,92	2,69	0,06	7,93	39,6
Sacarose 1%	15,33	5,64	2,66	0,03	7,82	39,1
Sacarose 5%	6,96	5,62	2,77	0,04	7,49	37,4
Sacarose 10%	8,80	5,63	2,50	0,02	7,72	38,6
Sacarose 20%	5,46	5,67	2,72	0,05	7,75	38,8
Sacarose 40%	5,50	5,62	2,18	0,04	7,70	38,5
Xantana 0,001%	4,46	5,88	1,91	0,03	7,70	38,5
Xantana 0,01%	5,36	6,58	3,01	0,10	6,36	31,8

Os valores de sobrevivência celular foram obtidos imediatamente após a reidratação do inóculo. Os demais resultados, referentes à fermentação, foram obtidos após 120 horas de incubação a 30°C e a 200 rpm. A concentração do inóculo no caldo de fermentação foi de 1%.

TABELA 20 - Influência de Diferentes Métodos de Preservação na Viabilidade Celular de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 em Diferentes Períodos de Armazenamento.

Método de Preservação	48 horas (UFC/ml)	03 meses (UFC/ml)	06 meses (UFC/ml)	12 meses (UFC/ml)
YM Ágar + Óleo Mineral	$8,70 \times 10^8$	$3,30 \times 10^5$	0	0
NYGB Ágar + Óleo Mineral	$6,30 \times 10^8$	0	0	0
YM + Glicerol 15%	$1,24 \times 10^9$	$1,00 \times 10^9$	$9,80 \times 10^8$	$2,20 \times 10^8$
Liofilizado ¹ (25°C)	$2,22 \times 10^9$	$1,81 \times 10^9$	$5,90 \times 10^8$	$1,85 \times 10^8$
Liofilizado ² (-20°C)	$2,38 \times 10^9$	$1,95 \times 10^9$	$1,49 \times 10^9$	$1,25 \times 10^9$
Congeladas ³ em YM Padrão	$3,00 \times 10^9$	$2,30 \times 10^9$	$6,10 \times 10^8$	$3,70 \times 10^8$
Congeladas ⁴ em Leite Desn. 10%	$3,90 \times 10^9$	$3,10 \times 10^9$	$2,64 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$
Congeladas ⁵ em Sacarose 10%	$3,40 \times 10^9$	$2,88 \times 10^9$	$2,50 \times 10^9$	$4,90 \times 10^8$
Congeladas ⁶ em Água Destilada	$3,10 \times 10^9$	$7,10 \times 10^9$	$4,30 \times 10^8$	$1,87 \times 10^6$

1 - Inóculo Liofilizado produzido e suspenso em meio YM padrão, reidratado em solução de skim milk 10% por 10 minutos à temperatura ambiente e armazenado a +25°C.

2 - Inóculo Liofilizado produzido e suspenso em meio YM padrão, reidratado em solução de skim milk 10% por 10 minutos à temperatura ambiente e armazenado a -20°C.

3 - Inóculo produzido com células cultivadas em meio YM padrão, centrifugadas, suspensas em YM padrão e congeladas a -20°C.

4 - Inóculo produzido com células cultivadas em meio YM padrão, centrifugadas, suspensas em solução de Leite Desnatado Reconstituído 10% e congeladas a -20°C.

5 - Inóculo produzido com células cultivadas em meio YM padrão, centrifugadas, suspensas em solução de sacarose 10% e congeladas a -20°C.

6 - Inóculo produzido com células cultivadas em meio YM padrão, centrifugadas, suspensas em água destilada e congeladas a -20°C.



FIGURA 1 - Colônias de *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 Cultivadas em Meio YM Ágar a 30°C por 48 Horas.



FIGURA 2 - Colônias de *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 Plaqueadas em Meio YM Ágar pelo Método de Plaqueamento em Superfície e incubadas a 30°C por 48 Horas.

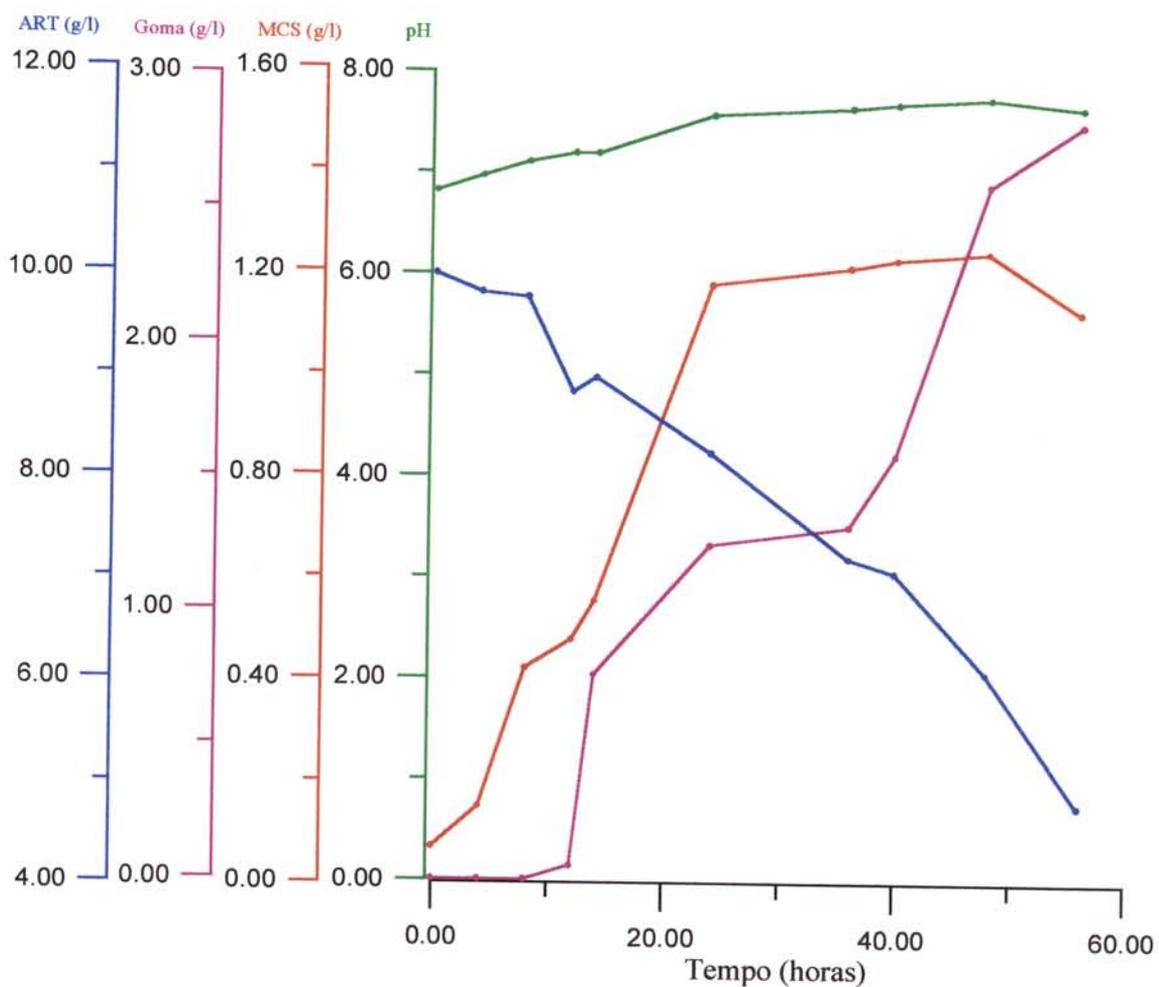


FIGURA 3 - Curva de Crescimento da Bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 Cultivada em Meio YM Padrão a 30°C e a 200 rpm. (ART: Açúcares Redutores Totais; MCS: Massa Celular Seca).

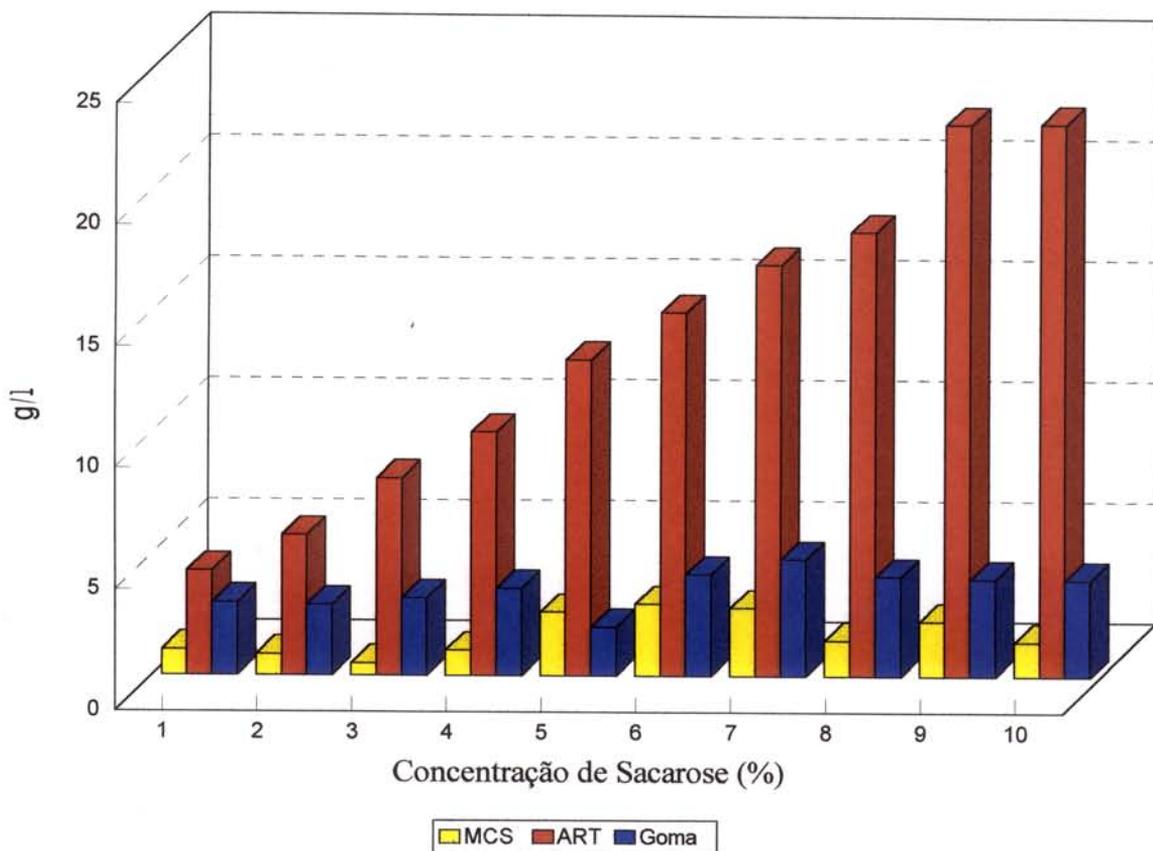


FIGURA 4 - Efeito da Concentração de Sacarose no Meio de Crescimento Celular na Produção de Célula e de Goma Xantana e no Teor de Açúcar Residual Após 40 horas de Cultivo a 30°C e a 200 rpm. (ART: Açúcares Redutores Totais; MCS: Massa Celular Seca).

