

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

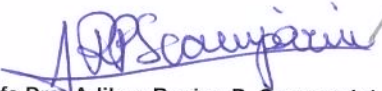
Departamento de Ciência de Alimentos

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
EXOPOLISSACARÍDEO INSOLÚVEL POR DUAS
LINHAGENS DE *Agrobacterium* sp**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Márcia Portilho**, aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de julho de 2002.

Campinas, 12 de julho de 2002


Prof. Dra. Adilma Regina P. Scamparini
Presidente da Banca

Márcia Portilho

Farmacêutica

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

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas - 2002

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO DE LANTERNA

UNIDADE 30
Nº CHAMADA UNICAMP
P836a
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 50290
PROC 16.837/02
C _____ D 1
PREÇO R\$ 11,00
DATA 13/08/02
Nº CPD _____

CM00171914-7

BIB ID 250738

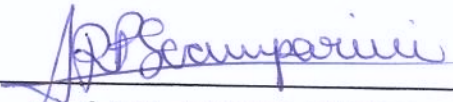
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P836a Portilho, Márcia
Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por
duas linhagens de *Agrobacterium* sp / Márcia Portilho. –
Campinas. SP: [s.n.], 2002.

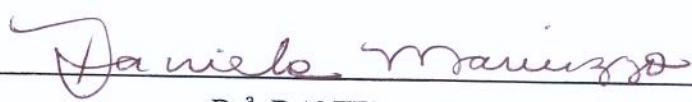
Orientador: Adilma Regina Pippa Scamparini
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Exopolissacarídeos microbianos. 2.Biopolímeros.
3.Polímeros microbianos. 4.*Agrobacterium* sp. I.Scamparini,
Adilma Regina Pippa. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

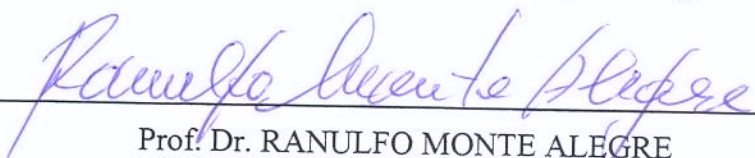
BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. ADILMA REGINA PIPPA SCAMPARINI
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

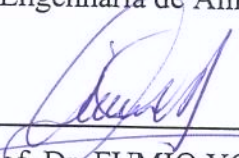
Prof.^a. Dr.^a. TELMA TEIXEIRA FRANCO
Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP


Dr.^a. DANIELA MARTINS MARIUZZO
Consultora - RIBEIRÃO PRETO


Prof. Dr. ALEXANDRE NUNES PONEZI
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP


Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PEREIRA
Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP


Prof. Dr. FUMIO YOKOYA
Fundação André Tosello - CAMPINAS

2023/159

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Adilma Regina Pippa Scamparini, pelo incentivo, paciência, confiança e orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), através da Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela oportunidade.

Aos professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela formação.

À Fundação Universidade Estadual de Maringá (UEM), Departamento de Farmácia e Farmacologia (DFF), pela disponibilidade para concretização desse trabalho.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa do Programa Institucional de Capacitação Docente e Técnica (PICDT) concedida.

Aos membros da banca examinadora pelas sugestões que muito contribuíram durante a correção do trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos da FEA e aos colegas de curso, pela colaboração.

Aos colegas de trabalho e funcionários do DFF - UEM, pela compreensão, apoio e amizade durante todos esses anos.

À Vergínia Tanamati, do Departamento de Compras - UEM, pela amizade e valioso auxílio.

Aos meus pais, Ilda e José, meu irmão, Antonio Sérgio, minha cunhada, Flávia, meus sobrinhos, Filipe e Lucas, pela dedicação, amor, compreensão e incentivo.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS	3
2.1.1. Gma xantana	5
2.1.2. Goma Dextrana	7
2.2. EXOPOLISSACARÍDEOS DE <i>Agrobacterium</i> sp	7
2.2.1. Exopolissacarídeo solúvel: succinoglicana	9
2.2.2. Exopolissacarídeo insolúvel: curdulana	11
2.2.2.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de curdulana	12
2.2.2.2. Via biossintética para obtenção da curdulana	13
2.2.2.3. Condições de cultivo para a produção da curdulana	18
2.2.2.4. Processos empregados na produção da curdulana	21
2.2.2.5. Recuperação da goma curdulana	22
2.2.2.6. Estrutura química e propriedades físicas e físico-químicas	22
2.2.2.7. Especificações do produto comercial	30
2.2.2.8. Toxicidade	31
2.2.2.9. Aplicações	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. MATERIAL	34
3.1.1. Microrganismos empregados	34
3.1.2. Matérias-primas utilizadas na elaboração dos meios para a produção do inóculo e do polissacarídeo insolúvel a partir de <i>Agrobacterium</i> sp	34
3.1.3. Amostra comercial da goma curdulana	35
3.2. MÉTODOS	36
3.2.1. Métodos microbiológicos	36

3.2.1.1.	Esterilização dos meios e materiais para trabalhos assépticos	36
3.2.1.2.	Reativação dos microrganismos	36
3.2.1.3.	Preservação dos microrganismos no laboratório	37
3.2.1.4.	Curvas de crescimento microbiano	37
3.2.1.5.	Coloração das colônias bacterianas pelo corante Azul Anilina	38
3.2.1.6.	Condições de cultivo para os testes de produção do inóculo e do polissacarídeo microbiano	38
3.2.1.7.	Produção do inóculo microbiano	38
3.2.1.8.	Padronização do inóculo para a produção do polissacarídeo microbiano	39
3.2.2.	Métodos para a produção e recuperação do polissacarídeo microbiano	40
3.2.2.1.	Meio para a produção (MP) do polissacarídeo insolúvel microbiano - meio convencional	40
3.2.2.2.	Recuperação do polissacarídeo microbiano	40
3.2.2.3.	Efeito da relação de carbono para nitrogênio na produção do polissacarídeo microbiano	42
3.2.2.4.	Produção do polissacarídeo microbiano em meio elaborado a partir de extrato de levedura comercial em água, acrescentado de glucose	42
3.2.2.5.	Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção do polissacarídeo	42
3.2.3.	Métodos analíticos para acompanhamento da produção de células ou do polissacarídeo microbiano	43
3.2.3.1.	Determinação de carboidratos	43
3.2.3.2.	Método de doseamento (segundo JECFA, 1999)	43
3.2.3.3.	Solubilidade	44
3.2.3.4.	Hidrólise ácida do polissacarídeo	44
3.2.3.5.	Análises cromatográficas	44
3.2.3.6.	Análises em espectrometria no infravermelho	45
4.	RESULTADOS	46
4.1.	AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS	46
4.1.1.	Curvas de crescimento microbiano	46

4.1.2. Aspecto dos cultivos microbianos	46
4.1.3. Coloração das colônias bacterianas pelo corante Azul Anilina	49
4.1.4. Produção do inóculo microbiano	49
4.1.4.1. Avaliação do crescimento microbiano no meio de cultivo composto por extrato de levedura comercial em diferentes concentrações e do efeito do emprego do $MgSO_4$	49
4.1.4.2. Avaliação do meio de cultivo composto por extrato de levedura comercial nas concentrações 0,45 e 0,60%, acrescentado de diferentes açúcares	53
4.1.5. Efeito da concentração do inóculo sobre a produção do polissacarídeo microbiano	60
4.2. ENSAIOS DE PRODUÇÃO	61
4.2.1. Avaliação do efeito da relação de carbono para nitrogênio (C:N) na produção do polissacarídeo microbiano	61
4.2.2. Produção de polissacarídeo insolúvel em meio contendo extrato de levedura comercial acrescentado de glucose	62
4.2.3. Produção do polissacarídeo insolúvel em meio convencional, usando diferentes fontes de carbono	65
4.3. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	70
4.3.1. Doseamento das amostras	70
4.3.2. Solubilidade do polissacarídeo microbiano em água, solução alcalina e DMSO. Capacidade em formar gel.	70
4.3.3. Análises cromatográficas do polissacarídeo microbiano hidrolisado	71
4.3.4. Análises de espectrometria no infravermelho	71
<u>5. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS</u>	<u>74</u>
5.1. CONCLUSÕES	74
5.2. COMENTÁRIOS	76
<u>6. REFERÊNCIAS</u>	<u>77</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do polissacarídeo extracelular de <i>Xanthomonas campestris</i> (Maury & Roque, 1986).	6
Figura 2: Estrutura da dextrana	10
Figura 3: Estrutura da unidade de repetição da succinoglicana, de acordo com Evans et alii (2000)	10
Figura 4: Aspecto das colônias de microrganismos produtores de polissacarídeos sobre ágar contendo Azul de Anilina (Nakanishi et alii, 1976)	14
Figura 5: Aspecto das colônias de microrganismo produtor de goma curdulana sobre ágar contendo Vermelho do Congo (Nakanishi et alii, 1976)	14
Figura 6: Via biossintética para a produção da curdulana proposta por Phillips & Lawford (1983a; 1983b)	17
Figura 7: Representação esquemática do processo de produção e recuperação da curdulana (adaptado de Harada, 1972)	23
Figura 8: Estrutura química da curdulana. $n \cong 450$ (Harada et alii, 1993)	26
Figura 9: Representação esquemática das formas da curdulana, segundo Harada et alii (1991)	26
Figura 10: Recuperação do polissacarídeo microbiano insolúvel a partir do meio de produção	41
Figura 11: Curvas de crescimento das linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) do <i>Agrobacterium</i> sp	47
Figura 12: Aspecto dos cultivos de <i>Agrobacterium</i> sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO (13140) após semeadura e incubação em meio líquido	48
Figura 13: Aspecto dos cultivos de <i>Agrobacterium</i> sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO (13140) após semeadura e incubação em meio sólido	48
Figura 14: Aspecto dos cultivos de <i>Agrobacterium</i> sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO (13140) após semeadura e incubação num meio sólido contendo o corante Azul Anilina	50

- Figura 15: Curvas de crescimento (DO_{560nm}) do *Agrobacterium* sp, linhagem ATCC 31749, em meio constituído de extrato de levedura comercial em diferentes concentrações, com adição de $MgSO_4$ (▲), sem adição de $MgSO_4$ (■) em comparação com um cultivo controle (◆) em meio de crescimento MC 51
- Figura 16: Curvas de crescimento (DO_{560nm}) do *Agrobacterium* sp, linhagem IFO 13140, em meio constituído de extrato de levedura em diferentes concentrações, com adição de $MgSO_4$ (▲), sem adição de $MgSO_4$ (■) em comparação com um cultivo controle (◆) em meio de crescimento 52
- Figura 17: Curvas de crescimento do *Agrobacterium* sp, linhagem ATCC 31749, em meio constituído de extrato de levedura nas concentrações 0,45 e 0,60%, com adição de glucose (A), sacarose (B) ou melaço de cana-de-açúcar (C) 56
- Figura 18: Curvas de crescimento do *Agrobacterium* sp, linhagem IFO 13140, em meio constituído de extrato de levedura nas concentrações 0,45 e 0,60%, com adição de glucose (A), sacarose (B) ou melaço de cana-de-açúcar (C) 57
- Figura 19: Acompanhamento do consumo de açúcares durante o crescimento do *Agrobacterium* sp, linhagem ATCC 31749, em meio constituído de extrato de levedura nas concentrações 0,45 e 0,60%, com adição de glucose (A), sacarose (B) ou melaço de cana-de-açúcar (C) 58
- Figura 20: Acompanhamento do consumo de açúcares totais durante o crescimento do *Agrobacterium* sp, linhagem IFO 13140, em meio constituído de extrato de levedura nas concentrações 0,45 e 0,60%, com adição de glucose (A), sacarose (B) ou melaço de cana-de-açúcar (C) 59
- Figura 21: Demonstração do efeito da concentração do inóculo sobre a produção de polissacarídeo insolúvel no meio convencional a partir do *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (●) e IFO 13140 (■) 60
- Figura 22: Acompanhamento do consumo de açúcares redutores totais (ART) durante a produção de polissacarídeo insolúvel por *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) em meio elaborado a partir de três proporções de C:N 63

Figura 23: Acompanhamento do consumo de açúcares redutores totais (ART) durante a produção de polissacarídeo insolúvel por *Agrobacterium* sp em meio conntituído por 0,15% e 0,30% de extrato de levedura acrescentado de glucose, em comparação ao meio convencional (MP). Linhagem ATCC 31749 (A) e linhagem IFO 13140 (B) 66

Figura 24: Acompanhamento do consumo de açúcares redutores totais (ART) (A1 e B1) e carboidratos totais (CHT) (A2 e B2) durante a produção de polissacarídeo insolúvel pelas linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) de *Agrobacterium* sp em meio elaborado a partir de diferentes fontes de carbono. 69

Figura 25: Aspecto das suspensões aquosas a 2% das amostras de polissacarídeo obtido do microrganismo *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO (B) e da curdulana comercial (C) 72

Figura 26: Aspecto dos géis a 2% das amostras de polissacarídeo obtido do microrganismo *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO (B) e da curdulana comercial (C) 72

Figura 27: Cromatografia líquida de alta resolução do açúcar liberado após hidrólise do polissacarídeo de *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (—) e IFO 13140 (—), e de uma amostra de glucose (—) 73

Figura 28: Espectro de infra-vermelho do polissacarídeo produzido por *Agrobacterium* sp, ATCC 31749 (—) e IFO 13140 (—), e de uma amostra comercial da curdulana (—) 73

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Biopolímeros bacterianos	4
Tabela 2: Microrganismos produtores de goma curdulana	12
Tabela 3: Algumas características e propriedades estabelecidas para a curdulana	30
Tabela 4: Aplicações alimentícias para a curdulana	32
Tabela 5: Aplicações não alimentícias para a curdulana	33
Tabela 6: Composição do Extrato de Levedura "PRONAL LAC" - PRODESA	34
Tabela 7: Composição aproximada do melaço de cana-de-açúcar	35
Tabela 8: Características dos xaropes de glucose e maltose de procedência comercial.	36
Tabela 9: Composição do meio de cultura para a produção (MP) do polissacarídeo insolúvel de <i>Agrobacterium</i> sp	40
Tabela 10: Aumento no crescimento do <i>Agrobacterium</i> sp nos meios contendo 0,45% de ELC e diferentes concentrações de açúcares, em relação ao meio controle (sem adição de açúcares)	55
Tabela 11: Aumento no crescimento do <i>Agrobacterium</i> sp nos meios contendo 0,60% de ELC e diferentes concentrações de açúcares, em relação ao meio controle (sem adição de açúcares)	55
Tabela 12: Taxa de consumo de açúcares (% ART consumidos) e rendimentos* na produção de polissacarídeo insolúvel (PSI) por <i>Agrobacterium</i> sp, utilizando diferentes proporções de carbono para nitrogênio	62
Tabela 13: Taxa de consumo de açúcares (%ART consumidos) e rendimentos* na produção de polissacarídeo insolúvel pelas duas linhagens de <i>Agrobacterium</i> sp, a partir de diferentes meios de cultura	65
Tabela 14: Taxas de consumo de açúcares (% ART e CHT consumidos) e rendimentos* obtidos na fermentação para a produção de polissacarídeo insolúvel pelas linhagens ATCC 31749 e IFO 13140 de <i>Agrobacterium</i> sp, utilizando diferentes fontes de carbono	68

RESUMO

Determinadas bactérias do gênero *Agrobacterium*, isoladas de amostras de solo e não patogênicas, são produtoras de dois polissacarídeos extracelulares: a succinoglicana, ácida e solúvel, e a goma curdulana, um polímero neutro e insolúvel. Este último, aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) - USA - em 1996, vem sendo empregado na indústria de alimentos, devido à sua capacidade de formar um excelente gel, firme e resistente.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de elaborar um meio para a obtenção do inóculo e avaliar aspectos relacionados à produção do polissacarídeo insolúvel de duas linhagens de *Agrobacterium* sp (ATCC 31749 e IFO 13140).

No meio de cultivo para formação do inóculo microbiano, um extrato de levedura de procedência comercial foi definido como fonte de nitrogênio e de sais. Foram feitos testes com glucose, sacarose e melaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações como fonte de carbono. Verificou-se que o carboidrato teve um efeito estimulante no crescimento microbiano. O meio elaborado com o extrato de levedura e sacarose foi o que apresentou melhores resultados, quanto ao crescimento, para as duas linhagens. Os inóculos microbianos produzidos a partir deste meio mostraram-se adequados para a produção do polissacarídeo insolúvel em um meio de cultivo proposto na literatura.

As amostras de polissacarídeo insolúvel, obtidas das linhagens avaliadas, foram comparadas a uma amostra comercial do polissacarídeo insolúvel (curdulana) através de testes de solubilidade, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria no infravermelho e capacidade de formar gel. As duas linhagens produziram um polissacarídeo com características muito semelhantes a curdulana comercial.

Glucose de milho, glucose de mandioca e maltose de milho foram empregadas no meio de fermentação para a produção do polissacarídeo insolúvel, como substituintes da fonte de carbono no meio proposto na literatura. As duas linhagens apresentaram produção do polissacarídeo com rendimentos iguais ou superiores aos citados na literatura (que são de aproximadamente 50,00%). A linhagem ATCC 31749 apresentou melhor produção com o emprego da maltose de milho, com rendimento de 84,68%, enquanto a linhagem IFO 13140 produziu melhor a partir da glucose de milho, com 50,00% de rendimento (sobre os açúcares redutores).

ABSTRACT

Some bacteria of *Agrobacterium* genus isolated from soil samples and not pathogenic produce two extracellular polysaccharides: an acid and soluble succinoglycan and curdlan gum, an insoluble and neutral polymer. The last one, which received the approval of the FDA - Food and Drug Administration - USA - in 1996, is usually used in food industry because of its property of a firm, resilient and excellent gel.

The present work was carried on in order to elaborate a medium to obtain a inoculum and evaluate aspects related to the production of an insoluble polysaccharide in two strains of *Agrobacterium* sp (ATCC 31749 and IFO 13140).

It was used an yeast extract, commercially available as a medium, in order to create a microbial inoculum, defined as a nitrogen and salts sources. Tests were made using glucose, sucrose and sugar cane molasses in different concentrations as carbon source. The medium elaborated with yeast extract and sucrose presented the best results related to growth in both strains. The inoculums produced by that culture were suitable to the production of insoluble polysaccharides in the medium proposed in the literature.

The samples of insoluble polysaccharide obtained from the evaluated strains were compared to a commercial sample of insoluble polysaccharide (curdlan) through tests of solubility, high-pressure liquid chromatography, infrared spectrometry and ability to produce gel. Both strains produced a polysaccharide whose features were very similar to the commercial curdlan.

Maize glucose, cassava glucose and maize maltose were used as a fermentation medium to the production of the insoluble polysaccharide as a substitute of carbon source in the medium proposed in the literature. Both strains produced the polysaccharide and the results were the same or higher than the literature (50,00%). The strain ATCC 31749 presented the best production using maize maltose (productivity of 84,68%) and strain IFO 13140 produced better through maize glucose (productivity of 50,00%).

1. INTRODUÇÃO

Um polissacarídeo microbiano extracelular insolúvel composto inteiramente por resíduos de D-glucose unidos por ligações β -D-1,3 foi isolado e identificado a partir de cultivos da bactéria Gram negativa *Alcaligenes faecalis* variedade *myxogenes*, mutante 10C3K (atualmente denominada pela ATCC de *Agrobacterium* sp). O exopolissacarídeo mostrou-se capaz de solubilizar e formar um gel quando a suspensão aquosa era aquecida e foi denominado "curdulana" (Harada et alii, 1968; Lee et alii, 1997a; Lee et alii, 1997b).

No ano de 1968, a indústria Takeda Chemical (Japão) mostrou interesse por esta goma para uso em alimentos e deu início à sua produção em 1972 (Phillips & Lawford, 1983b; Harada et alii, 1993), com aproximadamente 200 toneladas por ano. Esta indústria produz a goma curdulana como um aditivo alimentar (Harada et alii, 1993), com a marca registrada PureglucanTM (Pszczola, 1997a e 1997b; Jezequel, 1998). Mais recentemente, Wako Pure Chemical, uma subsidiária da indústria Takeda, também tem produzido e comercializado este polímero como um produto químico com maior grau de pureza.

O uso da curdulana é regulamentado no Japão como aditivo alimentar natural. Foi regularizada pelo FDA (Food and Drug Administration) em dezembro de 1996 (Code of Federal Regulations, 1996), sendo o terceiro polissacarídeo microbiano aprovado para uso alimentício (além dela são aprovadas as gomas xantana e dextrana). Este produto é considerado como um composto não tóxico e nutricionalmente inerte (Harada et alii, 1993). Nutricionalmente pode-se classificar a curdulana como fibra não digerível devido à ausência, no corpo humano, de enzima capaz de hidrolisar ligações β -glicosídicas (Jezequel, 1998).

Seu emprego em alimentos inclui: massas para macarrão, produtos à base de soja, hambúrguer, geléias, pudins, balas, entre outros. Além de aditivo alimentar como espessante ou agente de gelificação, há potencial para sua aplicação, entre outras, como possível agente anti-tumoral (Sasaki et alii, 1978), na produção de filmes e como suporte para enzimas imobilizadas (Nakao et alii, 1991). No Brasil, não foram encontradas referências quanto à produção ou ao emprego da goma curdulana em qualquer destas aplicações.

A produção pode ser feita através de sistemas contínuos ou descontínuos, utilizando-se um meio quimicamente definido, tendo a glucose como principal fonte de carbono. A separação da goma do meio de fermentação tem como base suas características de solubilidade em meio alcalino (Pace & Righelato, 1980; Phillips & Lawford, 1983b), dispensando o uso de solventes, comuns na separação de outros polissacarídeos. A etapa de produção, especialmente as matérias-primas utilizadas na elaboração do inóculo e na fermentação, como a fonte de carbono, é a mais onerosa do processo. Desta forma, a pesquisa de uma fonte de carbono mais econômica é importante para a elaboração industrial deste polímero.

Constituíram-se objetivos deste trabalho:

a partir de duas linhagens de *Agrobacterium* sp (ATCC 31749 e IFO 13140):

a) avaliar o emprego do extrato de levedura comercial em diversas concentrações na elaboração do inóculo microbiano, com e sem a adição de diferentes carboidratos (glucose, sacarose e melaço de cana-de-açúcar);

b) verificar a possibilidade da produção do polissacarídeo insolúvel num meio contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e glucose como fonte de carbono;

c) avaliar a produção do polissacarídeo insolúvel a partir de diferentes concentrações do inóculo;

d) produzir o polissacarídeo insolúvel em um meio citado na literatura e compará-lo a uma amostra comercial de goma curdulana, através de testes de solubilidade, formação de gel e análises de espectrometria no infravermelho e

e) avaliar a produção do polissacarídeo insolúvel em um meio citado na literatura, substituindo a fonte de carbono por glucose de milho, glucose de mandioca e maltose de milho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

A membrana citoplasmática microbiana é revestida por uma parede celular, formada por diferentes substâncias químicas, como o ácido diaminopimélico, o ácido murâmico, o ácido teicóico e o peptidoglicano, um polímero insolúvel que determina a forma da bactéria. As bactérias Gram positivas têm a parede celular espessa, sendo mais de 80% composta do peptidoglicano, com quantidades não significativas de lipídeos. Já as bactérias Gram negativas apresentam a parede celular mais fina, consequência da menor quantidade de peptidoglicano, em comparação às Gram positivas, e têm como maior componente um macropolímero, denominado lipopolissacarídeo. A presença do lipopolissacarídeo fornece uma barreira hidrofílica à superfície celular (Conn & Stumpf, 1990).

Em muitas bactérias, a hidrofiliabilidade da superfície é aumentada pela presença de uma camada de polissacarídeo extracelular (EPS). O EPS pode estar organizado de modo a formar uma camada coesiva e aderente, denominada "cápsula" ou consistir em um polissacarídeo livre e "mucilaginoso" (slime), com pouca ou nenhuma aderência celular. O termo polissacarídeo extracelular ou exopolissacarídeo pode ser usado tanto para descrever o polissacarídeo mucilaginoso como o capsular (Sutherland, 1988, citado por Souza, 1994).

Os EPS microbianos podem ser constituídos por um único tipo de monossacarídeo, sendo classificados como homopolissacarídeos, como as gomas dextrana e curdulana. Outros, entretanto, possuem estrutura mais complexa podendo, inclusive conter, além de diferentes monossacarídeos, outros compostos químicos, como a goma xantana (Sutherland, 1994).

Três polissacarídeos microbianos são aprovados pelo FDA para uso alimentar: xantana, dextrana e curdulana (Pszczola, 1997a). Na Legislação Brasileira, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), está previsto o uso da xantana e da dextrana e ainda não consta a curdulana como um aditivo alimentar usual.

Comercialmente, os EPS microbianos apresentam interesse por formarem uma classe de polímeros ou gomas, utilizados amplamente como espessantes, gelificantes,

agentes de suspensão, colóides protetores, entre outras aplicações (Pace, 1991). As áreas de interesse para os EPS microbianos, ou biopolímeros, como são comumente referidos, são bastante variadas, como: indústria de alimentos, agroquímica, recuperação de óleo bruto, na medicina e farmácia, em química fina e cosméticos (Vandamme et alii, 1996).

A Tabela 1 apresenta uma relação de outros biopolímeros bacterianos, além dos citados acima, seus microrganismos produtores e exemplos de aplicação.

Tabela 1: Biopolímeros bacterianos

Microrganismo produtor	Biopolímero	Aplicação
<i>Agrobacterium</i> sp	curdulana e succinoglicana	agente gelificante em alimentos
<i>Xanthomonas campestris</i>	xantana	estabilizante de emulsões
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	dextrana	expansor do plasma sanguíneo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	alginato	matriz na imobilização de células e enzimas
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	emulsana	na formação de espumas
<i>Pseudomonas elodea</i> PS-60	gelana	solidificação de meio microbiológico de cultura
<i>Streptococcus equii</i> , <i>S. zooepidemicus</i>	ácido hialurônico	em oftalmologia, como "lágrima" artificial
<i>Acetobacter xylinum</i>	celulose	em medicina humana, como substituto temporário de pele
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	poliidroxibutirato poliidroxivalerato	"plásticos" microbianos - filmes
<i>Bacillus</i> sp, <i>Klebsiella</i> sp, <i>Micrococcus</i> sp,	ciclodextrinas	encapsulação de aromas
<i>Thermoanaerobacter</i> sp <i>Zoogloea ramigera</i>	zooglana	-

Adaptado de: Vandamme et alii, 1996

2.1.1. Goma Xantana

Vers, em 1940, isolou uma bactéria, denominada *Xanthomonas campestris*, capaz de elevar a viscosidade do meio onde se desenvolve. A viscosidade é produzida pela secreção no meio de um heteropolissacarídeo aniônico, denominado goma xantana, produzido em escala industrial por fermentação aeróbia pela *X. campestris* (Maury & Roque, 1986).

A comercialização extensiva da xantana teve início a partir de 1964. Hoje em dia, os maiores produtores da goma são Merck e Pfizer nos Estados Unidos, Rhône Poulenc e Sanofi-Elf, na França e Jungbunzlauer na Áustria (García-Ochoa, 2000).

Os aspectos toxicológicos e de segurança deste polímero para aplicações em produtos alimentícios e farmacêuticos foram amplamente estudados. A xantana é um produto atóxico, não é capaz de promover sensibilização e não causa irritação na pele ou olhos (García-Ochoa, 2000).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo cuja estrutura primária consiste de unidades repetitivas de pentassacarídeo formado por duas unidades de glucose, duas de manose e uma de ácido glucurônico, na proporção molar de 2,8:2,0:2,0 (Figura 1). Sua cadeia principal consiste em unidades de β -D-glucose com ligações nas posições 1 e 4. A estrutura desta cadeia é idêntica à da celulose. O trissacarídeo da cadeia lateral contém uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glucose da cadeia principal. Aproximadamente metade dos resíduos D-manose terminais contém um ácido pirúvico ligado, com distribuição indeterminada. A unidade de D-manose ligada na cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6. A presença dos ácidos acético e pirúvico produz um polissacarídeo do tipo aniônico. O meio de cultivo e condições operacionais influenciam no rendimento e estrutura da goma xantana produzida (García-Ochoa et alii, 2000).

Para a produção comercial, um meio de fermentação constitui-se em 2-4% de carboidrato (glucose, sacarose, hidrolisado de amido), 0,05-0,1% de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio ou uréia) e sais, com o pH controlado em valores próximos do neutro (Crueger & Crueger, 1993).

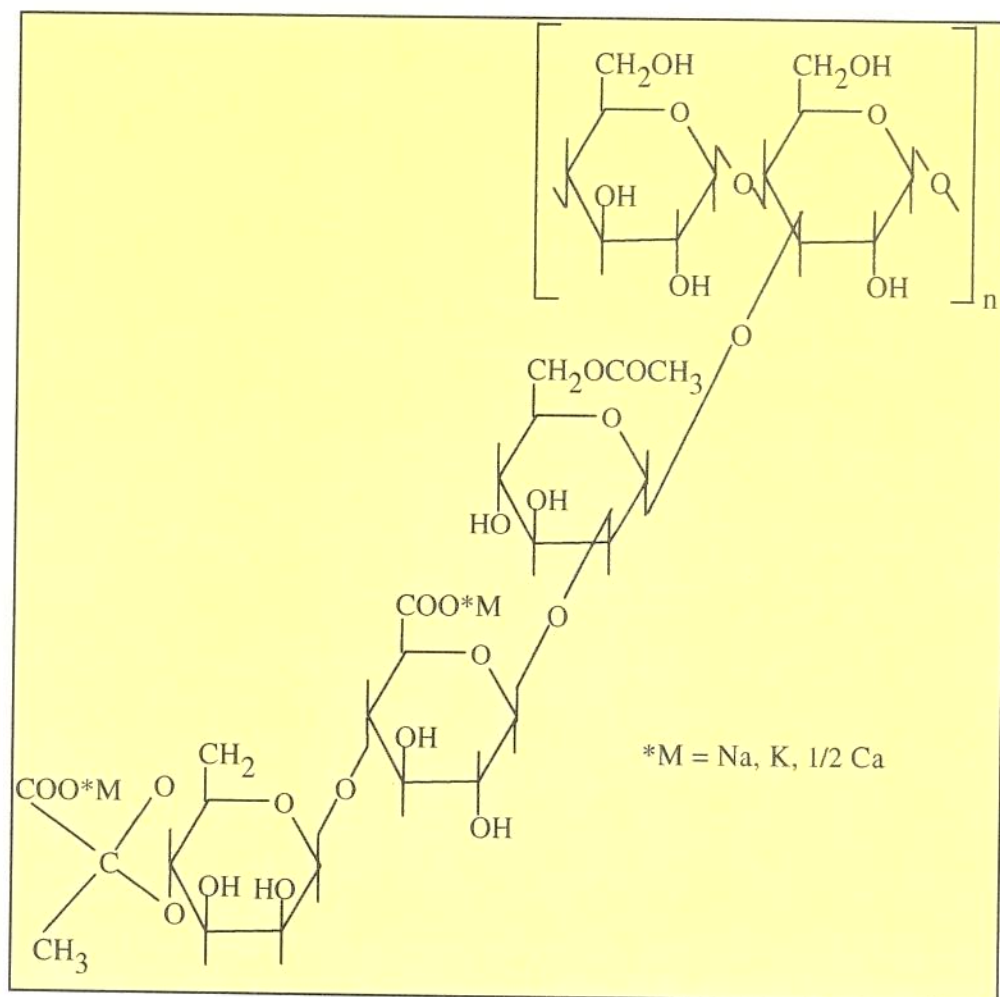


Figura 1: Estrutura do polissacarídeo extracelular de *Xanthomonas campestris* (Maury & Roque, 1986).

A goma xantana tem sido empregada numa variedade de produtos alimentícios devido às suas características, incluindo a estabilização de emulsões, estabilidade térmica, compatibilidade com ingredientes alimentícios e suas propriedades reológicas (García-Ochoa et alii, 2000).

2.1.2. Goma Dextrana

A dextrana, também conhecida como α -1,6-D-glucana, é produzida por cepas da bactéria *Leuconostoc mesenteroides*, quando crescem em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Há uma única enzima envolvida na sua produção, a dextrano-sacarase. Este polissacarídeo não apresenta toxicidade e é considerado seguro para uso como ingrediente alimentício e produção de medicamentos (Vandamme et alii, 1996).

A dextrana é um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glucose unidas através de ligações glicosídicas α -1,6 (Figura 2). Também podem ser encontradas ligações glicosídicas α -1,2, α -1,3 e α -1,4 em menor proporção (Crueger & Crueger, 1993).

A produção comercial da dextrana pode ser feita através de cultivos contínuos ou descontínuos, utilizando o *Leuconostoc mesenteroides*. O polissacarídeo (com massa molecular próxima a 500.000) pode ser obtido do meio a partir de precipitação com álcool etílico e tratamento com ácido para hidrólise até a massa molecular desejada (de 40.000 a 60.000, geralmente). O processo enzimático, com uso da dextrano-sacarase é bastante eficiente e foi desenvolvido antes dos processos contínuos de fermentação para este biopolímero (Crueger & Crueger, 1993).

Entre as aplicações para a dextrana, destacam-se sua importância como substituto do plasma sanguíneo e também na produção de alimentos (Crueger & Crueger, 1993).

2.2. EXOPOLISSACARÍDEOS DE AGROBACTERIUM SP

Em 1964, Harada & Yoshimura isolaram, a partir de amostras de solo, uma bactéria Gram negativa não formadora de esporos. A bactéria isolada era capaz de usar o etilenoglicol como única fonte de carbono e produzir um polissacarídeo com rendimento de 20% sobre o etilenoglicol presente no meio. Mais tarde, verificaram que o polissacarídeo era ácido, contendo cerca de 10% de ácido succínico e também era produzido a partir de

uma variedade de açúcares com rendimento superior ao verificado para o etilenoglicol. A bactéria isolada foi identificada, na época, como *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* cepa 10C3 (Harada & Yoshimura, 1964).