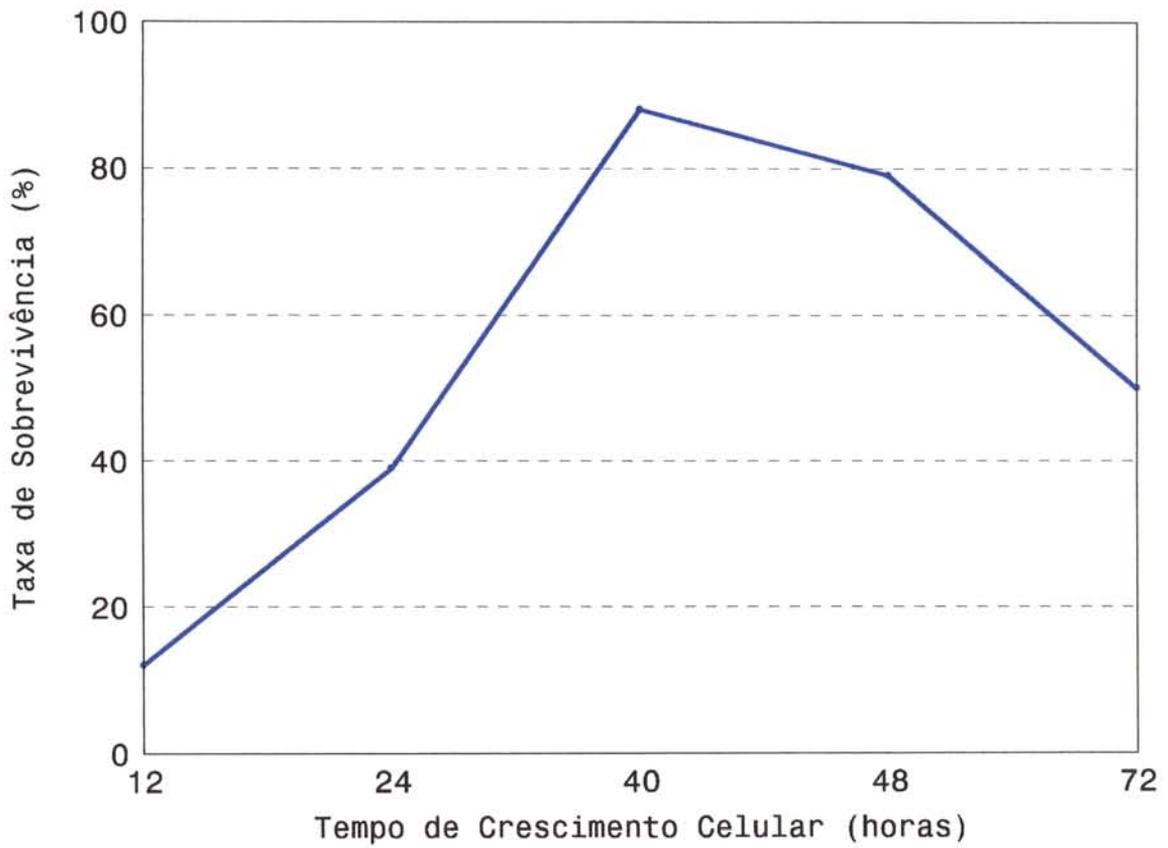


FIGURA 5 - Influência do Tempo de Crescimento das Células Produzidas em Meio YM Padrão na Viabilidade Celular do Inóculo Após a Liofilização. A Incubação foi Feita a 30°C e a 200 rpm. O Meio de Reidratação Utilizado foi a Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%.

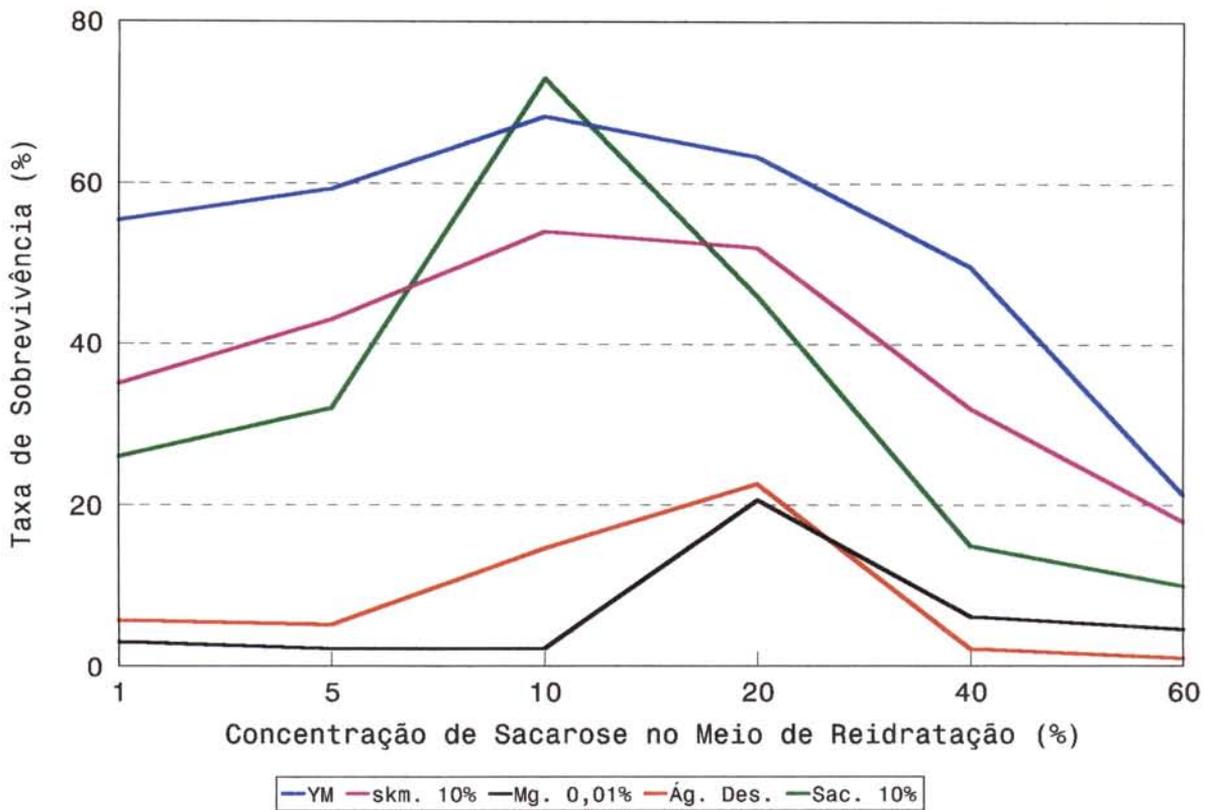


FIGURA 6 - Influência da Concentração de Sacarose Utilizada no Meio de Reidratação na taxa de Sobrevivência de Diferentes Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 Produzidos em Meio YM Padrão e Suspensos em Diferentes Meios. (YM: Meio YM Padrão; Skm.: Solução de Leite Desnatado Reconstituído; Mg: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; Ág.Des.: Água Destilada; Sac: Sacarose).