Os estudos realizados na seqüência desse isolamento tiveram como objetivo estudar a produção do polissacarídeo, sua caracterização química e propriedades físicas (Harada & Yoshimura, 1964). O polissacarídeo recebeu a denominação de succinoglicana 10C3. Tratava-se de um polímero extracelular da cepa microbiana isolada em 1964, contendo, além do ácido succínico (10%), os açúcares glucose (70-80%) e pequenas quantidades de galactose e manose, com ligações glicosídicas do tipo β .

Durante os estudos da produção da succinoglicana 10C3 foi isolado um microrganismo mutante que não era mais capaz de sintetizar este polissacarídeo. O mutante recebeu, na época, a denominação *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* cepa 10C3K e produzia um polissacarídeo neutro, insolúvel em soluções neutras, com características completamente diferentes do polissacarídeo inicial. O novo polissacarídeo, uma β -glucana, formava um gel forte e firme quando aquecido em suspensão a 100°C por alguns minutos. Os rendimentos observados na sua produção foram de aproximadamente 50% sobre a glucose empregada como fonte de carbono. Foi definido um meio complexo e condições de produção (Harada et alii, 1966). O polissacarídeo recebeu a denominação curdulana (do inglês *curdlan* - curdle = coalhar) (Harada et alii, 1968). Após hidrólise, verificou-se que o polímero era constituído inteiramente ou principalmente por resíduos de D-glucose, unidos por ligações β -1,3, tratando-se, portanto, de uma β -1,3-glucana com aproximadamente 135 unidades da hexose (Harada, Misaki & Saitô, 1968).

A bactéria original, *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, atualmente é classificada pelo American Type Culture Collection (ATCC) como *Agrobacterium* sp, denominação citada nas referências mais recentes (Lee et alii, 1997a; Lee et alii, 1997b).

As bactérias do gênero *Agrobacterium* são bastonetes Gram negativos, não esporulados, incapazes de fermentar açúcares. Os *Agrobacterium* são patógenos de plantas, encontrados nas raízes de dicotiledôneas, como causa de tumores. A enfermidade, nas plantas, caracteriza-se pelo crescimento de um bulbo de tecido tumoral onde ocorre a infecção. Este microrganismo não é um patógeno humano (Tortora et alii, 1993).

Quanto à estabilidade das cepas, pouca informação se encontra na literatura. Hisamatsu et alii (1977) realizaram estudos a partir de nove culturas estoque de *Agrobacterium* sp com o objetivo de avaliar a estabilidade na produção de polissacarídeo extracelular. Verificaram a co-existência de diferentes tipos de organismos, produtores e não produtores, nas culturas-estoque avaliadas. Os autores sugeriram que, nos cultivos que perderam a capacidade de produzir polissacarídeo, ocorreu uma mutação espontânea. Harada et alii (1993) afirmaram que a cepa 10C3K de *Agrobacterium* sp mantém-se geneticamente estável e produzindo por mais de 10 anos, quando estocada adequadamente na forma de cultura sobre agar nutriente.

2.2.1. Exopolissacarídeo solúvel: succinoglicana

A succinoglicana é um exopolissacarídeo ácido produzido por cepas microbianas semelhantes àquelas que produzem a curdulana. Isolada em 1964 por Harada e Yoshimura, foi o primeiro polissacarídeo microbiano contendo ácido succínico relatado na literatura. A composição deste polímero foi definida como: D-glucose, D-galactose, ácido pirúvico, ácido succínico e acetila, nas proporções 7:1:1:1:1 (Harada et alii, 1993).

Além de gêneros de *Agrobacterium*, também o *Rhizobium meliloti* é capaz de sintetizar a succinoglicana. Zevenhuizen (1997) relatou que algumas cepas de *Pseudomonas* spp também são produtoras do polímero.

A estrutura da succinoglicana (Figura 3) foi elucidada a partir de sua degradação com succinoglucanase e análises de Ressonância Nuclear Magnética.

Evans et alii (2000) definiram que o ácido pirúvico se encontra como um 4,6-O-cetal substituinte na glucose terminal. O ácido succínico está presente em 40% das unidades de repetição, ligado na posição 6 da glucose próxima à que carrega o ácido pirúvico. Pequena quantidade do ácido succínico (cerca de 6% do total) pode estar ligado na posição 6 de outra glucose, não determinada.

Harada & Yoshimura (1965) relataram que, em soluções aquosas, a succinoglicana apresenta-se em três formas: ligada ao hidrogênio, cálcio ou sódio. As formas H- e Ca-

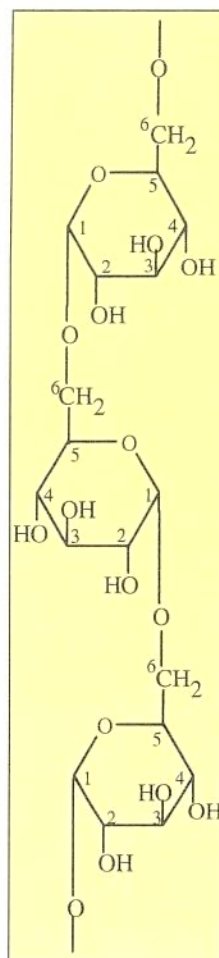


Figura 2: Estrutura da dextrana

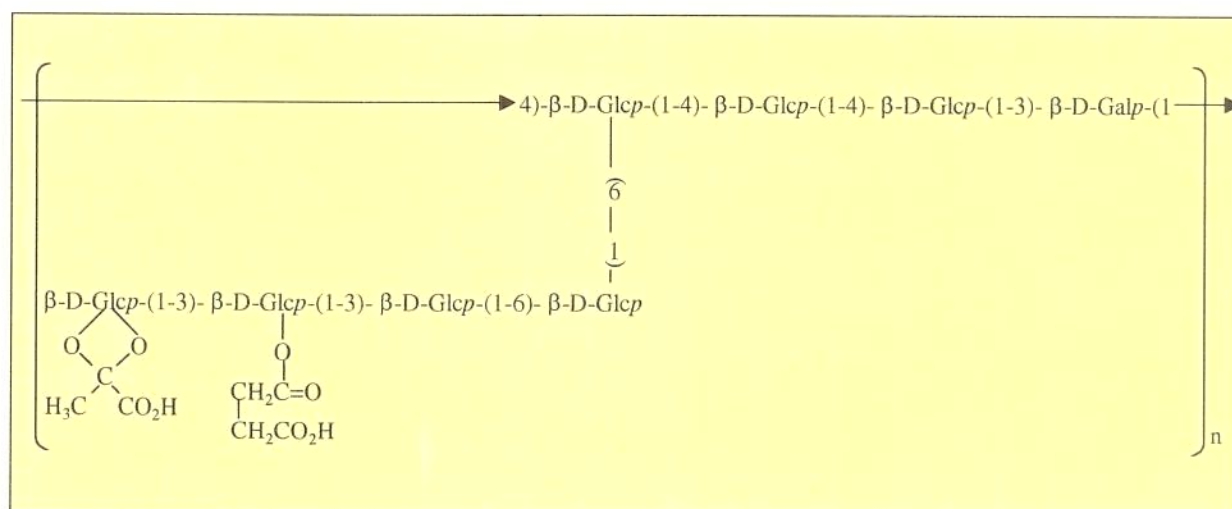


Figura 3: Estrutura da unidade de repetição da succinoglucana (Evans et alii, 2000)

mostram viscosidade 1560 e 2500 centipoises, respectivamente, enquanto a forma Na- apresenta viscosidade muito baixa, aumentando significativamente pela adição de sais inorgânicos, especialmente os íons Fe^{3+} e Al^{3+} .

A produção da succinoglicana se dá a partir de um meio quimicamente definido, contendo a glucose como fonte de carbono. Um produtor industrial deste polímero é a Shell (Zevenhuizen, 1997).

2.2.2. Exopolissacarídeo insolúvel: curdulana

Phillips & Lawford (1983b) relataram o isolamento de uma cepa de um *Agrobacterium* sp auxotrófico exigente em uracila por membros da empresa japonesa Takeda Chemical Industries Ltda. O microrganismo foi qualificado como um bom produtor de goma curdulana. O polissacarídeo foi denominado PS 13140 e o mutante, cepa 10C3K-u (sob numeração do Institute for Fermentation of Osaka - IFO 13140, e do American Type Culture Collection - ATCC 21680). Esta cepa foi obtida a partir do tratamento da cepa 10C3K com nitrosoguanidina, um agente mutagênico (Harada et alii, 1993). A partir de cultivos desse mutante induzido, isolou-se um novo mutante, desta vez espontâneo, classificado como um *Agrobacterium* sp (cepa ATCC 31749) (Harada et alii, 1993).

Um polissacarídeo com as características da goma curdulana, denominado PS 13127, foi patenteado, sendo produzido pelo *Agrobacterium radiobacter* (IFO 13127, ATCC 21679). Outros polissacarídeos, semelhantes à curdulana em estrutura, têm sido relatados, como a lentinana, uma β -1,3-D-glucana linear, produzida por *Lentinus elodes* e a esquizofilana, uma β -1,6-D-glucana de *Schizophyllum commune* (Roller & Dea, 1992).

Phillips & Lawford (1983b) apresentaram uma relação de microrganismos produtores de curdulana, mostrada na Tabela 2.

A primeira patente a respeito da produção da curdulana foi registrada em 1968 no Japão (Harada et alii, 1993) e uma segunda foi registrada, em 1973, por Kimura et alii (1973) nos Estados Unidos.

Tabela 2: Microrganismos produtores de goma curdulana

Microrganismo	n° IFO¹	n° ATCC²
<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>myxogenes</i> *	13140	21680
variantes genotípicos		31749
		31750
<i>Agrobacterium</i>	13660	
<i>A. radiobacter</i>	12607	
	12665 wb1	
	13127	
variante genotípico	13126	
<i>A. radiobacter</i>	13256	
<i>A. radiobacter</i>	13259	

* Atualmente denominado *Agrobacterium* sp

¹ Institute for Fermentation of Osaka, Japão

² American Type Culture Collection, Estados Unidos

Fonte: Phillips & Lawford (1983b)

2.2.2.1. Isolamento e seleção de microrganismos produtores de curdulana

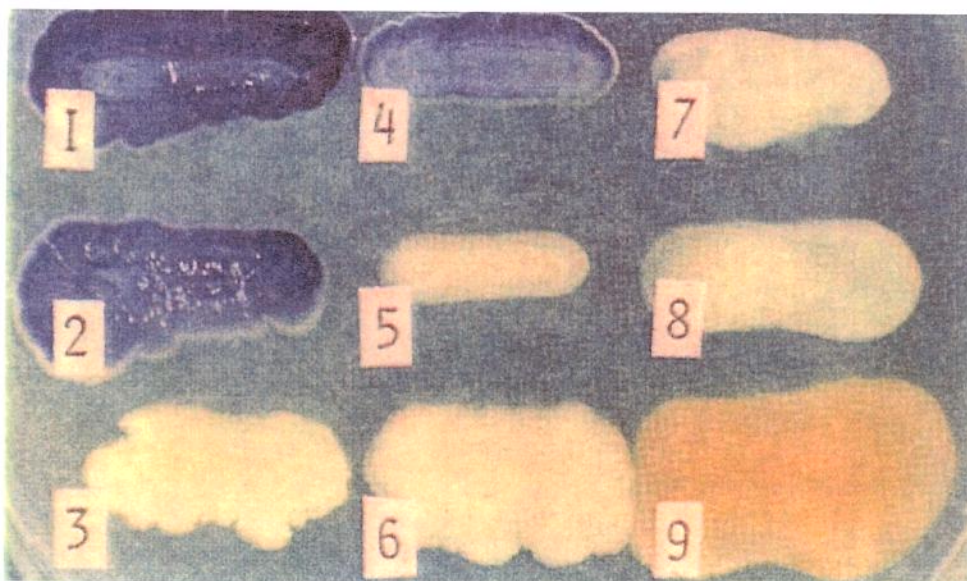
O primeiro passo para o isolamento e seleção de microrganismos é a definição de que tipo de microrganismo se pretende obter (bactéria ou fungo) e de que tipo de material se deve partir para seu isolamento (Hunter-Cevera et alii, 1986). Conhecendo-se as características do microrganismo que se deseja e o habitat natural é possível definir uma estratégia para seu isolamento. No isolamento de bactérias, sempre que possível, coletam-se assepticamente as amostras do material que são analisadas logo em seguida. Os meios de cultivo empregados são os mais variados, dependendo das características do metabolismo microbiano e das condições ambientais em que se desenvolve. Todos os meios devem conter agentes anti-fúngicos incorporados, como a cicloheximida ou nistatina, na quantidade aproximada de 50 µg/mL para retardar o aparecimento de fungos. Sempre que possível, empregam-se técnicas de enriquecimento ou a utilização de algum composto que facilite a posterior seleção do microrganismo desejado (Hunter-Cevera et alii, 1986).

Com a finalidade de definir um meio para o isolamento e seleção de microrganismos mutantes produtores de curdulana, Harada (citado por Phillips & Lawford, 1983b) desenvolveu um método de plaqueamento das amostras em ágar contendo etilenoglicol como única fonte de carbono e pequena proporção (cerca de 0,05%) do corante Azul Anilina. As cepas produtoras de curdulana aparecem tingidas com o corante.

Nakanishi et alii (1974; 1976) observaram que as colônias formadas pelos microrganismos produtores de polissacarídeos contendo ligações glicosídicas β -1,3 eram seletivamente coradas com o corante Azul Anilina quando cresciam num meio quimicamente definido. Em seus experimentos verificaram que os microrganismos capazes de formar polissacarídeos do tipo curdulana crescem num meio com glucose contendo o corante (ilustrado na Figura 4). Segundo os autores, o Azul Anilina reage especificamente com β -1,3-glucanas, incluindo os polissacarídeos do tipo curdulana, paquimana e glucana de levedura, para formar um complexo estável de cor. A falta de reação com outras β -1,3-glucanas, como a laminarana, pode ser devido ao pequeno tamanho da molécula. A partir destas observações, sugeriram que o método de coloração com o Azul Anilina poderia ser utilizado com sucesso no isolamento e seleção de microrganismos produtores de polissacarídeos contendo ligações glicosídicas β -1,3, como a curdulana. Nakanishi et alii (1976) também estudaram um meio de cultura contendo o Vermelho Congo, que também foi capaz de corar os microrganismos produtores de curdulana (Figura 5).

2.2.2.2. Via biossintética para obtenção da curdulana

Muitos microrganismos produzem grandes quantidades de polissacarídeos sob determinadas condições. Cheesman & Brown (1995) afirmam que as β -1,3 glucanas estão envolvidas na estrutura celular e podem atuar como fonte de alimento tanto para bactérias, como para fungos e plantas superiores. Os EPS são, geralmente, considerados metabólitos secundários, produzidos quando uma fonte de carboidratos está presente em excesso (Pace & Righelato, 1980).



1 . *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* NTK-u IFO 13140; 2 . *A. faecalis* var. *myxogenes* 10C3K; 3 . *Aerobacter* sp; 4 . *Agrobacterium radiobacter*, IFO 13127; 5 . *Agrobacterium tumefaciens*, IFO 3058; 6 . *Serratia piscatorum*, IFO 12527; 7 . *Agrobacterium radiobacter*, IFO 12664; 8 . *Rhizobium japonicum*, IFO 13338; 9 . *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459

Figura 4: Aspecto das colônias de microrganismos produtores de polissacarídeos sobre ágar contendo Azul Anilina (Nakanishi et alii, 1976)



Figura 5: Aspecto das colônias de microrganismo produtor da goma curdulana sobre ágar contendo Vermelho Congo (Nakanishi et alii, 1976)

Os metabólitos secundários são definidos como compostos sintetizados pelos microrganismos quando as células crescem lentamente ou cessam o crescimento. Seu papel no crescimento e metabolismo do microrganismo nem sempre é definido. Alguns autores numeram possíveis funções dos exopolissacarídeos para o microrganismo. Trevan et alii (1990) listam: proteger o microrganismo contra a dessecação, atuar como barreira, impedindo a união de vírus ou anticorpos, complexar ou neutralizar toxinas ou íons metálicos tóxicos, atuar como fonte de carbono e energia. Pace (1991) acrescenta: interagir com células animais ou vegetais em relações específicas, simbióticas ou patogênicas. Demain (2000) destaca a importância dos metabólitos secundários para o microrganismo também como efetivos na diferenciação microbiana.

São conhecidos dois mecanismos distintos para a síntese dos polissacarídeos microbianos: o processo extracelular, como o usado na formação da dextrana através da enzima dextrano-sacarase, excretada pelo *Leconostoc mesenteroides*, e o processo intracelular, após o qual há excreção do polímero ou de suas subunidades para polimerização no exterior da célula. Este último é o processo de biossíntese mais comum entre os EPS microbianos, como as gomas xantana e curdulana (Pace & Righelato, 1980; Sutherland, 1993 e 2001).