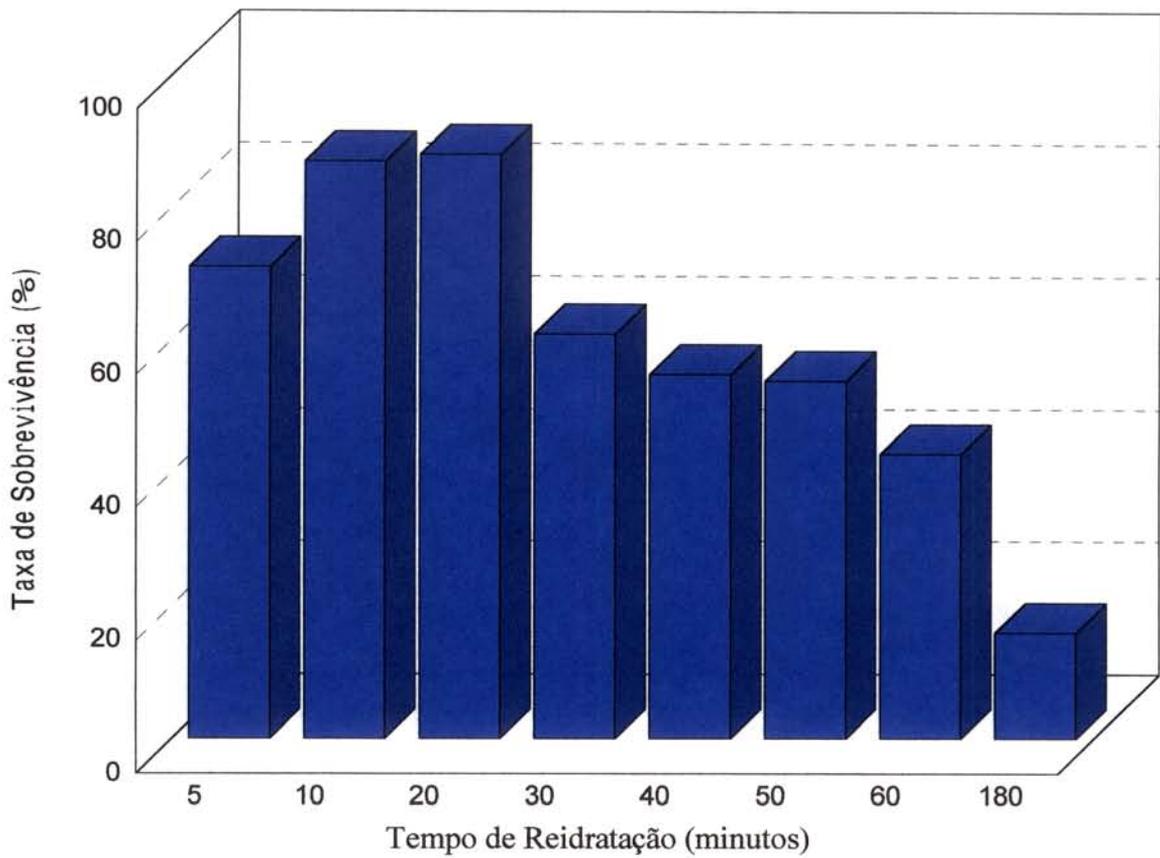


FIGURA 7 - Influência do Tempo de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 Constituído por Células Produzidas e Suspensas em Meio YM Padrão e Reidratadas em Solução de Leite Desnatado Reconstituído 10%.

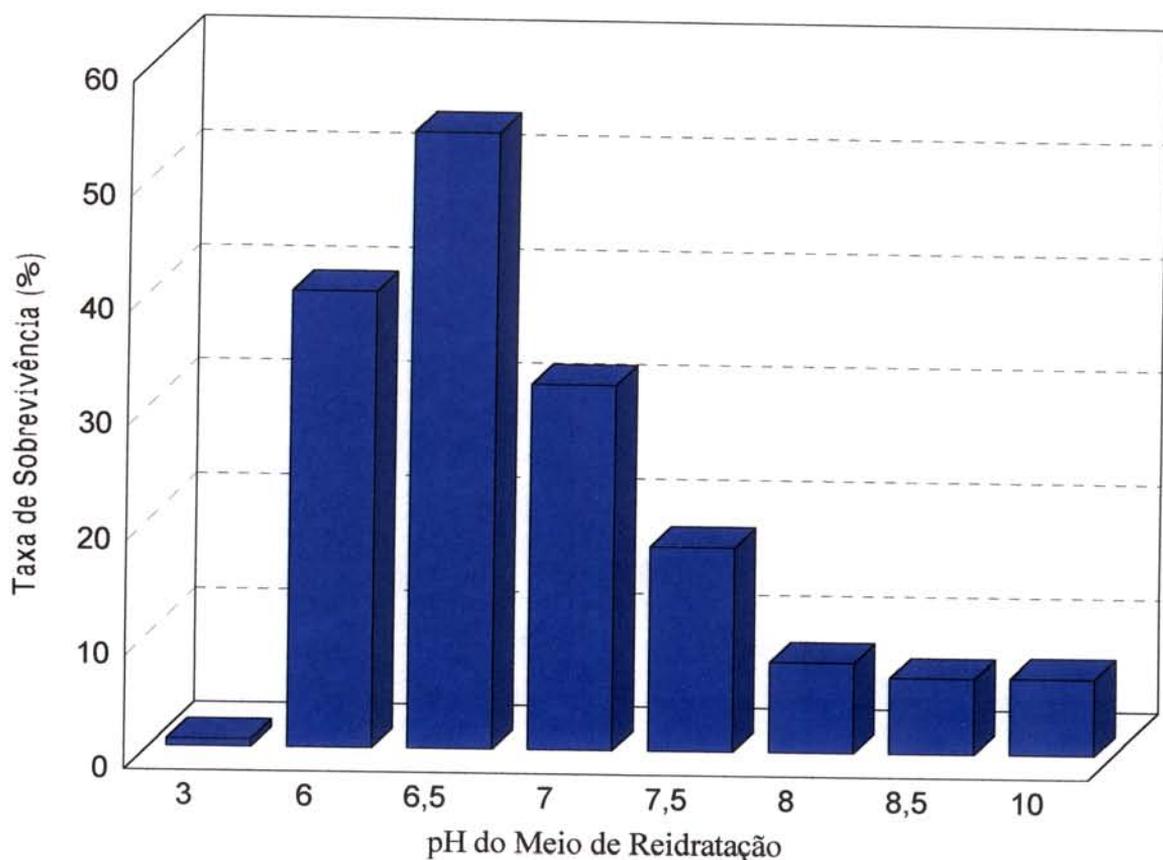


FIGURA 8 - Influência do pH do meio de Reidratação na Viabilidade Celular do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 Constituído por Células Produzidas e Suspensas em Meio YM Padrão.

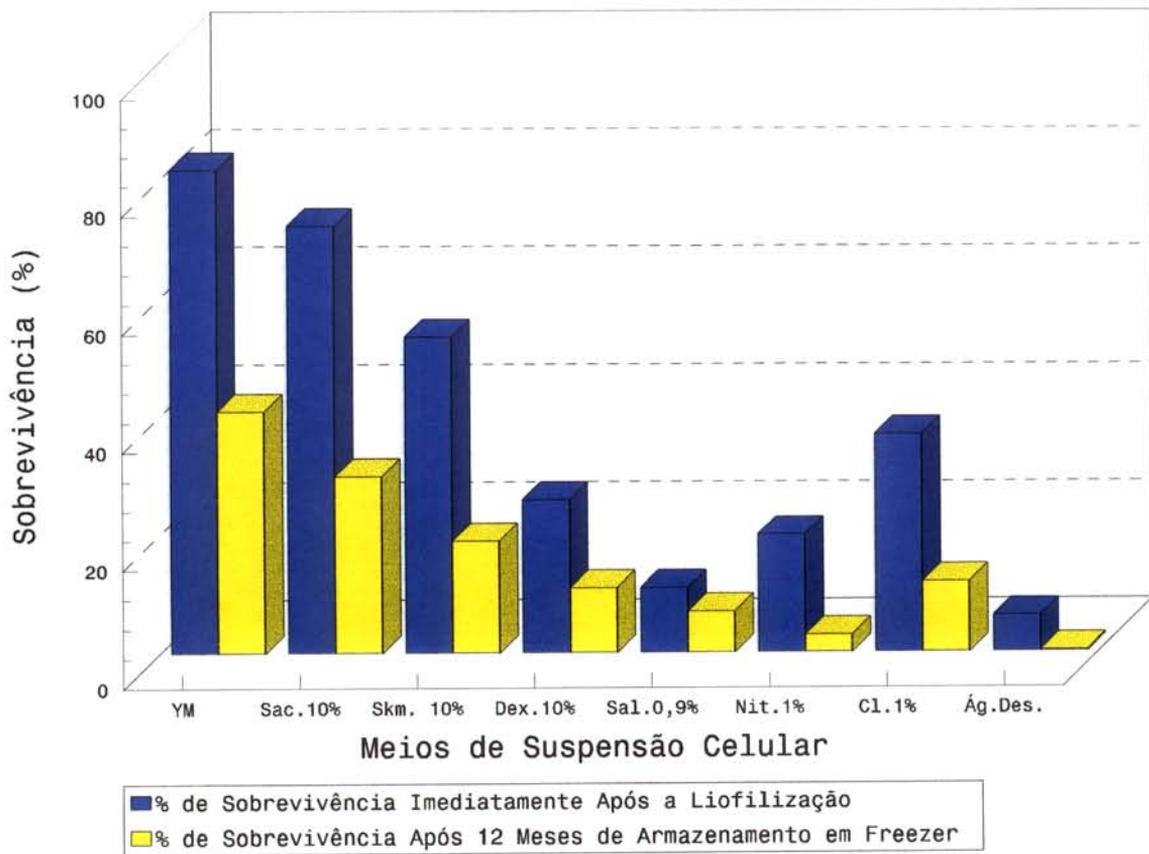


FIGURA 9 - Influência do Tempo de Armazenamento na Sobrevivência dos Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 em Diferentes Meios de Suspensão, Armazenados em Freezer a -20°C. (YM: Meio YM Padrão; Sac.: Sacarose; Skm.: Leite Desnatado Reconstituído; Dex.: Dextrose; Sal.: Solução Salina; Nit.: NH_4NO_3 ; Cl.: NH_4Cl ; Água.Des.:Água Destilada).