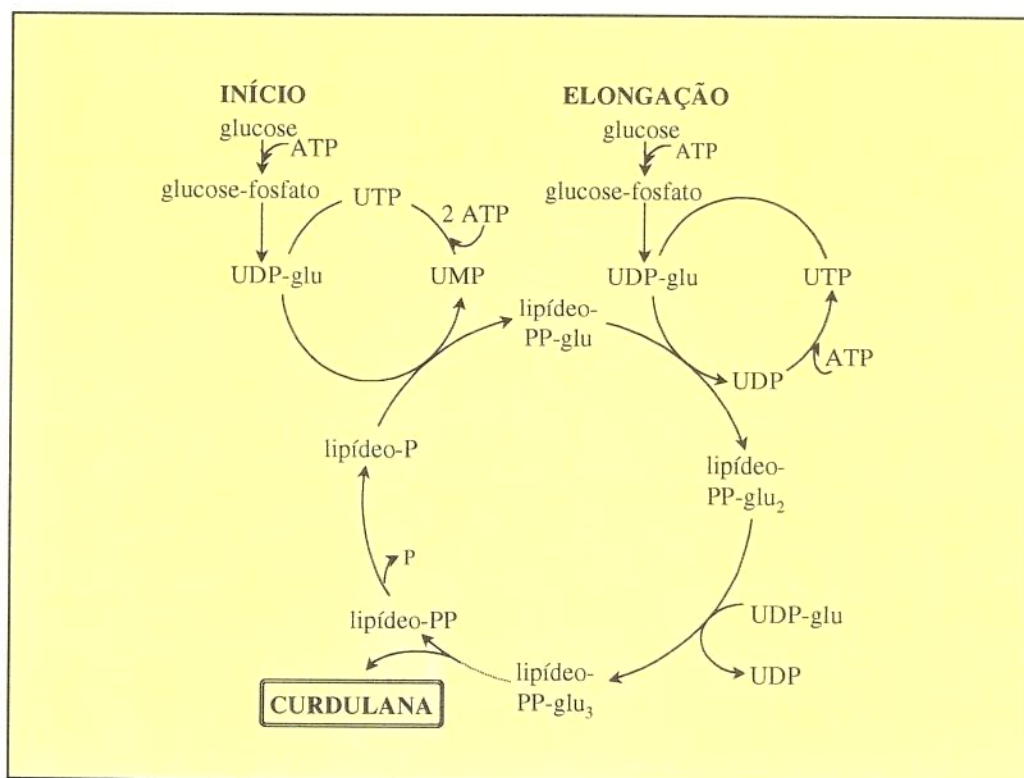
De acordo com Pace & Righelato (1980), a síntese celular dos EPS ocorre através de sistemas enzimáticos e seus precursores são nucleosídeo-difosfato-açúcares (NDP-açúcares). Os sistemas enzimáticos são análogos àqueles envolvidos na síntese dos polissacarídeos da parede celular. Os açúcares de unidades repetitivas, na forma NDP-açúcares, são adicionados sequencialmente, através de transferases específicas, a lipídeos isoprenóides, que são ésteres fosfatos dos álcool-fosfato-isoprenóides de cadeia longa (Pace & Righelato, 1980 e Lehninger, 1987). Estes lipídeos isoprenóides são os responsáveis pelo transporte das unidades repetitivas que formam o polissacarídeo do interior para o exterior da membrana celular (Phillips & Lawford, 1983b). O mecanismo pelo qual as unidades são adicionadas para a elongação da cadeia ainda não está bem esclarecido (Pace & Righelato, 1980). Sutherland (citado por Pace & Righelato, 1980) sugeriu que a disponibilidade dos álcool-fosfato-isoprenóides carreadores é o que determina a taxa da síntese de EPS. O autor afirmou que haveria competição, durante a fase de crescimento celular, entre a síntese da

parede celular e a síntese dos exopolissacarídeos pelos carreadores específicos. Por este motivo, na fase exponencial de crescimento microbiano, a síntese de exopolissacarídeos seria baixa. Mais tarde, Phillips & Lawford (1983b), após exaustiva revisão, propuseram que a competição pelos lipídeos isoprenóides entre a produção dos compostos da parede celular e a síntese de EPS é pequena. Isto justifica a afirmação de que a curdulana é produzida através do metabolismo secundário e sua biossíntese acontece, principalmente, após o crescimento celular, associada à fase estacionária, devido à exaustão de nitrogênio (Phillips & Lawford, 1983b e Harada, Terasaki & Harada, 1993).

A Figura 6 mostra uma modificação da via biossintética sugerida por Phillips & Lawford (1983a; 1983b) a partir do apresentado por Sutherland (citado pelos autores) para a produção da curdulana. Segundo o esquema proposto, a biossíntese pode ser descrita:

- início do processo, com o consumo de três moléculas de adenosina trifosfato (ATP) na ativação da glucose e formação da uridina-difosfato-glucose (UDP-glu) (um NDP-açúcar);
- sob a ação de um lipídeo isoprenóide (Sutherland, 2001), o processo de elongação se dá pela adição sequencial da glucose, sempre ativada na forma de UDP-glu. Por este mecanismo, duas moléculas de ATP são necessárias sempre que um resíduo de glucose é polimerizado;
- excreção de sub-unidades através do complexo membrana/parede celular e sua junção no meio externo, também com a participação do lipídeo isoprenóide. O número de unidades de glucose excretadas para o exterior da célula não é definido pelos autores Phillips & Lawford (1983a; 1983b).

A fonte de carbono (glucose) utilizada na produção da goma, segundo Phillips & Lawford (1983b), não está envolvida no crescimento celular. A demanda de carbono envolvida na elaboração do polímero não está associada, portanto, à demanda de energia para a manutenção do microrganismo. A energia necessária para os diferentes processos celulares é derivada da fosforilação oxidativa durante a oxidação da glucose a dióxido de carbono. As espécies de *Agrobacterium*, como a linhagem IFO 13140 do *Agrobacterium* sp, são capazes de oxidar a glucose através da via glicolítica (Embden-Meyerhof).



ATP: Adenosina Trifosfato

UMP, UDP e UTP: Uridina Mono, Di e Trifosfato

Modificação do esquema proposto por Sutherland (citado por Phillips & Lawford, 1983a e 1983b)

Figura 6: Via biossintética para a produção da curdulana sugerida por Phillips & Lawford (1983a e 1983b)

Entretanto, Arthur et alii (1975, citado por KAI et alii, 1994), verificaram que algumas espécies de *Agrobacterium* não utilizam a via de Embden-Meyerhof. Estas espécies, entre elas o *Agrobacterium* sp ATCC 31749, utilizam com frequência o ciclo das pentoses e via de Entner-Doudoroff no catabolismo da glucose.

Quanto à glucose empregada na biossíntese da curdulana, Kai et alii (1993 e 1994) sugeriram vias diferentes:

- síntese direta a partir da glucose adicionada no meio, incluindo a formada por neogênese (produzida durante o metabolismo microbiano) e formação da goma sem rearranjo de trioses;
- recombinação de trioses resultantes da quebra da glucose com rearranjo do grupamento fosfato de C-1 para C-3;
- recombinação de triose isomerizada (C-6 para C1) da glucose através da via de Embden-Meyerhof;
- formação da curdulana a partir da frutose-6-fosfato reconstruída acompanhada da transferência do C-2 para C-1 e C-3 através do ciclo das pentoses;
- recombinação do C-4 para C-1, C-2 e C-3 e
- neogênese da glucose a partir de fragmentos formados nas várias etapas da glicólise.

Estas conclusões foram obtidas a partir de estudos com o *Agrobacterium* sp (ATCC 31749).

2.2.2.3. Condições de cultivo para a produção da curdulana

Os exopolissacarídeos podem ser produzidos a partir de compostos químicos que se apresentam na forma purificada, consideravelmente caros, ou que estejam presentes em fontes mais baratas e disponíveis, na forma não purificada. O maior ou menor grau de pureza dos substratos utilizados reflete na produção do polímero, cujo rendimento depende da capacidade do microrganismo. A natureza da matéria-prima pode apresentar problemas de produção, especialmente se contém compostos inibidores do crescimento microbiano ou substâncias muito coloridas, como no caso da água negra ('alpechin'), um resíduo da

indústria extrativa de azeite de oliva (Sutherland, 1996). Schwartz & Bodie (1985) verificaram que a utilização deste resíduo no meio de produção da goma xantana por *Xanthomonas campestris* levou a um prolongamento no tempo cultivo do microrganismo e, em consequência disto, a reversão na capacidade da cepa em elaborar o polissacarídeo

Muitos estudos têm avaliado a influência das condições de cultivo na produção e composição de polissacarídeos microbianos. Apesar disto, pouco é conhecido a respeito dos fatores que influenciam na sua qualidade. Esta afirmação foi feita por Guillouet et alii (1999) ao estudarem a produção do polissacarídeo zooglana (constituído por glucose, galactose, acetato, piruvato e succinato) pela bactéria Gram negativa *Zoogloea ramigera*.

Alguns compostos químicos, além dos substratos usuais (como fonte de carbono e nitrogênio), podem ser considerados essenciais para o crescimento e/ou produção de polissacarídeos por microrganismos. Vernami et alii (1995) identificaram o CaCO_3 e o MgSO_4 como essenciais para a produção do polissacarídeo de *Azotobacter vinelandii* MTCC. Segundo os autores a ausência do MgSO_4 não afeta o crescimento microbiano, mas o CaCO_3 é indispensável para a obtenção do inóculo.

Nas condições de produção industrial dos polissacarídeos microbianos devem-se aplicar os mesmos princípios empregados no laboratório. Entretanto, o uso de substratos mais baratos e disponíveis, pode levar a diferenças significativas no rendimento e qualidade do produto (Sutherland, 1996).

Na seqüência, são apresentadas as condições determinadas em escala laboratorial para a elaboração da curdulana por meio de fermentação microbiana.

a) Fonte de Nitrogênio

O nitrogênio é empregado como o nutriente limitante do crescimento microbiano e que estimula a formação dos exopolissacarídeos microbianos (Sutherland, 1996).

Harada et alii (citados por Harada et alii, 1966) observaram uma produção de cerca de 50% de rendimento sobre os 5% de glucose empregados, nos meios de cultura contendo 0,75% de extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Quando se utilizou a peptona, a produção decresceu.

Com o objetivo de avaliar fontes inorgânicas de nitrogênio, Harada et alii (1966) produziram a goma em meio contendo 4% de glucose, como fonte de carbono, sais nutrientes e as fontes de nitrogênio: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , KNO_3 e uréia. O microrganismo utilizado foi a cepa 10C3K do *Agrobacterium* sp. Com o $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$, KNO_3 ou uréia, grandes quantidades de glucose foram utilizadas pelo microrganismo e o pH final manteve-se entre 6,2 e 7,7. Para os demais compostos empregados uma menor proporção da glucose foi consumida (cerca de 1/3 do total) e o pH final manteve-se menor, entre 4,4 e 4,8. Quanto à produção da goma curdulana, nos meios em que o microrganismo melhor utilizou a glucose, os rendimentos foram de 48, 36 e 38% sobre o açúcar, respectivamente para as três fontes de nitrogênio ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$, KNO_3 e uréia). Nos meios contendo os outros cinco sais inorgânicos, nos quais o valor final do pH foi mais baixo, pouca quantidade do polissacarídeo foi acumulada, com rendimentos entre 1,4 e 2,9%. Para as condições estudadas, o $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ foi a melhor fonte de nitrogênio. A partir desses resultados, os autores determinaram como concentração ótima de nitrogênio valores próximos a 0,03%.

b) Fonte de carbono

A curdulana é produzida com elevado rendimento num meio onde um carboidrato é a principal fonte de carbono.

Na literatura consultada não há indicação da concentração limitante da fonte de carbono. A partir dos dados levantados, a concentração do carboidrato empregado varia, de acordo com as condições de produção, de 4 a 10%. A glucose é o carboidrato mais utilizado, em diferentes concentrações: 4% para Nakanishi et alii (1976), 8% ou 6% para Harada (1972; 1974), com rendimento de cerca de 50% de goma sobre a massa da fonte de carbono. Lee et alii (1997c) obtiveram excelentes resultados com a utilização de 10% maltose (com 48% de rendimento) e sacarose (com 47% de rendimento) como fonte de carbono na composição do meio de produção. Para a mesma concentração de glucose, nas condições avaliadas, esses autores encontraram 40% de rendimento. Também empregaram, com menores rendimentos, frutose, galactose, lactose e rafinose. Esses autores preconizaram, como uma fonte econômica de carboidrato, o melaço de cana-de-açúcar. O

melaço, após tratamento, foi empregado num sistema descontínuo alimentado, com rendimento de cerca de 0,35 g de curdulana por g de açúcares totais consumidos.

c) pH

Diferentes valores de pH são citados na literatura como ótimos para a produção da goma curdulana. Entre eles: pH 5,0 (Harada, 1972), pH 6,0 (Harada et alii, 1993). Nas diferentes referências é consenso a necessidade da adição de um composto que atue como tampão. Na produção da curdulana, o CaCO_3 é usado comumente com este objetivo.

d) Outros compostos

A adição de traços de sais é indispensável na produção da goma curdulana. O manganês (II) e o ferro (III) (geralmente até 10 mg/L) são essenciais para um alto rendimento em curdulana (Kimura et alii, 1973). Além destes compostos, sais de zinco, cobalto e magnésio são citados na literatura. Estes compostos, adicionados em quantidades traço, são importantes para o metabolismo microbiano como cofatores enzimáticos (Lehninger, 1987).

A aeração do meio de produção se faz necessária, já que o microrganismo é aeróbio estrito. Harada & Harada (1996) relatam que para cada 2 moles de ATP consumidos no processo de biossíntese, 0,5 mol de oxigênio é requerido. Lawford & Rousseau (1991) indicam uma saturação de 86% de ar no meio de cultivo a 1 atm, o que implica uma quantidade em oxigênio dissolvido de 6,5 mg/L.

2.2.2.4. Processos empregados na produção da curdulana

a) Processo descontínuo

O processo descontínuo ou em batelada é o tradicionalmente utilizado na elaboração industrial da goma curdulana. O meio de cultura proposto na patente registrada por Kimura et alii (1973) para a produção a partir do *Agrobacterium* sp NTK-u, derivado do 10C3K-u é o seguinte (g/100 mL): glucose, 10,00; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,23; KH_2PO_4 , 0,10; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,005; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,002; ZnCl_2 , 0,001; CoCl_2 , 0,001; CaCO_3 , 0,30; uracila, 0,01.

De acordo com Harada et alii (1973) as células microbianas podem produzir a curdulana a partir de açúcares, através de cultivo descontínuo, sempre que baixas concentrações de sais inorgânicos estão presentes e o pH é ajustado para valores entre 6,0 e 7,0. Com a utilização de 4,0 g de glucose, estes autores verificaram uma concentração celular de 100 mg de células em 100 mL de meio de crescimento em três dias de cultivo. Nestas condições, o rendimento em goma curdulana foi de 1,2 g (o que corresponde a 30% de rendimento). O tempo para a produção é de 4 a 5 dias, segundo os autores.

b) Processo contínuo

Em escala laboratorial, um processo contínuo em dois estágios foi avaliado para a produção da curdulana pela cepa ATCC 31749 do *Agrobacterium* sp. O tempo de operação foi de 500 horas, utilizando-se dois fermentadores em série, com volume constante. O microrganismo cresceu aerobicamente num meio com limitação de nitrogênio. O efluente do primeiro fermentador foi introduzido diretamente no segundo fermentador, que foi alimentado simultaneamente com solução de glucose numa vazão fixa. A concentração em biomassa obtida no segundo estágio foi de 4 g/L e a curdulana produzida de 10 g/L, com uma produtividade de 0,05g curdulana/g células/h. A eficiência na conversão da glucose foi verificada como 42% (Lawford & Phillips, 1982). Phillips & Lawford (1983b) verificaram a mesma eficiência na conversão da glucose, a partir do mesmo processo em dois estágios, com a produção de 2,8 g/L e 7,0 g/L em células e goma curdulana, respectivamente.

2.2.2.5. Recuperação da goma curdulana

A recuperação da curdulana tem como base suas características de solubilidade em meio alcalino. Um processo industrial para produção e recuperação está esquematizado na Figura 7.

2.2.2.6. Estrutura química e propriedades físicas e físico-químicas

Diversos estudos independentes têm definido as propriedades tanto da curdulana, como de suas suspensões e géis.