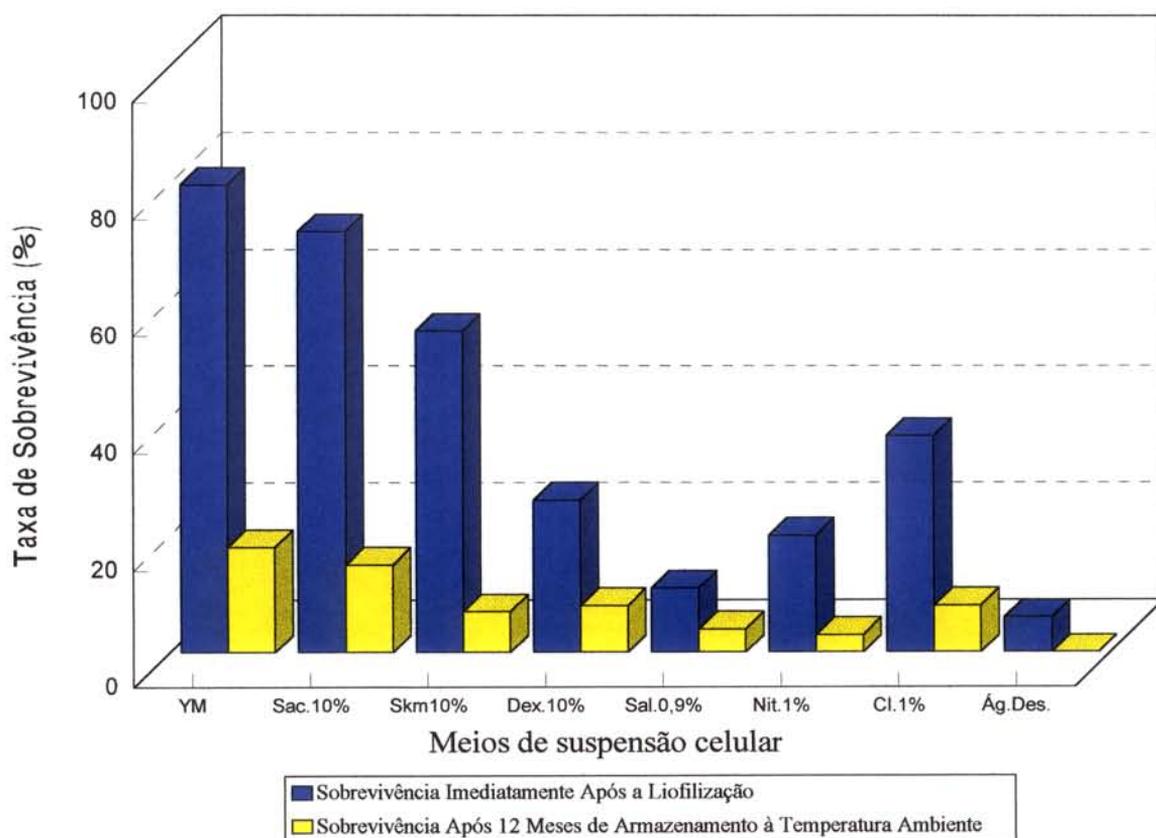


FIGURA 10 - Influência do Tempo de Armazenamento na Sobrevivência dos Inóculos Liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 em Diferentes Meios de Suspensão, Armazenados à Temperatura Ambiente (27°C). (YM: Meio YM Padrão; Sac.: Sacarose; Skm.: Leite Desnatado Reconstituído; Dex.: Dextrose; Sal.: Solução Salina; Nit: NH_4NO_3 ; Cl: NH_4Cl ; Água Destilada).

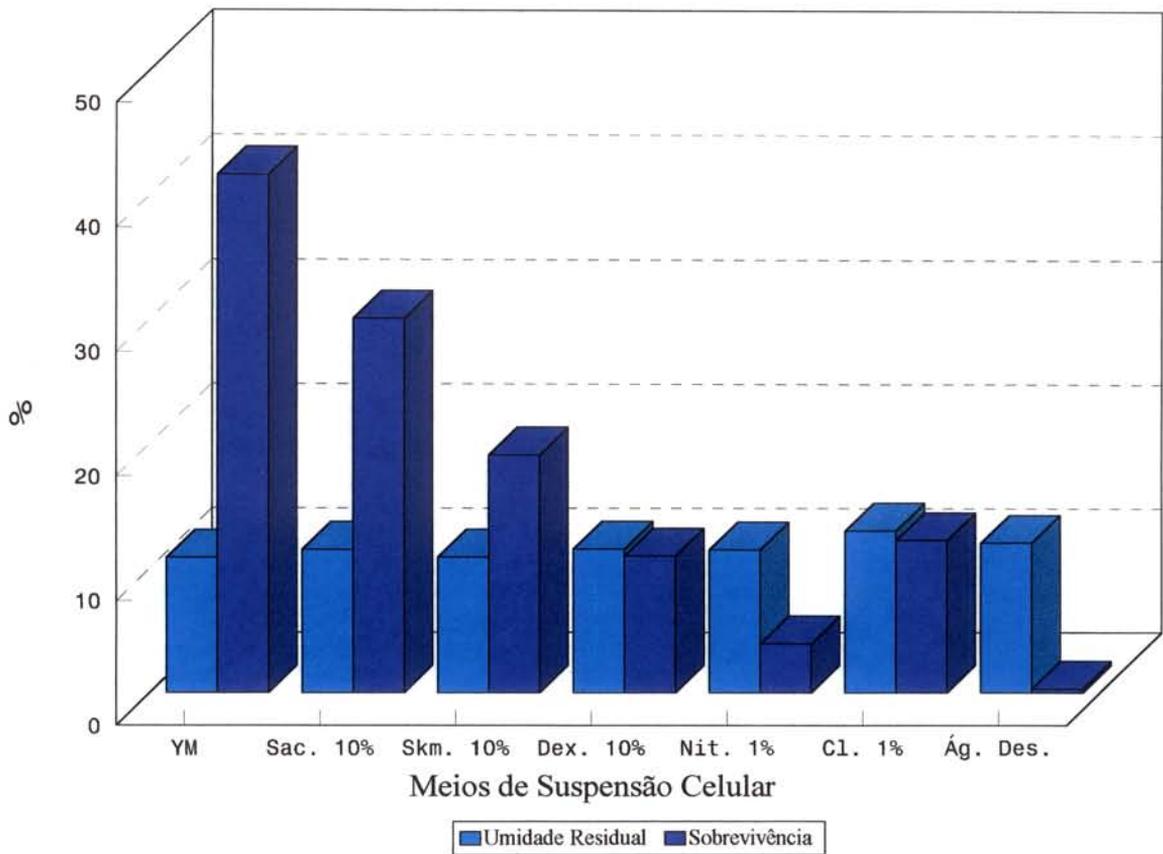


FIGURA 11 - Influência do Teor de Umidade Residual na Sobrevivência das Células Liofilizadas de *X. campestris* pv. *manihotis* em Diferentes Meios de Suspensão, Após 12 Meses de Armazenamento em Freezer a -20°C . (YM: Meio YM Padrão; Sac.: Sacarose; Skm.: Leite Desnatado Reconstituído; Dex.: Dextrose; Nit.: NH_4NO_3 ; Cl.: NH_4Cl ; Água Destilada).

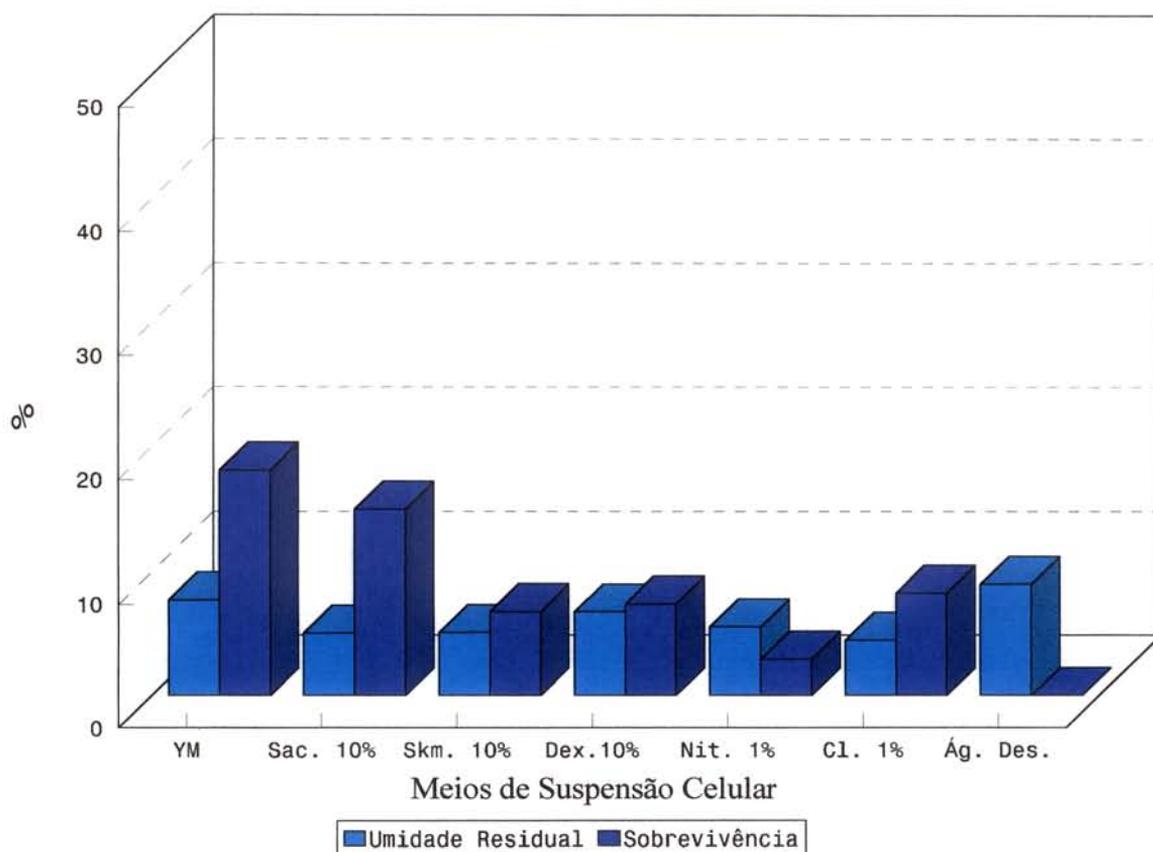


FIGURA 12 - Influência do Teor de Umidade Residual na Sobrevivência das Células Liofilizadas de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 em Diferentes Meios de Suspensão, Após 12 Meses de Armazenamento à Temperatura Ambiente (27°C). (YM: Meio YM Padrão; Sac.: Sacarose; Skm.: Leite Desnatado Reconstituído; Dex.: Dextrose; Nit.: NH_4NO_3 ; Cl.: NH_4Cl ; Água Des.: Água Destilada).

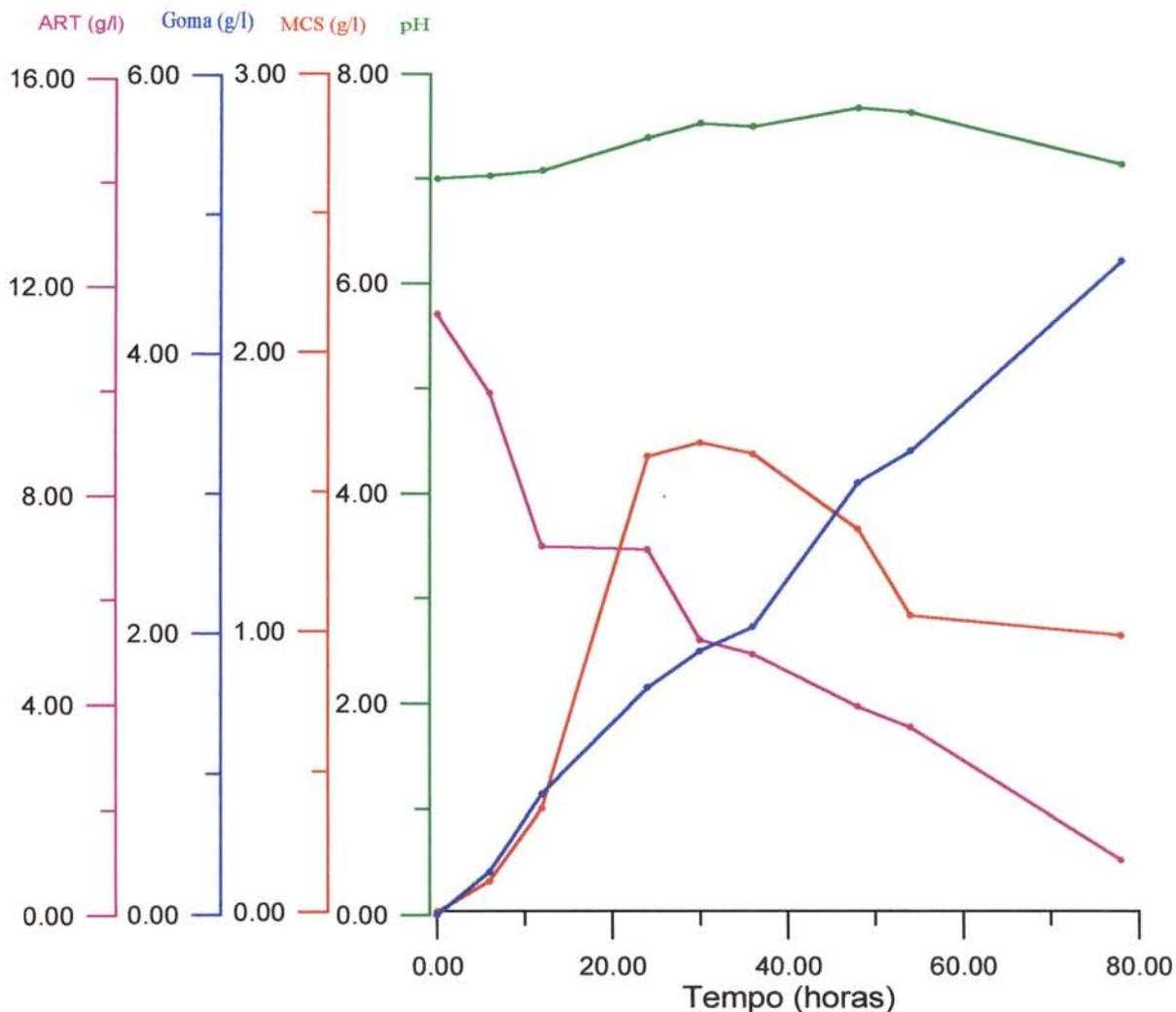


FIGURA 13 - Curva de Crescimento da Bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* n° 280 Liofilizada, Cultivada em Meio YM Padrão e Incubada a 30°C e a 200 rpm. (ART: Açúcares Redutores Totais; MCS: Massa Celular Seca).

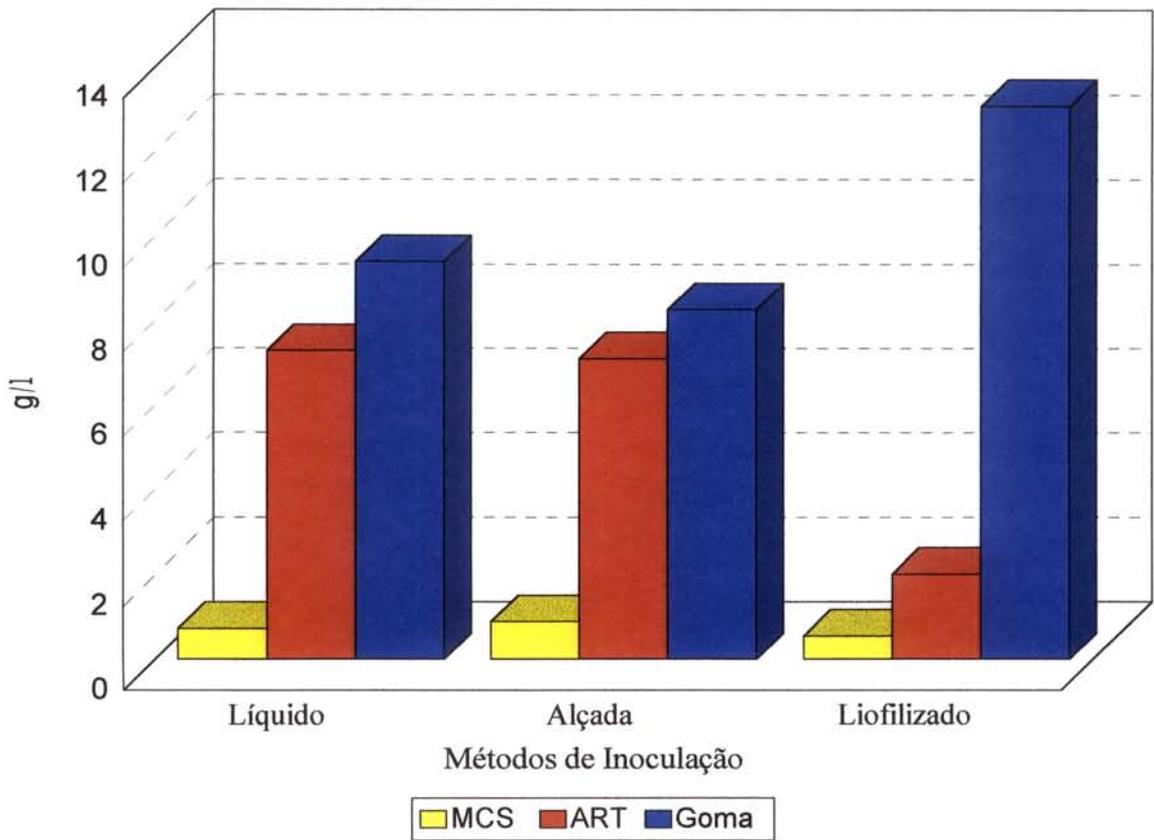


FIGURA 14 - Avaliação do Desempenho do Inóculo Liofilizado em Comparação com Métodos Convencionais de Inoculação do Meio de Fermentação Utilizando as Condições Estabelecidas por JEANES et alli (1976). A Incubação foi Feita a 30°C, por 120 horas e a 200 rpm. (ART: Açúcares Residuais Totais; MCS: Massa Celular Seca).