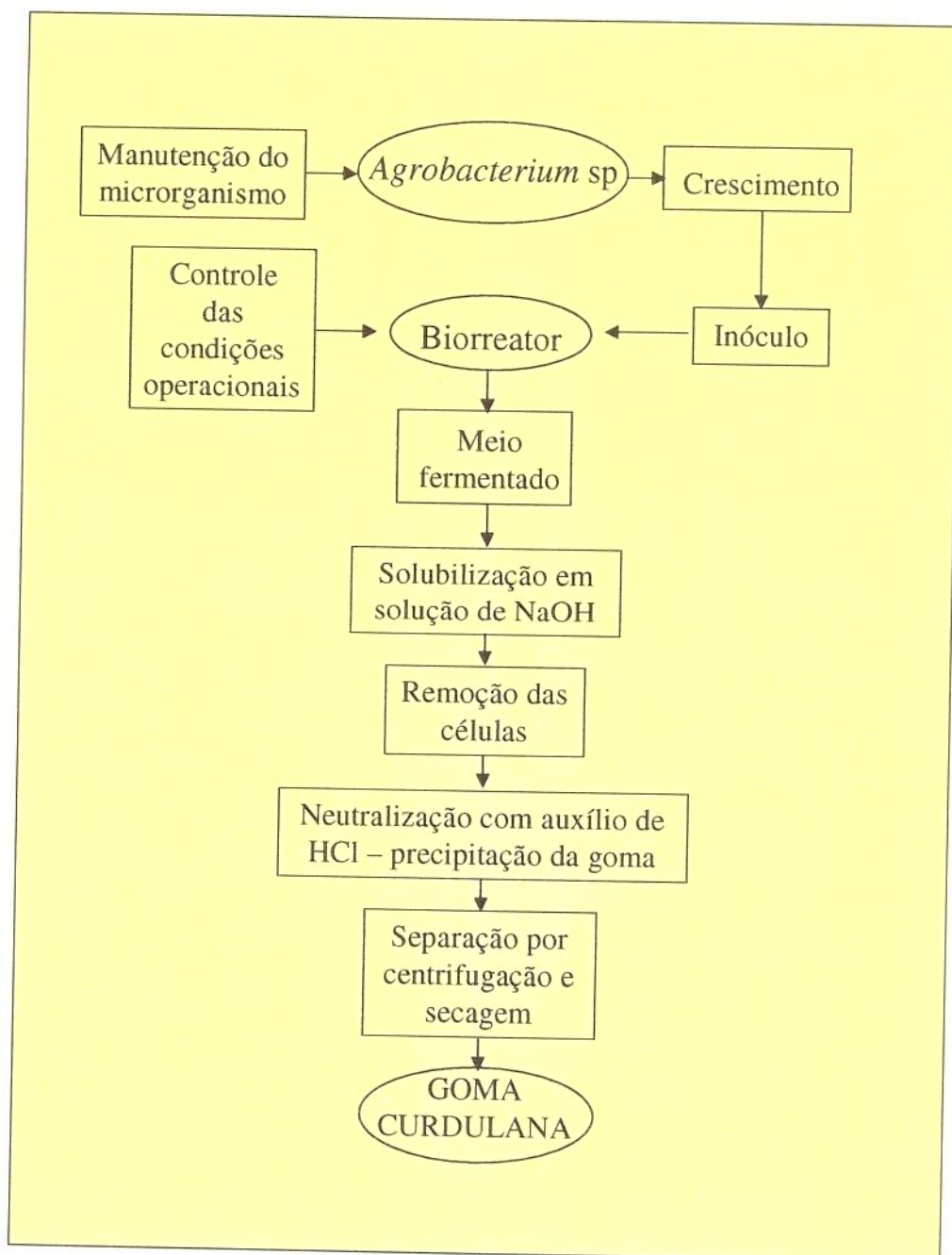


Figura 7: Representação esquemática do processo de produção e recuperação da curdulana (adaptado de Harada, 1972)

a) Estrutura química

Mais de 99% das ligações encontradas entre as moléculas de D-glucose na curdulana são do tipo β -1,3-glicosídicas (Figura 8). Após oxidação e redução do polímero (grau de polimerização 455 - GP₄₅₅) com borohidrato, encontrou-se glucose e glicerol, numa proporção de 125-130:1. Após hidrólise ácida, concluiu-se que o polímero é essencialmente não ramificado (linear), embora possua algumas ligações glicosídicas 1,6 no interior da molécula (Harada et alii, 1968)

O GP_n do polímero, mesmo após longo período de produção, não difere porque o microrganismo não é capaz de produzir β -1,3-glucanase durante o cultivo.

b) Formação do gel e associação molecular

Um gel consiste numa fase dispersa (polissacarídeo ou proteína) em um meio dispersante (geralmente a água). Nos últimos anos, muito do mecanismo de gelificação de polissacarídeos tem sido esclarecido (Nishinari et alii, 2000).

A formação dos géis de polissacarídeos neutros, como a curdulana, é um fenômeno muito interessante. A curdulana forma dois tipos de gel: um por neutralização de uma solução alcalina ou aquecimento da suspensão aquosa a temperaturas inferiores a 80°C (geralmente próximo a 60°C) e outro por aquecimento a temperaturas superiores a 80°C. As suspensões de curdulana, quando aquecidas, tornam-se soluções claras em temperaturas próximas a 55°C e formam um gel quando resfriadas, gel denominado "low-set". A temperaturas mais elevadas, as suspensões formam um gel mais firme e forte, denominado gel "high-set". A curdulana também forma um gel quando soluções alcalinas são dializadas contra água destilada ou neutralizadas com ácidos. Este gel é semelhante ao formado a baixas temperaturas. A estrutura e características dos dois tipos de gel são diferentes (Kanzawa et alii, 1989).

A força do gel é independente do tempo de aquecimento, mas dependente, sobretudo, da temperatura que se emprega. Assim, os géis obtidos do aquecimento de suspensões em temperatura adequada, mesmo com tempos de aquecimento diferentes, apresentam a mesma força (Harada, 1972).

Na formação do gel, a importância das pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares foi avaliada por Harada (1972). Este autor sugeriu que, na temperatura para início da formação do gel, algumas ou todas as pontes de hidrogênio são quebradas favorecendo a hidratação, com subsequente formação do gel. Portanto, segundo o autor, o rompimento de pontes de hidrogênio pode ser essencial para a formação do gel. Estas conclusões foram obtidas a partir de estudos de formação do gel na presença de compostos capazes de facilitar a formação de pontes de hidrogênio ou de rompê-las. Se uma suspensão a 1% do polímero é aquecida na presença de uréia, um agente que rompe pontes de hidrogênio, a temperatura de início da formação do gel é menor. Numa concentração 2M de uréia, a força do gel é bastante elevada, diminuindo quando esta concentração ultrapassa 2M. Um composto que acelera a formação de pontes de hidrogênio, como o etilenoglicol, também exerce efeito sobre a formação do gel. A temperatura para início da formação do gel decresce na presença deste composto em concentração até 5M. Entretanto, em concentrações elevadas do etilenoglicol (5 a 7 M), o gel não é formado (Harada, 1972).

Os dois tipos de gel são formados por diferentes mecanismos. As propriedades do gel neutralizado são semelhantes às do gel de agar e carragena. A associação molecular no gel formado por neutralização de uma solução alcalina usando ácido carbônico foi comparada com a associação molecular de géis formados a diferentes temperaturas. O gel neutralizado e o formado a 60°C foi solúvel em NaOH 0,01N, enquanto o gel formado em temperatura acima de 95°C foi solúvel somente em solução alcalina acima de 1N (Kanzawa et alii, 1989).

O gel de curdularia consiste em longas microfibrilas, de 20 a 25 nm de largura, formadas por subunidades de 2 a 3 nm de largura. Quando desintegradas por sonicação, as microfibrilas são convertidas em unidades de fibrila que, com aquecimento, formam fibrilas elementares menores, com 1 a 3 nm de largura (Harada et alii, 1991). As microfibrilas dos géis formados por aquecimento a 120°C são consideravelmente mais largas do que as formadas no gel neutralizado. As unidades microfibrilares são soltas e reassociadas entre si para formar pseudocristais com cerca de 100 nm de comprimento (Harada et alii, 1991). As formas da curdularia por diferentes modificações são representadas na Figura 9.

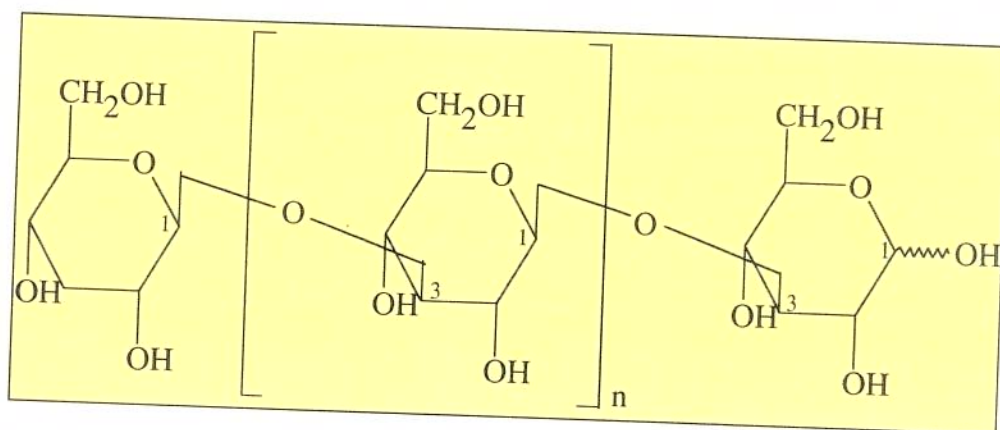
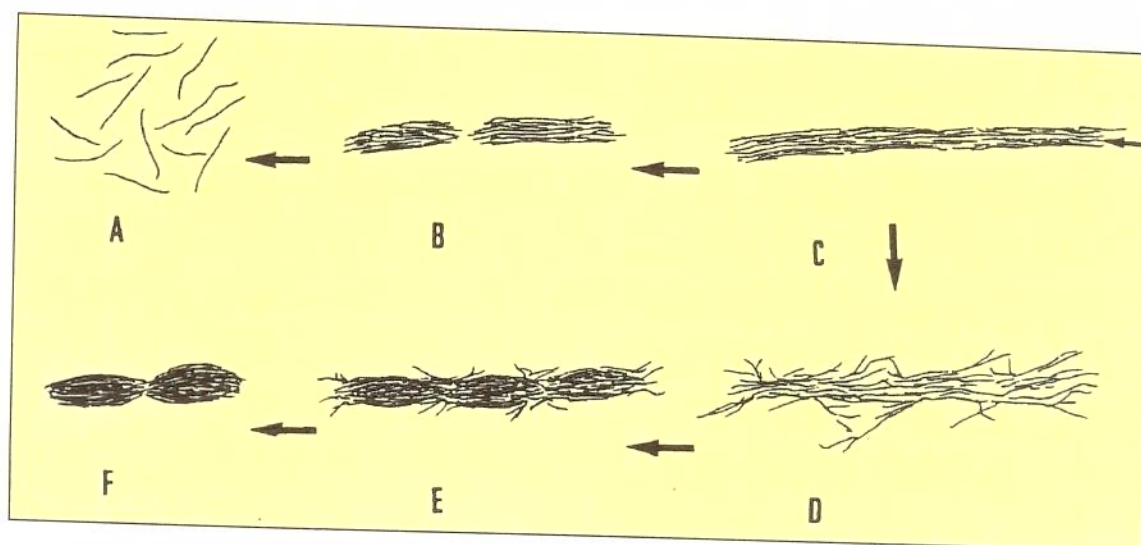


Figura 8: Estrutura química da curdulana; $n \cong 450$ (Harada et alii, 1993)



A: unidades de fibrilas elementares, B: unidades de fibrila, C: microfibrilas (a seta pequena aponta as subunidades de microfibrila), D: estrutura em rede de microfibrila, E: forma pseudocristalina de unidades de fibrilas elementares e microfibrilas, F: forma pseudocristalina. C→B (sonicação), B→A (aquecimento a 55° C), C→D (aquecimento a 95° C), D→E (aquecimento 120° C), E→F (tratamento com β -1,3-D-glucanase ou ácido sulfúrico 32% a 32° C).

Figura 9: Representação esquemática das formas da curdulana, segundo Harada et alii (1991)

de que a conformação principal da curdulana no estado de gel é a hélice tríplice. O gel de curdulana se assemelha ao de amilose, exceto pelo fato de apresentar hélice tríplice, enquanto a amilose apresenta hélice dupla (Saitô, 1989).

Fulton & Atkins (citados por Harada et alii, 1991) formularam uma hipótese para o mecanismo de gelificação a partir de estudos de difração de raio X e espectroscopia na região do infravermelho. Eles enfatizaram a importância das hélices tríplices da molécula estarem ligadas por pontes de hidrogênio à água intersticial de cristalização.

Os géis formados pela goma curdulana apresentam menor ou maior porcentagem de sinerese, dependendo da concentração da suspensão e da temperatura de formação. Harada, Terasaki & Harada (1993) descreveram que, com o aumento da concentração da suspensão e da temperatura de formação do gel há menor porcentagem de sinerese, efeito também observado por Nishinari et alii (1998). Kanzawa et alii (1987) observaram maior grau de sinerese no gel formado por neutralização de uma solução alcalina, em comparação com o gel formado por aquecimento da suspensão aquosa.

c) Propriedade de fusão do gel de curdulana

Os géis produzidos com a goma curdulana, em temperaturas superiores a 54°C, não fundem mesmo com temperatura de fervura. Quando se aumenta a temperatura, em torno dos 120°C, não se observam mudanças visíveis nos géis. Entretanto, quando a temperatura atinge valores próximos a 130°C, observa-se uma ligeira mudança, com uma maior clarificação dos géis. Em temperaturas mais elevadas os géis tendem a fundir, regenerando-se com o resfriamento. Segundo Kuge et alii (1977), a temperatura em que o gel é fundido está relacionada ao GP_n do polissacarídeo e à sua concentração no gel. Após experimentações, estes autores afirmaram que, quanto maior o GP_n e maior a concentração, mais alto é o ponto de fusão do gel. Encontraram um menor valor de 139,0°C (para a concentração de 1,0% e GP_n 125) e um maior valor de 158,5°C (para a concentração de 5,0% e GP_n 462).

d) Rotação óptica

Mudanças nos valores de rotação óptica são freqüentemente observadas como consequência de uma alteração conformacional do polissacarídeo. Os valores de rotação

óptica específica das soluções de curdulana variam com o solvente empregado: $[\alpha]_D + 18$ ($c=1,0$, em NaOH 0,1N) para Harada (1972), ou $[\alpha]^{22}_D + 31^\circ \pm 6^\circ$ ($c=1,0$ em NaOH 0,1N) para Kimura et alii (1973), $[\alpha]^{22}_D - 17^\circ \pm 3^\circ$ ($c=1,0$ em dimetil sulfóxido), $[\alpha]^{22}_D + 22^\circ$ ($c=2,0$ em HCOOH). Estes valores variam, também, com a cepa microbiana utilizada na produção do polímero (Kimura et alii, 1973).

e) Massa molecular

De 44.000 a 77.000, quando determinado por espectrometria de espalhamento de luz em dimetilsulfóxido, tendo de 250 a 480 unidades de glucose. Da mesma forma que para a rotação óptica, os valores da massa molecular estão relacionados com as características da cepa produtora (Kimura et alii, 1973).

f) Absorção no infravermelho

De acordo com Kimura et alii (1973) o polissacarídeo apresenta algumas bandas significativas quando analisado por espectrometria no infravermelho: 3600 - 3200 (S), 2950 - 2900 (M), 1640 (M), 1420 (M), 1365 (M), 1310 (Sh), 1260 (Sh), 1200, 1160, 1120, 1100, 1080, 1070, 1040, 1020, 980 e 890. Esta última banda, também observada por Harada et alii (1968), em 890 cm^{-1} , segundo Seguchi & Kusunose (2001) é característica de ligação do tipo β .

g) Solubilidade

Na água fria a curdulana é insolúvel, apesar de intumescer. É solúvel em soluções alcalinas, em ácido fórmico, em dimetil sulfóxido (Harada et alii, 1991), em soluções aquosas saturadas de uréia ou tiouréia, e em 25% de iodeto de potássio (Harada et alii, 1993).

As propriedades de gelificação da curdulana são diferentes quando se emprega água ou solução alcalina para formar o gel (Funami et alii, 2000).

h) Hidrofilicidade e lipofilicidade

Seguchi & Kusunose (2001) estudaram o efeito do aquecimento a diversas temperaturas sobre a associação da curdulana com água ou óleo. Os autores afirmaram que, sem tratamento térmico, os grânulos de curdulana intumescem facilmente em água. Com

um tratamento térmico do produto seco, à medida em que se aumenta a temperatura (até 120°C/5 h), os grânulos diminuem a capacidade de intumescer em água e se tornam hidrofóbicos, ligando-se mais facilmente ao óleo. Isto acontece, segundo os autores, devido a existência de um filme proteico na superfície dos grânulos (foi encontrado aproximadamente 0,46% de proteína na curdulana crua). Segundo Seguchi & Kusunose (2001) após o tratamento dos grânulos de curdulana com uma enzima proteolítica houve perda na afinidade com óleo pelo tratamento térmico.