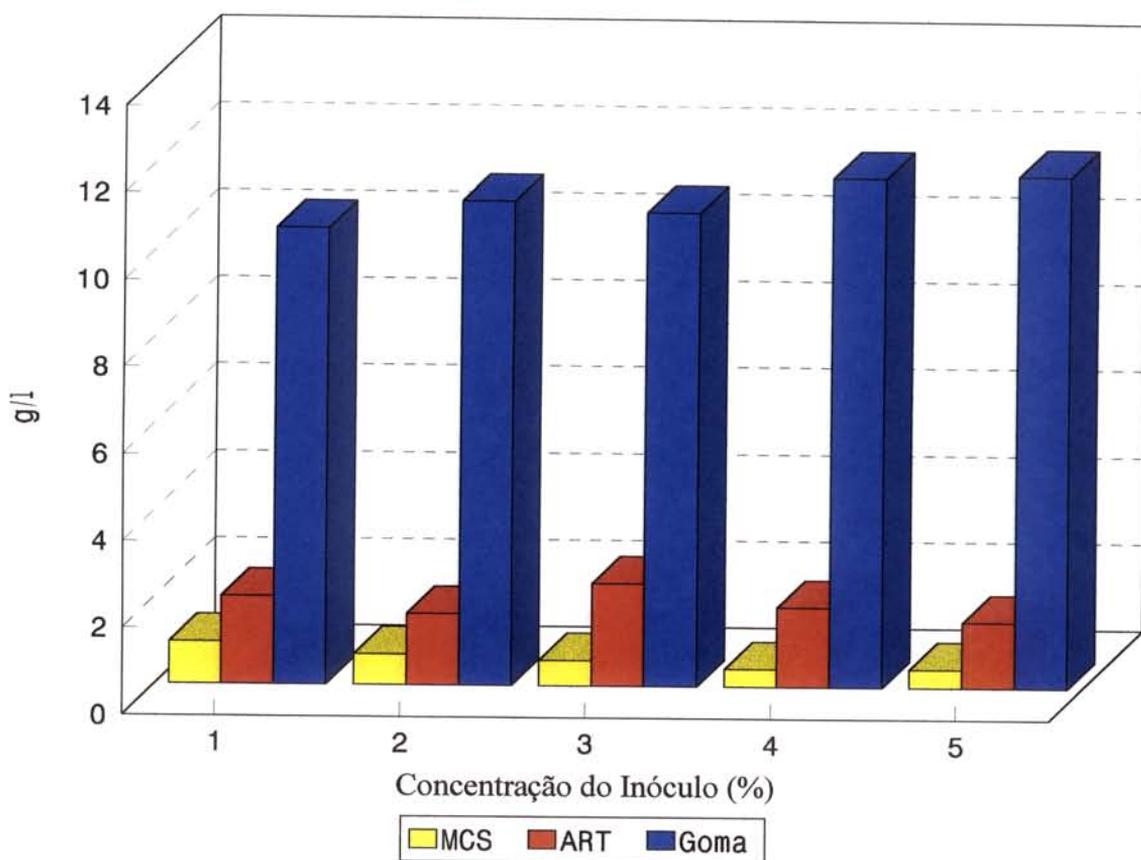


FIGURA 15 - Influência da Concentração do Inóculo Liofilizado de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280 Utilizado na Inoculação do Meio de Fermentação (JEANES et alii, 1976) para Produção de Goma Xantana. A Incubação foi Feita a 30°C por 120 horas e a 200 rpm. (ART: Açúcares Redutores Totais; MCS: Massa Celular Seca).

5 - CONCLUSÕES

Os inóculos liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* linhagem nº 280 apresentaram resultados satisfatórios quanto a manutenção da viabilidade celular e a capacidade de produção de goma xantana.

Como método de preservação, o emprego de culturas liofilizadas foi o mais adequado em relação ao binômio qualidade-custo, uma vez que a bactéria apresentou uma alta taxa de sobrevivência quando armazenada por um período de 12 meses. Não houve o aparecimento de sublinhagens, nem de contaminantes. Não foi observada a ocorrência de alterações morfológicas das colônias de *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280.

A bactéria liofilizada não apenas preservou como aumentou sua capacidade de produção de goma xantana. Assim, houve a retenção da atividade biossintetizante pelo inóculo liofilizado.

As melhores condições encontradas para a produção e armazenamento do inóculo liofilizado foram:

1 - Condições e meio de cultivo das células: Meio YM padrão com incubação a 30°C por 40 horas e a 200 rpm. As células na fase exponencial de crescimento foram as mais resistentes ao processo de liofilização.

2 - Meios de suspensão celular: Meio YM padrão e solução de sacarose 10%.

3 - Meios de reidratação celular: Solução de leite desnatado reconstituído 10% e solução de sacarose 10%.

4 - Condições de reidratação: Exposição ao fluido de reidratação a pH 6,5 por um período de 10 a 20 minutos, à temperatura ambiente.

5 - Condições de armazenamento: a maior taxa de sobrevivência dos inóculos liofilizados foi obtida com armazenamento em freezer a -20°C. Inóculos armazenados à temperatura ambiente perderam rapidamente a viabilidade celular. A preservação em óleo mineral não foi viável para a bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* nº 280.

Quanto a produção de goma xantana, a utilização do inóculo liofilizado aumentou a produção em 37% em relação ao inóculo líquido e em 55% em relação ao inóculo por alçada.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, A.; ANTONI, G.L.; AÑÓN, M.C. Effect of calcium on the cryopreservation of *Lactobacillus bulgaricus* in different freezing media. Cryobiology, v.27, n.3, p.336-342, 1990.
- AHLGREN, J.A. Purification and properties of a xanthan depolymerase from a heat-stable salt-tolerant bacterial consortium. Journal of Industrial Microbiology, v.12, n.2, p.87-92, 1993.
- ALBITER, V.; TORRES, L.G.; GALINDO, E. Recovery of xanthan from fermentation broths by precipitation in a stirred tank. Process Biochemistry, v.29, n.3, p.187-196, 1994.
- ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S.N. Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry, v.21, n.25, p.6536-6544, 1982.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO - Compêndio de Legislação de Alimentos. São Paulo . ABIA, 1989/1993.
- BAIG, S.; QADEER, M.A.; AKHTAR, M.S.; AHMED, T. Utilization of unhydrolyzed cheese whey for the production of extracellular polysaccharide by *Xanthomonas cucurbitae* PCSIR B-52. Journal of Fermentation and Bioengineering, v.69, n.6, p.345-349, 1990.
- BAIRD, J.K.; PETTITT, D.J. Biogums used in food and made by fermentation. In: GOLDBERG, I.; WILLIAMS, R.(ed) Biotechnology and Food Ingredients. New York: Van Nostrand Reinhold, cap.9, p.223-263, 1991.
- BETZ, D.A. Xanthan gum, a biosynthetic polysaccharide for the food industry. Food Technology in Australia, p.11-16, jan. 1979.

- BEUCHAT, L.R. Injury and repair of Gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. Advances in Applied Microbiology, v.23, p.219-243, 1978.
- BOZOGLU, T.F.; ÖZILGEN, M.; BAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze-drying. Enzyme Microbiology and Technology, v.9, n.9, p.531-537, 1987.
- BRADBURY, J.F. *Xanthomonas* In: BERGEY'S manual of systematic bacteriology v.1 KRIEG, N.R.; HOLT, J.G.(ed) Williams & Wilkins Company USA, 1984.
- BRENNAN, M.; WANISMAIL, B.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. Cellular damage in dried *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Food Protection, v.49, n.1, p.47-53, 1986.
- BRYAN, W.L.; SILMAN, R.W. Viability and initial kinetic parameters for dry yeast inocula in batch fermentations. Enzyme Microbiology and Technology, v.13, n.1, p.2-8, 1991.
- BUSTA, F.F. Introduction to injury and repair of microbial cells. Advances in Applied Microbiology, v.23, p.195-201, 1978.
- 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. Biotechnology and Bioengineering, v.XX, p.1003-1014, 1978.
- CADMUS, M.C.; JACKSON, L.K.; BURTON, K.A.; PLATTNER, R.D.; SLODKI, M.E. Biodegradation of xanthan gum by *Bacillus* sp. Applied and Environmental Microbiology, v.44, n.1, p.5-11, 1982.

- CALCOTT, P.H.; MACLEOD, R.A. Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: a theoretical and practical study. Canadian Journal of Microbiology, v.20, n.5, p.671-681, 1974.
- CHAMPAGNE, C.P.; DETOURNAY, H.; HARDY, M.J. Effect of medium on growth and subsequent survival, after freeze-drying, of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Journal of Industrial Microbiology, v.7, n.2, p.147-150, 1991 a.
- CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.; BROCHU, E.; BEAULIEU, Y. The freeze-drying of lactic acid bacteria. A review. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, v.24, n.3/4, p.118-128, 1991 b.
- CHOATE, R.V.; ALEXANDER, M.T. The effect of the rehydration temperature and rehydration medium on the viability of freeze-dried *Spirillum atlanticum*. Cryobiology, v.3, n.5, p.419-422, 1967.
- CHRISTIANSON, D.D.; GARDNER, H.W.; WARNER, K.; BOUNOY, B.K.; INGLETT, G.E. Xanthan gum in protein-fortified starch bread. Food Technology, v.28, n.6, 1974.
- CLEGG, J.S.; SEITZ, P.; SEITZ, W.; HAZLEWOOD, C.F. Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis. Cryobiology, v.19, n.3, p.306-316, 1982.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELL WISTRON, A. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. Biochemistry Journal, v.242, p.1-10, 1987.
- CROWE, J.H.; CARPENTER, J.F.; CROWE, L.M.; ANCHORDOGUY, T.J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. Cryobiology, v.27, n.3, p.219-231, 1990.

- CRUZ, C.H.G. Contribuição ao estudo dos fatores envolvidos na produção da goma xantana por *Xanthomonas manihotis*. Campinas, 1983. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
- DAMODARAN, S.; KINSELLA, J.E. The effects of neutral salts on the stability of macromolecules. The Journal of Biological Chemistry, v.256, n.7, p.3394-3398, 1981.
- DE VUYST, L.; LOO, J.; VANDAME, E.J. Two step fermentation process for improved xanthan production by *X. campestris* NRRL B-1459. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.39, n.4, p.263-273, 1987.
- DE VUYST, L.; VERMEIRE, L. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Applied Microbiology and Biotechnology, v.42, n.1, p.187-191, 1994.
- DIZIEZAK, J.D. A focus on gums. Food Technology, March, p.116-132, 1991.
- EKATERINIADOU, L.V.; PAPOUTSOPOULOU, S.V.; KYRIAKIDIS, D.A. High production of xanthan gum by a strain of *Xanthomonas campestris* conjugated with *Lactococcus lactis*. Biotechnology Letters, v.16, n.5, p.517-522, 1994.
- EL-SALAM, M.H.A.; FADEL, M.A.; MURAD, H.A. Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum. Journal of Biotechnology, v.33, p.103-106, 1994.
- FONT DE VALDÉZ, G.; DIEKMANN, H. Freeze-drying conditions of starter cultures for sourdoughs. Cryobiology, v.30, n.2, p.185-190, 1993.
- FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G.S. Effect of freezing and thawing on the viability and uptake of aminoacids by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Cryobiology, v.30, n.3, p.329-334, 1993.

- FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G.S.; RUIZ HOLGADO, A.P.; OLIVER, G. Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. Cryobiology, v.22, n.6, p.574-577, 1985a.
- FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G.S.; RUIZ HOLGADO, A.P.; OLIVER, G. Effect of the rehydration on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, v.50, n.5, p.1339-1341, 1985b.
- FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G.S.; RUIZ HOLGADO, A.P.; OLIVER, G. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, v.49, n.2, p.413-415, 1985c.
- FU, J.-F.; TSENG, Y.-H. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. Applied and Environmental Microbiology, v.56, n.4, p.919-923, 1990.
- FUKUI, R.; ARIAS, R.; ALVAREZ, R. Efficacy of four semi-selective media for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from tropical soils. Journal of Applied Bacteriology, v.77, n.5, p.534-540, 1994.
- FUNAHASHI, H.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. Effect of Glucose Concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. Journal of Fermentation Technology, v.65, n.5, p.603-606, 1987.
- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMÍREZ, M.E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. Applied Microbiology and Biotechnology, v.40, n.5, p.634-637, 1994.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; FRITSCH, A.P. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. Enzyme Microbiology and Technology, v.14, n.12, p.991-996, 1992.

- GEHRKE, H.H.; PRALLE, K.; DECKWER, W.D. Freeze drying of microorganisms - influence of cooling rate on survival. Food Biotechnology, v.6, n.1, p.35-49, 1992.
- GIBSON, L.F.; KHOURY, J.T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. Letters in Applied Microbiology, v.3, n.6, p.127-129, 1986.
- GLICKSMAN, M. Food Hydrocolloids. Boca Raton: CRC Press, v.1, 202p, 1982.
- GODET, P. Fermentation of polysaccharide gums. Process Biochemistry, v.8, n.1, p.33-34, 1973.
- GOLDBERG, I.; ESCHAR, L. Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition. Applied and Environmental Microbiology, v.33, n.3, p.489-496, 1977.
- GONZALES, R.; JOHNS, M.R.; GREENFIELD, P.F.; PACE, G.W. Xanthan gum precipitation using ethanol. Process Biochemistry, v.24, n.6, p.200-203, 1989.
- GREAVES, R.I.N. Fundamental aspects of freeze-drying bacteria and living cells. In: REY, L. (ed.), Freeze-Drying. Paris: Hermann, p.407-410, 1964.
- GREIFF, D. Protein structure and freeze-drying: the effects of residual moisture and gases. Cryobiology, v.8, n.2, p.145-152, 1971.
- HACKENBERG, U. Some fundamental and technical aspects of freeze-drying. In: REY, L.(ed.), Freeze-drying. Paris, Hermann, p.127-139, 1964.
- HAGEN, P.O. The effect of low temperature on microorganisms: Conditions under which cold becomes lethal. In: HUGO, W.B. (ed). Inhibition and destruction of microbial cell. Academic Press, London, cap.2, p. 39-76, 1971.

- HARDING, N.E.; RAFFO, S.; RAIMONDI, A.; CLEARY, J.M.; IELPI, L. Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursor of xanthan gum. Journal of General Microbiology, v.139, part. 3, p.447-457, 1993.
- HAYNES, W.C.; WICKERHAM, L.J.; HESSELTINE, C.W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. Applied Microbiology, v.3, n.6, p.361-368, 1955.
- HECKLY, R.J. Preservation of bacteria by lyophilization. Advances in Applied Microbiology, v.3, p.1-76, 1961.
- HECKLY, R.J. Preservation of microorganisms. Advances in Applied Microbiology, v.24, p.1-53, 1978.
- HURST, A.; HUGHES, A. Repair of salt tolerance and recovery of lost D-alanine and magnesium following sublethal heating of *Staphylococcus aureus* are independent events. Canadian Journal of Microbiology, v.27, n.6, p.627-632, 1981.
- IELPI, L.; COUSO, R.O.; DANKERT, M.A. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. FEBS Letters, v.130, n.2, p.253-256, 1981a.
- IELPI, L.; COUSO, R.O.; DANKERT, M.A. Xanthan gum biosynthesis - pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the Pentasaccharide-P-P-Lipid. Biochemical and Biophysical Research Communication, v.102, n.4, p.1400-1408, 1981b.
- IELPI, L.; COUSO, R.O.; DANKERT, M.A. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. Journal of Bacteriology, v.175, n.9, p.2490-2500, 1993.

- ISRAELI, E.; SHAFFER, B.T.; LIGHTHART, B. Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. Cryobiology, v.30, n.5, p.519-523, 1993.
- JANSSON, P.E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Carbohydrate Research, v.45, p.275-282, 1975.
- JARMAN, T.R.; PACE, G.W. Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. Archives of Microbiology, v.137, p.231-235, 1984.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides - New hydrocolloids of interest to the food industry. Food Technology, v.28, n.5, p.34-40, 1974.
- JEANES, A.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M.C.; SILMAN, R.W.; KNUTSON, C.A. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. Agricultural Research Service - U.S. Department of Agriculture. ARS-NC-51, p. 1-14, 1976.
- KANG, K.S.; VEEDER, G.T.; COTTRELL, I.W. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. In: BUSHELL, M.E. Progress in Industrial Microbiology, v.18, 1983.
- KENNE, L.; LINDBERG, B. Bacterial Polysaccharides. In: ASPINALL, G.O. (ed.), The Polysaccharides, v.2, New York: Academic Press Inc., p.287-363, 1983.
- KENNEDY, J.F.; JONES, P.; BARKER, S.A. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. Enzyme Microbiology and Tecnology, v.4, n.1, p.39-43, 1982.

- KESSLER, W.R.; POPOVIC, M.K.; ROBINSON, C.W. Xanthan production in an external-circulation-loop airlift fermenter. The Canadian Journal of Chemical Engineering, v.71, n.1, p.101-106, 1993.
- KIDBY, D.; SANDFORD, P.; HERMAN, A.; CADMUS, M. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. Applied and Environmental Microbiology, v.33, n.4, p.840-845, 1977.
- KONÍČEK, J.; KONÍČKOVÁ-RADOCHOVÁ, M. Use of whey for production of exocellular polysaccharide by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. Folia Microbiologica, v.37, n.2, p.102-104, 1992.
- KONÍČEK, J.; LASIK, J.; SAFÁR, H. Xanthan gum produced from whey by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. Folia Microbiologica, v.38, n.5, p.403-405, 1993.
- KÖPLIN, R.; ARNOLD, W.; HÖTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G.; PÜHLER, A. Genetics of Xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. Journal of Bacteriology, v.174, n.1, p.191-199, 1992.
- KUSAY, R.G.P. Preservation of microorganisms. Process Biochemistry, v. 7, n.7, p.24-26, 1972.
- LAWRENCE, A.A. Edible gums and related substances. Food Tecnology Review, n.9, Park Ridge, New Yersey, Noyes Data Corporation, 1973.
- LEACH, R.H.; SCOTT, W.J. The influence of rehydration on the viability of dried microorganisms. Journal of General Microbiology, v.21, n.2, p.295-307, 1959.

- LECHEVALLIER, M.W.; SINGH, A.; SCHIEMANN, D.A.; McFETERS, G.A. Changes in virulence of waterborne enteropathogens with chlorine injury. Applied and Environmental Microbiology, v.50, n.2, p.412-419, 1985.
- LEE, P.K.; CHANG, H.N.; KIM, B.H. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in continuous fermentation. Biotechnology Letters, v.11, n.8, p.573-578, 1989.
- LION, M.B.; BERGMANN, E.D. Substances which protect lyophilized *Escherichia coli* against the lethal effect of oxygen. Journal of General Microbiology, v.25, n.1, p.291-296, 1961.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 545 p.
- MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology, v.14, n.3, p.251-272, 1977.
- MERYMAN, H.T. Cryoprotective agents. Cryobiology, v.8, n.2, p.173-183, 1971.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MOCHI, A.C.; SCAMPARINI, A.R.P. Xanthan gum production from brasilian strains. In: NISHINARI, K.; DOI, E. (ed.) Food Hydrocolloids. New York, Plenum Press, p.147-150, 1993.
- MOLINA, O.; FITZSIMONS, R.; PEROTTI, N. Effect of corn steep liquor on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. Biotechnology Letters, v.15, n.5, p.495-498, 1993.

- MORAINÉ, R.A.; ROGOVIN, P. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v.8, p.511-524, 1966.
- MORAINÉ, R.A.; ROGOVIN, P. Growth of *Xanthomonas campestris* is not simply nutrient-limited. Canadian Journal of Microbiology, v.17, p.1473-1474, 1971a.
- MORAINÉ, R.A.; ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. Biotechnology and bioengineering, v.XIII, p.381-391, 1971b.
- MORAINÉ, R.A.; ROGOVIN, P. Kinetics of the xanthan fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v.XV, p.225-237, 1973.
- MORRIS, G.J.; COULSON, G.E.; CLARKE, K.J. Freezing injury in *Saccharomyces cerevisiae*: the effect of growth conditions. Cryobiology, v.25, n.5, p.471-482, 1988.
- NEI, T.; SOUZU, H.; ARAKI, T. Effect of residual moisture content on the survival of freeze-dried bacteria during storage under various conditions. Cryobiology, v.2, n.5, p.276-279, 1966.
- ORENTAS, D.G.; SLONEKER, J.H.; JEANES, A. Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus *Xanthomonas*. Canadian Journal of Microbiology, v.9, n.1, p.427-430, 1963.
- PAPOUTSOPOULOU, S.V.; EKATERINIADOU, L.V.; KYRIAKIDIS, D.A. Genetic construction of *Xanthomonas campestris* and xanthan gum production from whey. Biotechnology Letters, v.16, n.12, p.1235-1240, 1994.
- PETERS, H.-U.; SUH, I.S.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W.D. Modeling of batchwise xanthan production. The Canadian Journal of Chemical Engineering, v.70, n.4, p.742-750, 1992.

- PETTITT, D.J. Xanthan gum. In: GLICKSMAN, M.(ed) Food Hydrocolloids, v.1, CRC Press, cap.5, p.128-149, 1982.
- PIELKEN, P.; SCHIMZ, K.L.; EGGELING, L.; SAHM, H. Effect of methionine formation by *Xanthomonas campestris*. FEMS Microbiology Letters, v.44, n.1, p.27-31, 1987.
- PIERSON, M.D.; GOMEZ, R.F.; MARTIN, S.E. The involvement of nucleic acids in bacterial injury. Advances in Applied Microbiology, v.23, p.263-285, 1978.
- PINCHES, A.; PALLENT, L.J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. Biotechnology and Bioengineering, v. XXVIII, n.10, p.1484-1496, 1986.
- PING, X.; JIANQIANG, L.; JIANQUN, L.; BOYING, J. Xanthan gum production with pumping static-mixing loop fermentor (PS-loop fermentor). Biotechnology Letters, v.16, n.5, p.523-526, 1994.
- POLLOCK, T.J.; THORNE, L.; YAMAZAKI, M.; MIKOLAJCZAK, M.J.; ARMENTROUT, R.W. Mechanism of bacitracin resistance in Gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. Journal of Bacteriology, v.176, n.20, p.6229-6237, 1994.
- PONS, A.; DUSSAP, C.G.; GROS, J.B. Modelling *Xanthomonas campestris* batch fermentations in a bubble column. Biotechnology and Bioengineering, v.33, p.394-405, 1989.
- RAMÍREZ, M.E.; FUCIKOVSKY, L.; JIMÉNEZ, G.; QUINTERO, R.; GALINDO, E. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.29, n.1, p.5-10, 1988.

- REY, L. Fundamental aspects of lyophilization. In: REY, L. ed. Freeze-Drying. Paris: Hermann, p.23-43, 1964.
- ROGOVIN, S.P.; ANDERSON, R.F.; CADMUS, M.C. Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. Journal of Biochemistry and Microbiology Technology, v.3, p.51-62, 1961.
- ROSEIRO, J.C.; EMERY, A.N.; SIMÕES, P.; ESTÊVÃO, F.; COLLAÇO, M.T.A. Production of xanthan by in-flow cultures of *Xanthomonas campestris*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.38, n.6, p.709-713, 1993a.
- ROSEIRO, J.C.; GIRIO, F.M.; KARA, A.; COLLAÇO, M.T.A. Kinetic and metabolic effects of nitrogen, magnesium and sulphur restriction in *Xanthomonas campestris* batch cultures. Journal of Applied Bacteriology, v.75, n.4, p.381-386, 1993b.
- ROWE, T.W.G. Machinery and methods in freeze-drying. Cryobiology, v.8, n.2, p.153-172, 1971.
- RUDGE, R.H. Maintenance of bacteria by freeze-drying. In: KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. (ed.), Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: A manual of laboratory methods. 2.ed. London: Academic Press Inc., p.31-43, 1991.
- RYE, A.J.; DROZD, J.W.; JONES, C.W.; LINTON, J.D. Growth efficiency of *Xanthomonas campestris* in continuous culture. Journal of General Microbiology, v.134, n.4, p.1055-1061, 1988.
- SALCEDO, G.; RAMÍREZ, M.E.; FLORES, C.; GALINDO, E. Preservation of *Xanthomonas campestris* in *Brassica oleracea* seeds. Applied Microbiology and Biotechnology, v.37, n.5, p.723-727, 1992.

- SÁNCHEZ, A.; MARTÍNEZ, A.; TORRES, L.; GALINDO, E. Power consumption of three impeller combinations in mixing xanthan fermentation broths. Process Biochemistry, v.27, n.6, p.351-365, 1992.
- SCHWARTZ, G.J.; DILLER, K.R. Osmotic response of individual cells during freezing. I. Experimental volume measurements. Cryobiology, v.20, n.1, p.61-77, 1983.
- SCHWARTZ, R.D.; BODIE, E.A. Production of high-viscosity whey-glucose broths by a *Xanthomonas campestris* strain. Applied and Environmental Microbiology, v.51, n.1, p.203-205, 1986.
- SHU, C.H.; YANG, S.T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. Biotechnology and Bioengineering, v.35, p.454-468, 1990.
- SILMAN, R.W.; ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation. Biotechnology and Bioengineering, v.XII, p.75-83, 1970.
- SILMAN, R.W.; ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate. Biotechnology and Bioengineering, v.XIV, p.23-31, 1972.
- SINHA, R.N.; DUDANI, A.T.; RANGANATHAN, B. Protective effect of fortified skim milk as suspending medium for freeze drying of different lactic acid bacteria. Journal of Food Science, v.39, n.3, p.641-642, 1974.
- SINHA, R.N.; SHUKLA, A.K.; MADAN, L.A.L.; RANGANATHAN, B. Rehydration of freeze-dried cultures of lactic Streptococci. Journal of Food Science, v.47, n.2, p.668-669, 1982.

- SLONEKER, J.H.; ORENTAS, D.G.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. III. Structure. Canadian Journal of Chemistry, v.42, p.1261-1269, 1964.
- SMILEY, K.L. Microbial polysaccharides - A review. Food Technology, v.20, n.9, p.112-116, 1966.
- SMITH, I.H.; PACE, G.W. Recovery of microbial polysaccharides. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v.32, n.1, p.119-129, 1982.
- SNELL, J.J.S. General introduction to maintenance methods. In: KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. (ed.), Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: a manual of laboratory methods. 2.ed. London: Academic Press Inc, p.21-30, 1991.
- SOUW, P.; DEMAIN, A.L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B 1459. Applied and Environmental Microbiology, v.37, n.6, p.1186-1192, 1979.
- STARR, M.P. The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutritive requirements of the genus *Xanthomonas*. Journal of Bacteriology, v.51, n.25, p.131-143, 1946.
- SUH, I.S.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W.D. Xanthan production in bubble column and air-lift reactors. Biotechnology and Bioengineering, v.39, n.1, p.85-94, 1992.
- SUSLOW, T.V.; SCHROTH, M.N. Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methylcellulose. Applied and Environmental Microbiology, v.42, n.5, p.872-877, 1981.
- SUTHERLAND, I.W. Microbial exopolysaccharides - potential. Process Biochemistry, v.7, n.11, p.27-30, 1972.

- SUTHERLAND, I.W. An enzyme system hydrolysing the polysaccharides of *Xanthomonas* species. Journal of Applied Bacteriology, v.53, n.3, p.385-393, 1982a.
- SUTHERLAND, I.W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. In: ROSE, A.H.; MORRIS, J.G. (ed.), Advances in Microbial Physiology, v.23, London: Academic Press Inc., p.79-150, 1982b.
- SUTHERLAND, I.W. The role of acylation in exopolysaccharides including those for food use. Food Biotechnology, v.6, n.1, p.75-86, 1992.
- SUTHERLAND, I.W.; MACDONALD, R.M. Extracellular enzyme isolation and purification from exopolysaccharide-producing bacteria. Journal of Microbiological Methods, v.6, n.1, p.27-31, 1986.
- SUTTON, J.C.; WILLIAMS, P.H. Comparison of extracellular polysaccharide of *Xanthomonas campestris* from culture and from infected cabbage leaves. Canadian Journal of Botany, v.48, p.645-651, 1970.
- SYMES, K.C. The relationship between the covalent structure of the *Xanthomonas* polysaccharide (xanthan) and its function as a thickening, suspending and gelling agent. Food Chemistry, v.6, p.63-76, 1980.
- TAIT, M.I.; SUTHERLAND, I.W.; CLARKE-STURMAN, J. Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. Journal of General Microbiology, v.132, p.1483-1492, 1986.
- TAIT, M.I.; SUTHERLAND, I.W. Synthesis and properties of a mutant type of xanthan. Journal of Applied Bacteriology, v.66, n.5, p.457-460, 1989.

- TAN, C.S.; VANINGEN, C.W.; TALSMA, H.; VANMILTENBURG, J.C.; STEFFENSEN, C.L.; VLUG, I.A.; STALPERS, J.A. Freeze-drying of fungi: influence of composition and glass transition temperature of the protectant. Cryobiology, v.32, n.1, p.60-67, 1995.
- TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; KIRBY, R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Applied Bacteriology, v.78, n.4, p.456-462, 1995.
- THOMSON, N.; OLLIS, D.F. Extracellular microbial polysaccharides. II. Evolution of broth power-law parameters for xanthan and pullulan batch fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v.XXII, p.875-883, 1980.
- TORRESTIANA, B.; FUCIKOVSKY, L.; GALINDO, E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. Letters in Applied Microbiology, v.10, n.2, p.81-83, 1990.
- VASHITZ, O.; SHEINTUCH, M. Mass transfer studies using cloned-luminous strain of *Xanthomonas campestris*. Biotechnology and Bioengineering, v.34, n.5, p.671-680, 1989.
- VASHITZ, O.; SHEINTUCH, M. Analysis of polymer synthesis rates during steady-state growth of *X. campestris*. Biotechnology and Bioengineering, v.37, n.4, p.383-385, 1991.
- WEISS, R.M.; OLLIS, D.F. Extracellular microbial polysaccharides. I. Substrate, biomass and product kinetic equations for batch xanthan gum fermentation. Biotechnology and Bioengineering, v.XXII, p.859-873, 1980.
- WRIGHT, C.T.; KLAENHAMMER, T.R. Survival of *Lactobacillus bulgaricus* during freezing and freeze-drying after growth in the presence of calcium. Journal of Food Science, v.48, n.3, p.773-777, 1983.

ZAIDI, A.; GHOSH, P.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W.D. Xanthan production in a plunging jet reactor. Applied Microbiology and Biotechnology, v.35, p. 330-333, 1991.