2.2.2.7. Especificações do produto comercial

A 53^a sessão do Comitê sobre Aditivos Alimentares da FAO/WHO (JECFA, 1999) estabelece as especificações para a goma curdulana. Algumas características e propriedades determinadas para o produto comercial estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3: Algumas características e propriedades estabelecidas para a curdulana

Característica/Propriedade	Especificação/Valor
Número C.A.S.	54724-00-4
Doseamento (%)	≥ 80 (calculado como glucose)
Descrição	Pó branco ou quase branco, sem odor ou quase sem odor
Aplicações funcionais	Agente de firmeza, agente gelificante, estabilizante, espessante
Solubilidade	Insolúvel em água e etanol, solúvel em álcali
Força do gel	Não menos que 600 g/cm ² (2% em suspensão aquosa)
pH	6,0 - 7,5 (1% em suspensão aquosa)
Umidade (%)	≤ 10
Cinzas (%)	6
Nitrogênio (%)	0,3
Metais pesados	0,5 ppm
Coliformes fecais	não mais que 1 UFC/g

UFC: unidade formadora de colônia

Fonte: JECFA, 1999

2.2.2.8.Toxicidade

Entre 1971 e 1972, a indústria Takeda deu início aos testes para determinação de efeitos carcinogênicos, efeitos sobre a reprodução e atividade metabólica em animais e humanos. Também se realizaram estudos a respeito da patogenicidade dos microrganismos produtores. A curdulana foi considerada como um composto não tóxico e nutricionalmente inerte. Em 1974, a curdulana foi considerada segura pelo 'International Research and Development Cooperation' dos Estados Unidos (Harada, Terasaki & Harada, 1993).

a) Toxicidade aguda

Aomori & Tanida (citados por Spicer et alii, 1999) realizaram estudos em ratos e concluíram que a curdulana tem uma toxicidade aguda muito baixa, sem ocorrência de morte em ratos machos e fêmeas após administração oral de 10g/kg de peso corpóreo. A dose letal (DL₅₀) para a espécie estudada foi determinada em 2,5-2,75g/kg quando a via de administração foi intraperitoneal. Quando a administração foi oral, a DL₅₀ foi maior que 5g/kg.

b) Toxicidade sub-crônica e crônica

Grupos de ratos foram alimentados por um período de 12 semanas com alimentação contendo 5, 10 e 20% de curdulana na sua constituição. Os animais foram examinados quanto à aparência diariamente, quanto ao peso corporal semanalmente e quanto ao consumo de alimento duas vezes na semana, e a eficácia da alimentação foi calculada. O consumo de curdulana foi de 4,4, 9,0 e 19,1 g/kg/dia nos animais machos que receberam, respectivamente, 5, 10 e 20% e de 5,5, 12,4 e 24,3 g/kg/dia nas fêmeas que receberam as mesmas porcentagens de curdulana na sua dieta. O ganho de peso corporal decresceu e a quantidade de alimento consumido aumentou com o aumento da dose de curdulana. Sendo assim, a eficácia do alimento consumido diminuiu, especialmente nas fêmeas. Os níveis de cálcio e o colesterol total nos animais machos que receberam 20% de curdulana decresceu bastante. Em ambos os sexos, nos grupos que receberam mais que 10%, as globulinas e proteínas totais plasmáticas decresceram. Lesões devido à ingestão de curdulana não foram encontradas em todos os experimentos realizados pela indústria Takeda.

Quando se avaliaram os efeitos da ingestão da curculana a longo prazo, utilizaram-se cães como animais de experimentação. Durante um ano os níveis de ingestão da goma foram 1, 5 e 15% e o gel em concentrações de 40% na dieta dos animais. Os cães foram avaliados diariamente quanto a mudanças na aparência. Outras determinações foram feitas semanalmente. Os animais macho, para todas as concentrações recebidas, tiveram menor ganho de peso quando comparados ao controle. Não foram verificadas alterações físicas, oftálmicas, hematológicas e bioquímicas nos animais avaliados.

2.2.2.9. Aplicações

a) Em alimentos

A curculana é adicionada em alimentos com a finalidade de melhorar, modificar e/ou estabilizar suas propriedades físicas. Também é usada na elaboração de novos produtos alimentícios (Nakao et alii, 1991). Algumas das aplicações apresentadas na literatura consultada estão ilustradas na Tabela 4.

Tabela 4: Aplicações alimentícias para a curculana

Produto	Finalidade do uso	Referência
macarrão tipo miojo	modificar textura	Harada & Harada, 1996; Pszczola, 1997a
produtos de pasta de peixe	modificar textura	Harada & Harada, 1996
gel em camada, aromatizado	formar o gel	Nakao et alii, 1991
produtos de panificação	manter a umidade após resfriamento	Pszczola, 1997a
sorvetes	manter a forma	Pszczola, 1997a
molhos	melhorar a textura	Pszczola, 1997a
produtos cárneos	melhorar a retenção de água	Pszczola, 1997a, Pszczola, 1997b
análogos de creme batido (sem gordura)	melhorar a textura	Harada & Harada, 1996

b) Outras aplicações

Além do emprego como aditivo alimentar, a goma curdulana têm sido muito estudada para outras aplicações, especialmente na área médica. Algumas destas aplicações podem ser observadas através da Tabela 5.

Tabela 5: Aplicações não alimentícias para a curdulana

Emprego	Referência
agente anti-HIV	Kaneko et alii, 1990, Gao et alii, 1997 e 1999
medicamentos com liberação controlada	Kanke et alii, 1992, Kanke et alii, 1995, Kanke, Katayama & Nakamura, 1995
veículo em medicamentos, para liberação de proteínas	Kim et alii, 2000
agente anti-tumoral	Ohya, Nishimoto & Ouchi, 1993; Sasaki et alii, 1978
Sarcoma	Sasaki et alii, 1978
anti-parasitário (<i>Babesia bigemina</i>)	Igarashi et alii, 1998
suporte para eletroforese	Hamase et alii, 1999

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Microrganismos empregados

Duas linhagens da bactéria *Agrobacterium* sp foram adquiridas, na forma liofilizada, do American Type Culture Collection (ATCC 31749, Estados Unidos) e do Institute for Fermentation of Osaka (IFO 13140, Japão). De acordo com Phillips e Lawford (1983b) e ATCC, a linhagem ATCC 31749 é um variante genotípico da linhagem IFO 13140.

3.1.2. Matérias-primas utilizadas na elaboração dos meios para a produção do inóculo e do polissacarídeo insolúvel a partir de *Agrobacterium* sp

Extrato de Levedura Comercial (ELC): adquirido da PRODESA - produto comercial PRONAL LAC, cuja composição declarada pelo fabricante é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Composição do Extrato de Levedura "PRONAL LAC" - PRODESA

Especificação	Valor estimado
Umidade (%)	25,0
Cinzas (%)	9,0 ± 1,0
Gorduras saturadas (%)	0,5 ± 0,5
Sódio (NaCl) (%)	0,5 ± 0,5
Proteína (%)	44,0 ± 1,0
Fibra (%)	2,2 ± 0,5
Carboidrato (%)	25,0 ± 2,0
Calorias (kcal/100g)	2,3 ± 0,5
Ferro (ppm)	2,1 ± 0,5
Cálcio (%)	0,15 ± 0,05

Melaço de cana-de-açúcar: Usina Santa Terezinha S/C - Maringá - Pr, cuja composição aproximada é mostrada na Tabela 7.

Xarope de glucose de mandioca: produto comercial de grau alimentício, cedido pela Indemil Indústria e Comércio de Milho Ltda - Paranaíba - Pr. Nome comercial: **Manicandy® 4084**. Composição declarada pelo produtor apresentada na Tabela 8.

Xarope de glucose de milho: produto comercial de grau alimentício, cedido pela Corn Products Brasil Ingredientes Industriais - Balsa Nova - Pr. Nome comercial: **Excell® 1040**. Composição média, declarada pelo produtor, apresentada na Tabela 8.

Xarope de alta maltose de milho: produto comercial de grau alimentício, cedido pela Corn Products Brasil Ingredientes Industriais - Balsa Nova - Pr. Denominação comercial: **Mor-sweet® 1557**. A composição, declarada pelo produtor está apresentada na Tabela 8.

Tabela 7: Composição aproximada do melaço de cana-de-açúcar

Especificação	Valor estimado (%)
Umidade	11,00
Açúcares totais	81,97
Cinzas	4,01
Materiais nitrogenados	1,05
Outros	1,99

3.1.3. Amostra comercial da goma curdulana

Uma amostra comercial da goma curdulana foi utilizada nas análises de doseamento, solubilidade e espectrometria no infravermelho.

A amostra foi cedida pela empresa "TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD", com sede em Osaka, Japão.

Tabela 8: Características dos xaropes de glucose e maltose de procedência comercial.

Característica	Glucose de mandioca Manicandy®	Glucose de milho Excell®	Maltose de mandioca Mor-sweet®
Substância seca (%)	83,0-84,5	81,0-83,0	85,0
Dextrose equivalente (%)	37-41	38-40	n.d.
pH	4,5	4,5-5,5	4,5-5,5
SO ₂ (ppm)	150	150	n.d.
Dextrose (% b.s.)	16,9	15,0	12,0
Maltose (% b.s.)	13,2	12,0	42,0
Outros açúcares (% b.s.)	69,9	73,0	46,0

n.d.: não determinado

® Marcas registradas de produtos comerciais

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Métodos microbiológicos

3.2.1.1. Esterilização dos meios e materiais para trabalhos assépticos

Todos os materiais empregados nos ensaios microbiológicos e de produção foram esterilizados por meio de vapor úmido (em autoclave) a 121°C por um período de 20 minutos.

Sempre que o meio de cultivo para formação do inóculo microbiano ou produção do polissacarídeo continha um carboidrato como fonte de carbono, procedeu-se sua esterilização em separado dos demais constituintes, com o objetivo de minimizar os efeitos de reações de escurecimento.

3.2.1.2. Reativação dos microrganismos

Os microrganismos liofilizados foram reidratados no meio de crescimento (MC) (g/L): polipeptona, 10,0; extrato de levedura, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 1,0; pH, 7,0 (meio de

cultura indicado por um dos fornecedores das linhagens). Após reidratação, foram semeados em tubos de ensaio, no meio MC acrescentado de 1,50% de agar. Os tubos de ensaio contendo os microrganismos foram incubados em estufa bacteriológica na temperatura de 30°C e o crescimento verificado diariamente.

3.2.1.3.Preservação dos microrganismos no laboratório

Após cultivo no meio MC por 48 horas sob agitação e temperaturas constantes, as suspensões microbianas foram centrifugadas assepticamente e a massa celular ressuspensa em um agente crioprotetor constituído por uma suspensão aquosa estéril a 10,0% (massa/volume) de leite em pó desnatado. As suspensões foram fracionadas em frascos de vidro estéreis com capacidade de 5 mL, sendo ocupado aproximadamente 1/3 do volume de cada frasco. Após congelamento em nitrogênio líquido as suspensões foram liofilizadas num liofilizador da marca Christ Alpha modelo 1-2.

Os ensaios de produção do inóculo e do polissacarídeo foram realizados a partir dos liofilizados reconstituídos no meio MC.

3.2.1.4.Curvas de crescimento microbiano

Cada linhagem microbiana foi cultivada a 30°C no meio líquido (MC) sob agitação de 120 rpm (rotações por minuto) e a suspensão obtida constituiu-se no inóculo para a realização das curvas de crescimento.

As curvas de crescimento foram feitas utilizando-se o meio MC. Cerca de 1,00% (volume/volume) do inóculo de cada microrganismo foi transferido para o MC e incubado, sob agitação de 120 rpm na temperatura de 30°C. A intervalos de tempo pré-estabelecidos foram coletadas amostras para verificação do crescimento microbiano.

O acompanhamento do crescimento foi realizado através da leitura de Absorbância em comprimento de onda 560 nm (DO_{560nm}), contra um branco constituído do meio MC sem inóculo. A partir dos dados de Absorbância foram construídas curvas de crescimento para cada microrganismo.

3.2.1.5. Coloração das colônias bacterianas pelo corante Azul Anilina

Com o objetivo de verificar a capacidade das linhagens disponíveis em produzir β -1,3-glucanas (como o polissacarídeo insolúvel do tipo curdulana), utilizou-se o meio proposto por Nakanishi et alii (1976), contendo (g/100 mL): glucose, 1,00; extrato de levedura, 0,5; Azul Anilina, 0,005; agar, 2,0 e CaCO_3 , 0,15 (com o objetivo de tamponar o meio). A glucose e o corante foram esterilizados em separado. O corante Azul Anilina reage especificamente com β -1,3-glucanas (Nakanishi et alii, 1974; Nakanishi et alii, 1976).

As linhagens microbianas foram semeadas, com auxílio de uma alça de semeadura estéril, na superfície do meio com corante e incubadas a 30°C por 5 dias. O microrganismo desenvolvido foi avaliado quanto à capacidade de incorporação do corante em estudo.

3.2.1.6. Condições de cultivo para os testes de produção do inóculo e do polissacarídeo microbiano

Os experimentos de produção do inóculo e da goma curdulana foram realizados em duplicatas, em frascos do tipo 'Schott' para cultivo microbiano, com capacidade para até 250 mL, contendo 50 mL do meio. A incubação foi feita a 30°C em agitador-incubador de movimento rotatório, a 120 rpm por 60 horas para os ensaios de produção do inóculo e 14-16 dias para os ensaios de produção do polímero, com retiradas periódicas de alíquotas (aproximadamente 1,0 mL) para determinações analíticas.

3.2.1.7. Produção do inóculo microbiano

a) Cultivo num meio base de extrato de levedura comercial (MB)

Inicialmente verificou-se a possibilidade do emprego do extrato de levedura em diferentes concentrações para o crescimento do microrganismo. Utilizou-se o meio base (MB), uma solução preparada com extrato de levedura comercial (ELC), na forma pastosa, nas concentrações: 0,15, 0,30, 0,45, 0,60, 0,75 e 0,90% (calculada em massa seca por 100 mL). O pH foi ajustado para 7,0.

O crescimento microbiano foi acompanhado através de determinações espectrofotométricas periódicas com comprimento de onda a 560 nm ($\text{DO}_{560\text{nm}}$).

b) Efeito do MgSO_4 sobre o crescimento microbiano

De acordo com o fornecedor de uma das linhagens bacterianas, o MgSO_4 (além do extrato de levedura e polipeptona) no meio de cultivo do *Agrobacterium* sp é necessário para seu bom desenvolvimento. A partir deste dado foi estudado o efeito deste sal sobre o crescimento microbiano para elaboração do inóculo, nas mesmas condições descritas no item anterior, com acréscimo de 0,1% de MgSO_4 (quantidade indicada na literatura para o cultivo microbiano). O crescimento microbiano foi acompanhado por determinações espectrofotométricas ($\text{DO}_{560\text{nm}}$) periódicas.

c) Efeito do emprego de diferentes açúcares no crescimento microbiano

Após os testes iniciais com extrato de levedura e sulfato de magnésio, foram realizados diferentes ensaios com o meio MB, nas concentrações 0,45 e 0,60% de ELC, acrescentado dos açúcares: glucose, sacarose ou melaço de cana-de-açúcar, em concentrações: 1,00, 1,50 e 2,00% (massa/volume), com o objetivo de verificar a influência da adição de carboidratos na produção do inóculo. A concentração do melaço de cana-de-açúcar foi calculada com base nos açúcares (carboidratos) totais presentes na amostra. Os ensaios foram acompanhados pelas determinações de carboidratos totais, pelo método fenol-sulfúrico e do crescimento microbiano, através de leitura em espectrofotômetro ($\text{DO}_{560\text{nm}}$).

3.2.1.8. Padronização do inóculo para a produção do polissacarídeo microbiano

Após 60 horas de cultivo em MC, a suspensão microbiana foi centrifugada e lavada duas vezes em água estéril. O último sedimento foi ressuspenso na água estéril em quantidade suficiente para leitura de $\text{DO}_{560\text{nm}}$ de 1,5 (valor pré-estabelecido).

Foi determinada a concentração de inóculo adequada para a produção do polissacarídeo insolúvel a partir das duas linhagens do *Agrobacterium* sp. A suspensão padronizada de cada linhagem foi acrescentada ao meio de produção (descrito na seqüência) nas concentrações (volume/volume): 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0%. Após a fermentação, o polissacarídeo foi recuperado (descrição na seqüência), pesado e o rendimento calculado em termos de massa produzida por massa de carboidrato consumido (% massa/massa).

3.2.2. Métodos para a produção e recuperação do polissacarídeo microbiano

3.2.2.1.Meio para a produção (MP) do polissacarídeo insolúvel microbiano - meio convencional

Os ensaios de produção da goma curdulana foram realizados no meio quimicamente definido descrito por Nakanishi et alii (1976) (MP), apresentado na Tabela 9, com pH ajustado para 7,0.

Tabela 9: Composição do meio de cultura para a produção (MP) do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp

Componente	Quantidade (g/100mL)
Glucose	4,00
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,15
KH ₂ PO ₄	0,10
MgSO ₄	0,05
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .7H ₂ O	0,005
MnSO ₄ .nH ₂ O	0,002
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,001
ZnCl ₂	0,001
CaCO ₃	0,30

Fonte: Nakanishi et alii (1976)

3.2.2.2.Recuperação do polissacarídeo microbiano

Após cada ensaio de produção, o polissacarídeo microbiano insolúvel foi recuperado como esquematizado na Figura 10.

O polissacarídeo recuperado, em cada ensaio, foi pesado e calculou-se o rendimento (em % massa/massa) com base na quantidade de açúcares consumidos durante a produção.

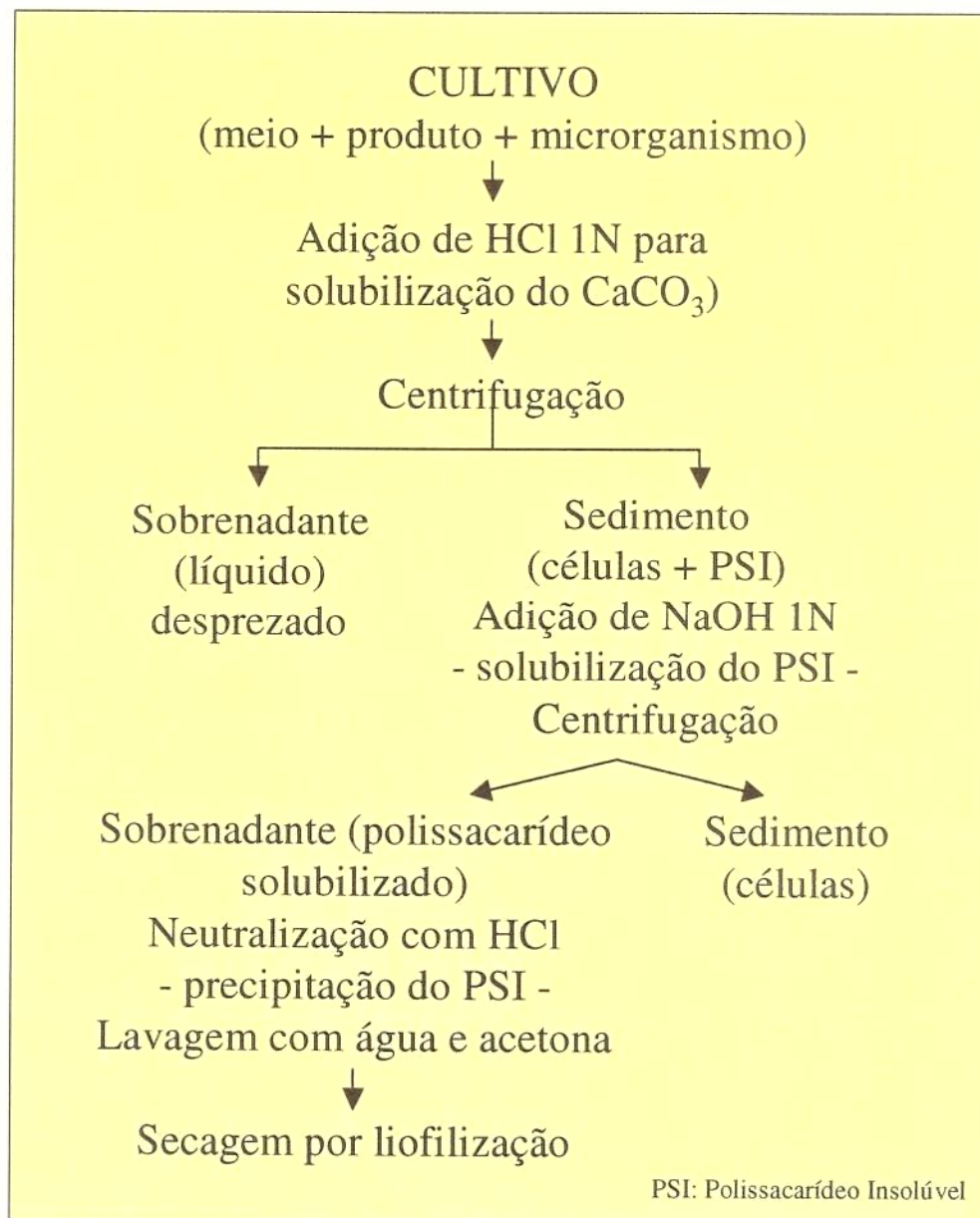


Figura 10: Esquema de recuperação do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp a partir do meio de produção

3.2.2.3.Efeito da relação de carbono para nitrogênio na produção do polissacarídeo microbiano

Foram avaliadas três relações de carbono para nitrogênio (C:N) no meio convencional (MP) para a produção do polissacarídeo: 25:1, 50:1 e 100:1. Considerou-se, para os cálculos, a massa em carbono e nitrogênio dos compostos utilizados no MP (glucose como fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como fonte de nitrogênio).

A produção foi acompanhada com determinações periódicas de açúcares redutores totais (método descrito na sequência) e os rendimentos foram calculados em termos de massa do polissacarídeo recuperado pela massa dos açúcares consumidos.

3.2.2.4.Produção do polissacarídeo microbiano em meio elaborado a partir de extrato de levedura comercial em água, acrescentado de glucose

Com o objetivo de verificar a possibilidade da utilização do extrato de levedura comercial para a produção do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp, foram realizados ensaios a partir de dois diferentes meios de produção:

- meio elaborado a partir de 0,15% (massa seca/volume) de extrato de levedura comercial em água, com 4,0% de glucose e pH ajustado para 7,0;
- meio elaborado a partir de 0,30% (massa seca/volume) de extrato de levedura comercial em água, com 4,0% de glucose e pH ajustado para 7,0;

Em paralelo, para fins de comparação, foi realizada uma fermentação no meio convencional (MP) com a mesma concentração de glucose (4,0%).

Durante o período de produção foram executadas análises periódicas da concentração de açúcares redutores totais. Após a produção, os rendimentos calculados em porcentagem do polissacarídeo produzido.

3.2.2.5.Efeito de diferentes fontes de carbono sobre a produção do polissacarídeo

Como fonte de carbono para a produção do polissacarídeo, foram empregados, além da glucose (grau analítico), três produtos comerciais: xarope de glucose de milho, xarope de glucose de mandioca e xarope rico em maltose de milho. Para os ensaios utilizou-se o

meio convencional (MP), substituindo-se a glucose por cada xarope em estudo. A quantidade empregada dos xaropes (massa/volume) foi calculada com base na concentração de açúcares redutores totais.

Durante a fermentação, fez-se o acompanhamento dos açúcares consumidos, através de determinações de açúcares redutores totais pelo método de Somogyi e Nelson.

3.2.3. Métodos analíticos para acompanhamento da produção de células ou do polissacarídeo microbiano

3.2.3.1. Determinação de carboidratos

a) Carboidratos totais (CHT): Para avaliação de carboidratos totais foi utilizado o método de fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et alii (1956). Todas as determinações foram feitas após centrifugação das alíquotas, especialmente quando do acompanhamento do processo, para que não se determinassem os polissacarídeos insolúveis produzidos durante a fermentação.

b) Açúcares redutores totais (ART): utilizou-se a técnica descrita por Somogyi e Nelson (Nelson, 1944 e Somogyi, 1952).

3.2.3.2. Método de doseamento (segundo JECFA, 1999)

Para o doseamento das amostras de polissacarídeo insolúvel obtidas a partir das duas linhagens do *Agrobacterium* sp foi seguida a técnica sugerida pelo JECFA (1999). Cerca de 100 mg da amostra do polissacarídeo, quantitativamente pesada, foi solubilizada em solução de hidróxido de sódio 0,1N para um volume de 100 mL. Esta solução foi diluída adequadamente. A 1 mL da diluição acrescentou-se 1 mL de solução de fenol grau reagente a 5% e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após homogeneização, o material foi resfriado em banho de gelo e fez-se a leitura de Absorbância no comprimento de onda 490 nm, contra um branco. Uma solução padrão de glucose foi preparada a partir de uma solução estoque de 1 mg/mL após diluição adequada. O mesmo procedimento executado para a amostra foi repetido para o padrão. O cálculo do conteúdo (%) de polissacarídeo insolúvel (curdulana) na amostra foi feito através da fórmula:

$$\text{Conteúdo de curdulana (\%)} = (A/A_R) \times (0,9 \times W_R/W) \times 100$$

onde

A = Absorbância da solução da amostra

A_R = Absorbância da solução padrão

0,9 = massa molecular da glucose anidra dividido pela massa molecular da glucose

W = peso da amostra (mg)

W_R = peso da glucose usada como padrão (mg)

3.2.3.3. Solubilidade

Foram realizados testes de solubilidade em água a frio e a quente (aproximadamente 100°C), solução de hidróxido de sódio 1 N (NaOH 1 N) e dimetilsulfóxido (DMSO) para o polissacarídeo insolúvel produzido a partir das duas linhagens de *Agrobacterium* sp e para a amostra comercial (curdulana) obtida de Takeda Chemical Industries.

As concentrações avaliadas foram 1 e 2% do polímero. Não foi objeto de estudo a avaliação detalhada da solubilidade.

3.2.3.4. Hidrólise ácida do polissacarídeo

A cerca de 0,01g do polissacarídeo acrescentou-se 0,5 mL de ácido trifluoracético (TFA) 1M. Cada amostra foi tratada a 100°C por cerca de 16 horas em tubo selado. O TFA foi evaporado com nitrogênio e o polissacarídeo hidrolisado utilizado nos ensaios de cromatografia para identificação do (s) açúcar (es) constituinte (s).

3.2.3.5. Análises cromatográficas

Os hidrolisados ácidos das amostras obtidas dos processos de fermentação e da goma comercial foram submetidos a cromatografia em papel, usando como solvente acetato de etila:piridina:água na proporção 8:2:1, em volume. O açúcar foi detectado através da revelação com os reagentes: solução de hidróxido de sódio e nitrato de prata, solução

alcoólica de hidróxido de sódio e solução de tiosulfato de sódio. Para efeitos de comparação, realizou-se, em paralelo, a cromatografia de um padrão de glucose.

Os hidrolisados também foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As análises foram executadas em cromatógrafo da marca Shimadzu, Co., modelo CBM-10A, numa coluna CLC-NH₂ (M) de 25 cm, contendo grupo aminopropil na fase estacionária. A fase móvel constituiu-se em acetonitrila:água (77,5:22,5 v:v) e o fluxo foi de 1 mL/min. A coluna foi mantida a 30°C. A detecção foi feita por índice de refração, em aparelho da marca Shimadzu, Co., modelo RID-6A. Como o objetivo da análise foi somente identificar o açúcar liberado após a hidrólise ácida do polissacarídeo insolúvel, utilizou-se um padrão de glucose para comparação com o hidrolisado e não foi feita a quantificação.

3.2.3.6. Análises em espectrometria no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) das amostras de polissacarídeo foram registrados em um espectrofotômetro JASCO, modelo IR-700, em pastilha de KBr, na região de 400-4000 cm⁻¹. Utilizou-se absorção de 1601 cm⁻¹ de um filme de poliestireno como referência.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

4.1.1. Curvas de crescimento microbiano

Com o objetivo de determinar o período mínimo de incubação para a produção de células, foram executadas curvas de crescimento com as duas linhagens estudadas, apresentadas na Figura 11. Observou-se um mesmo padrão de crescimento, com um período de latência de aproximadamente 3 horas, crescimento exponencial entre 4 e 24 horas, caracterizando a fase logarítmica, com um máximo de crescimento em 48 horas. Após 60 horas de cultivo, os dois microrganismos tiveram valores de absorbância com tendência à diminuição.

4.1.2. Aspecto dos cultivos microbianos

No meio de crescimento MC e incubação sob agitação, as duas linhagens desenvolveram-se bem, turvando rapidamente o líquido. O aspecto dos cultivos é mostrado na Figura 12. A coloração original do meio de cultivo não foi alterada após o crescimento microbiano.

Após coloração pelo método de Gram, comprovou-se que o microrganismo em estudo é Gram negativo, o que era de se esperar. Esta técnica de coloração foi executada a cada cultivo do inóculo para verificação da ausência de contaminantes nos meios.

No mesmo meio de crescimento, com acréscimo de 2,00% de agar, tornando o meio sólido, as linhagens estudadas apresentaram colônias isoladas, sem coloração, com aspecto mucóide e brilhante (Figura 13).

No meio sólido, verificou-se que a linhagem ATCC 31749 cresceu mais rapidamente em comparação à linhagem IFO 13140. O tempo de incubação, a 30° C, para o crescimento dos cultivos no meio avaliado foi de 24 a 48 horas. Mesmo com prolongação no período de incubação, por até 5 dias, as linhagens não mostraram alterações nas características culturais.

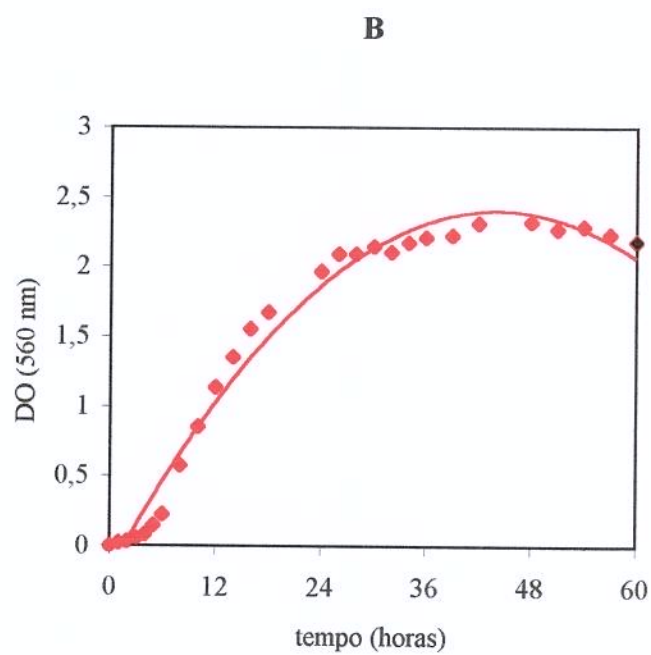
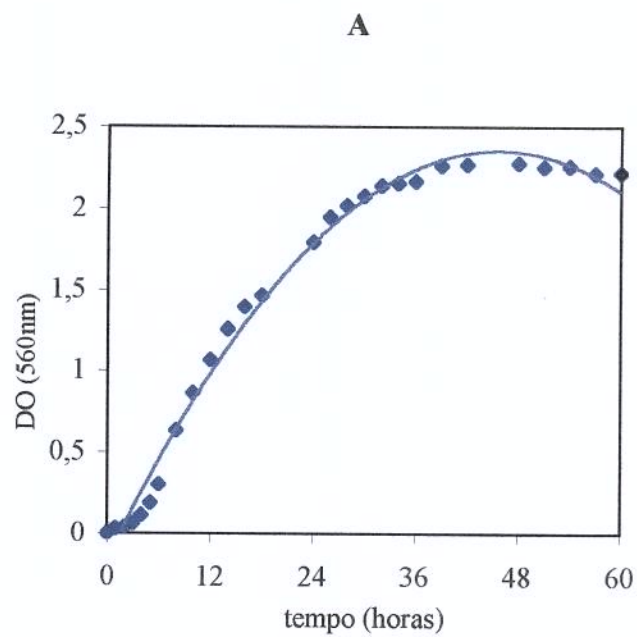


Figura 11: Curvas de crescimento das linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) do *Agrobacterium* sp

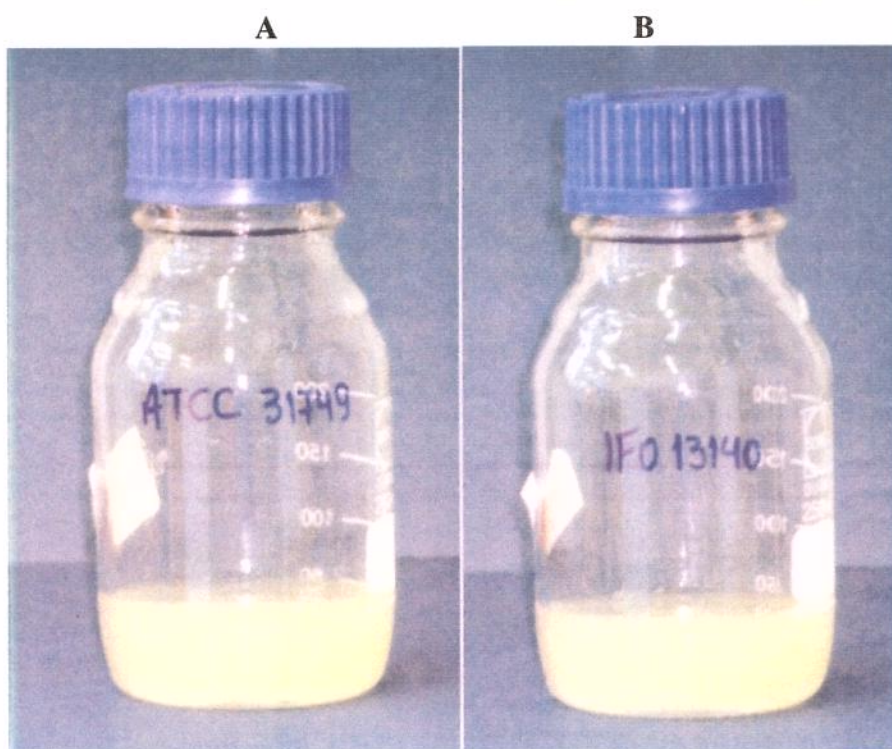


Figura 12: Aspecto dos cultivos de *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) após semeadura e incubação em meio líquido



Figura 13: Aspecto dos cultivos de *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) após semeadura e incubação em meio sólido

4.1.3. Coloração das colônias bacterianas pelo corante Azul Anilina

As duas linhagens do *Agrobacterium* sp cresceram bem no meio avaliado, formando um cultivo denso, com aparência brilhante e intensamente coradas com o Azul Anilina (Figura 14), comprovando sua capacidade em incorporar o corante e, conseqüentemente, de acordo com Nakanishi et alii (1974; 1976), produzir β -1,3-glucana. Estes autores afirmam que a intensidade da cor azul verificada é proporcional à capacidade produtora do microrganismo. Portanto, a partir do aspecto dos cultivos em estudo (Figura 14), é de se esperar que os microrganismos sejam bons produtores de polissacarídeo contendo ligações β -1,3-glicosídicas.

4.1.4. Produção do inóculo microbiano

4.1.4.1. Avaliação do crescimento microbiano no meio de cultivo composto por extrato de levedura comercial em diferentes concentrações e do efeito do emprego do $MgSO_4$

Com o objetivo de verificar a possibilidade de emprego do extrato de levedura pastoso comercial (ELC) em solução aquosa em diferentes concentrações, contendo ou não o $MgSO_4$, para a produção do inóculo microbiano, foi realizado o cultivo e executadas curvas de crescimento, a partir de leituras de DO_{560nm} .

Nas Figuras 15 e 16 estão apresentadas as curvas obtidas para as concentrações: 0,15, 0,30, 0,45, 0,60, 0,75 e 0,90% de extrato de levedura em água (considerando a massa seca do extrato em g por 100 mL de solução) com adição e sem adição do $MgSO_4$, comparando-se o crescimento com um cultivo em meio de crescimento (MC - cultivo controle).

Para as duas linhagens estudadas verificou-se, em concentrações de extrato de levedura acima de 0,45%, que a curva de crescimento foi semelhante ou superior à do meio de crescimento convencional, utilizado como um meio controle. Não foi verificada, para nenhuma das linhagens, diferença entre a adição ou não de $MgSO_4$, mostrando que seu emprego não teve efeito sobre o crescimento microbiano, motivo que levou à exclusão deste composto nos ensaios apresentados na seqüência.

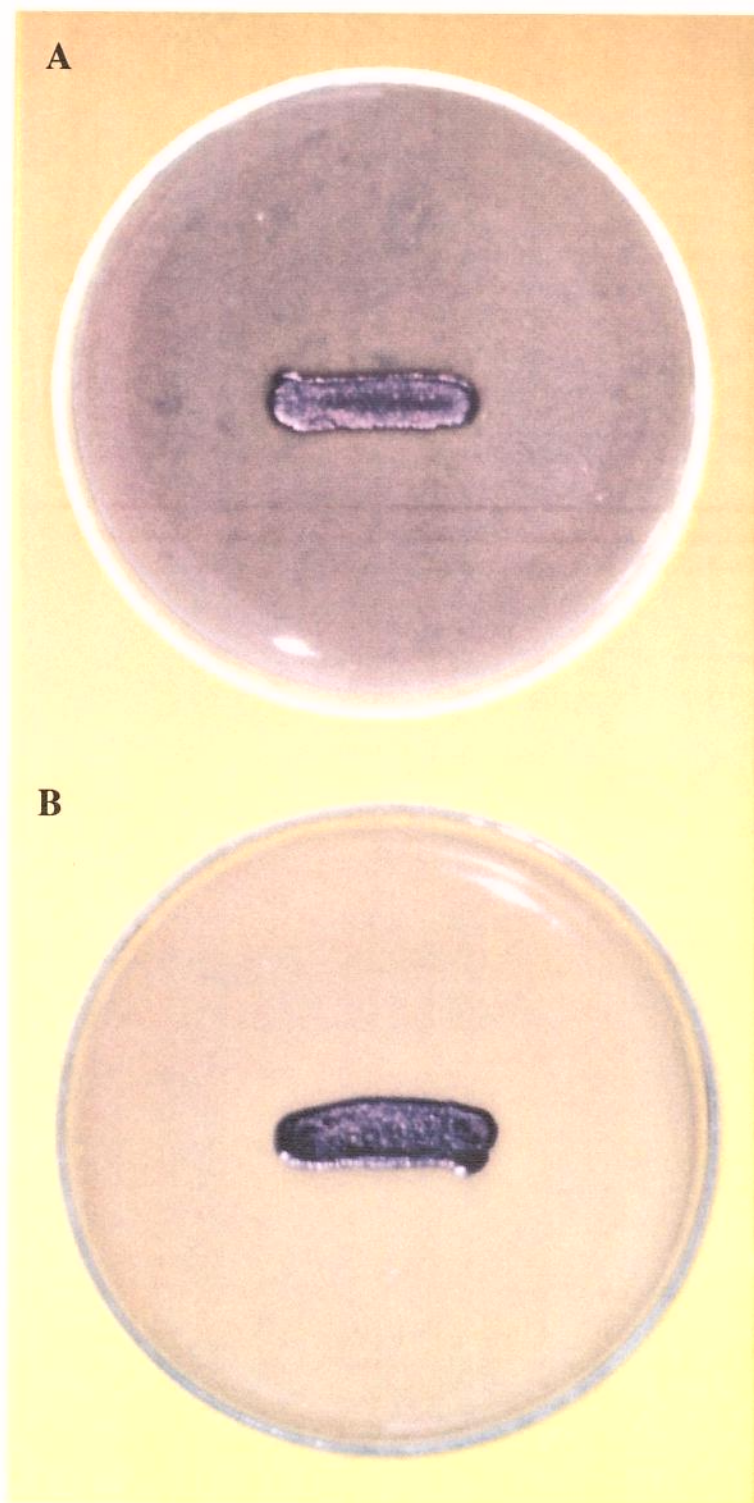


Figura 14: Aspecto dos cultivos de *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) após semeadura e incubação num meio sólido contendo o corante Azul Anilina

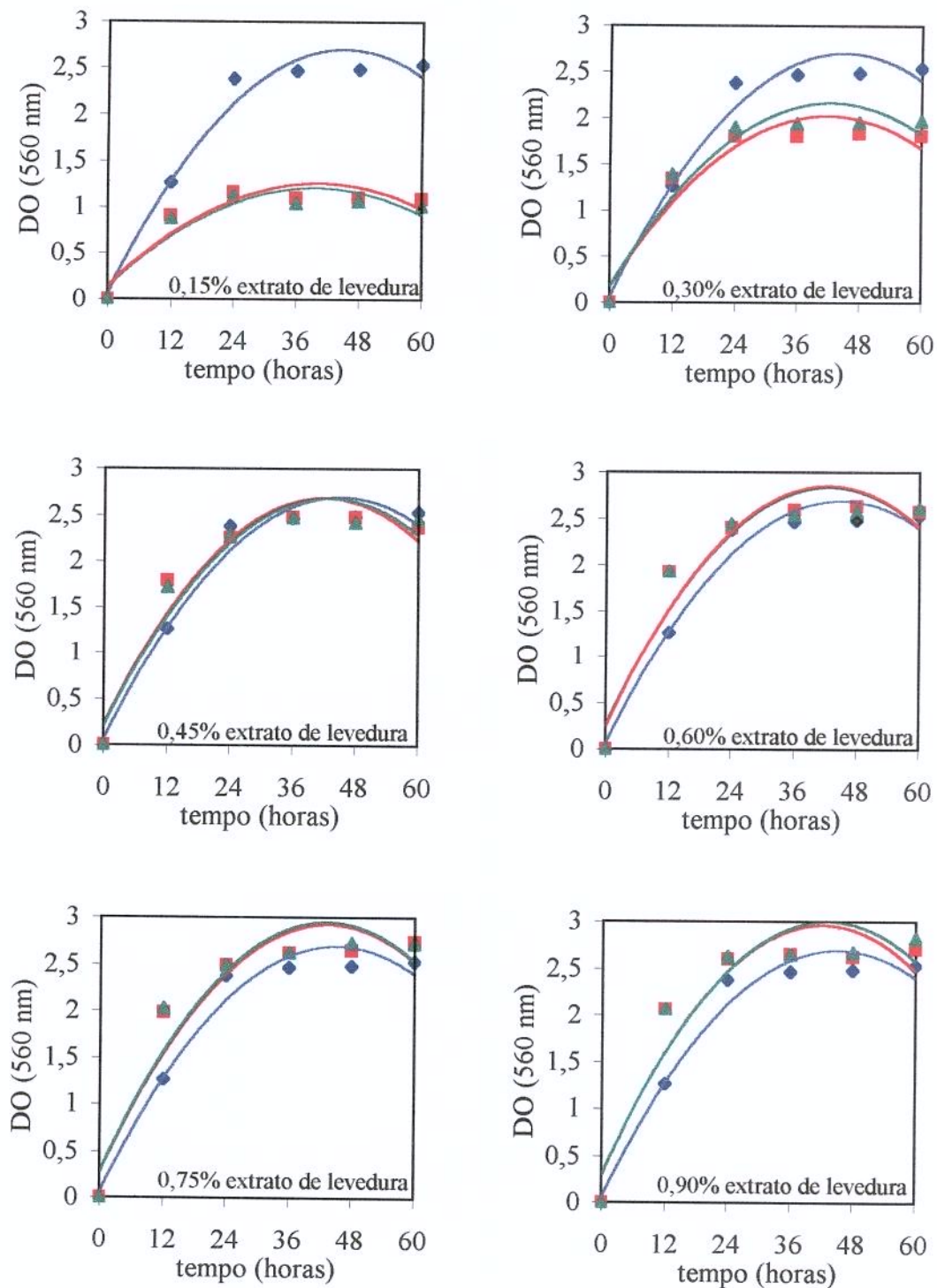


Figura 15: Curvas de crescimento (DO_{560nm}) do *Agrobacterium* sp, linhagem ATCC 31749, em meio constituído de extrato de levedura comercial em diferentes concentrações, com adição de $MgSO_4$ (\blacktriangle), sem adição de $MgSO_4$ (\blacksquare) em comparação com um cultivo controle (\blacklozenge) em meio de crescimento MC

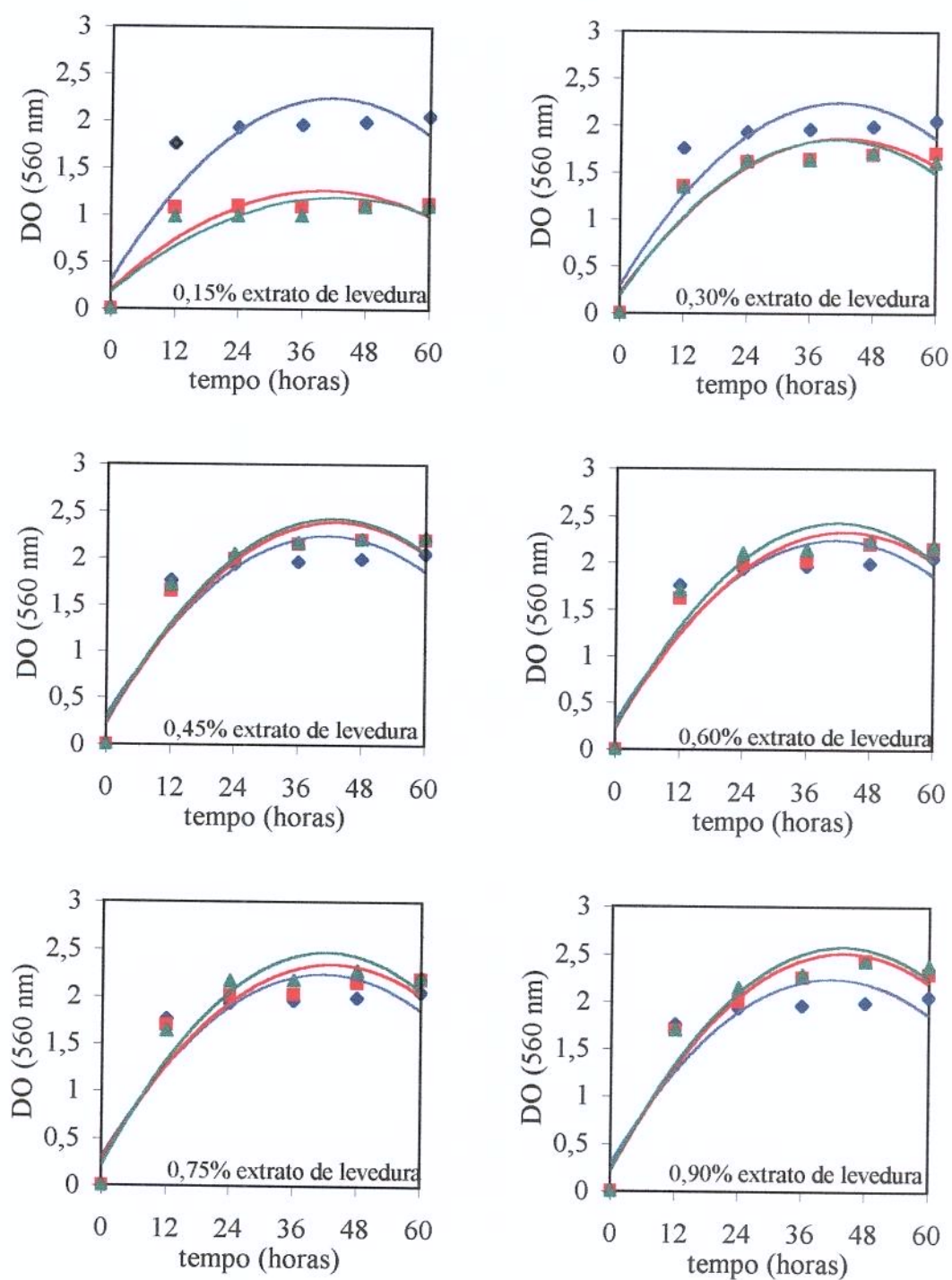


Figura 16: Curvas de crescimento (DO_{560nm}) do *Agrobacterium* sp, linhagem IFO 13140, em meio constituído de extrato de levedura em diferentes concentrações, com adição de $MgSO_4$ (\blacktriangle), sem adição de $MgSO_4$ (\blacksquare) em comparação com um cultivo controle (\blacklozenge) em meio de crescimento

Quanto à fase exponencial do crescimento (período entre o tempo zero e 24 horas de crescimento), a linhagem ATCC 31749 mostrou maior desenvolvimento, em comparação ao meio de crescimento, nos meios contendo extrato de levedura nas concentrações maiores ou iguais a 0,45%. Já a linhagem IFO 13140 apresentou, para as concentrações de extrato de levedura acima de 0,45%, crescimento semelhante ao do MC utilizado como controle.

Para a fase estacionária (período após 24 horas de crescimento), as duas linhagens apresentaram o mesmo comportamento, ambas com crescimento semelhante tanto no MC como nas concentrações 0,45 e 0,60% de extrato de levedura e crescimento maior nos meios com extrato de levedura nas concentrações 0,75 e 0,90%, em comparação ao MC.

Comparando-se as duas linhagens, através de leituras de densidade óptica (DO_{560nm}) verifica-se que a ATCC 31749 cresce mais rapidamente que a IFO 13140.

4.1.4.2. Avaliação do meio de cultivo composto por extrato de levedura comercial nas concentrações 0,45 e 0,60%, acrescentado de diferentes açúcares

Como observado nas Figuras 15 e 16, o crescimento microbiano no meio constituído de extrato de levedura comercial nas concentrações 0,45 e 0,60%, verificado através de determinações de Densidade Óptica (DO_{560nm}), foi mais próximo ao crescimento no meio de crescimento (MC - controle) para as duas linhagens do *Agrobacterium* sp. Por este motivo, o desenvolvimento do inóculo foi avaliado nos meios com estas concentrações de extrato de levedura. Nos ensaios apresentados na sequência, foi avaliada a influência da adição de açúcares, em diferentes concentrações, no meio composto pelo extrato de levedura, na produção do inóculo microbiano. Os açúcares avaliados foram glucose, sacarose e melaço de cana-de-açúcar nas concentrações 1,00, 1,05 e 2,00%. Para efeitos de comparação fez-se, em paralelo, um cultivo no meio com extrato de levedura, nas concentrações indicadas, sem os açúcares para cada linhagem estudada, considerado um cultivo controle.

Foram realizadas leituras de densidade óptica (DO_{560nm}) e determinações da concentração de carboidratos totais (CHT) de amostras coletadas nos tempos zero, 12, 24, 36, 48 e 60 horas de cultivo com o objetivo de avaliar o crescimento e consumo de açúcares. Os resultados obtidos estão ilustrados nas Figuras 17, 18, 19 e 20.

O uso da glucose e sacarose teve efeito positivo para o crescimento celular das duas linhagens estudadas. Quando empregaram-se estes açúcares, todas as curvas de crescimento estiveram superiores às curvas de crescimento do microrganismo no meio utilizado como controle (Figuras 17-A e B e 18-A e B).

Com o uso do melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, as curvas de crescimento estiveram abaixo das curvas apresentadas para os meios sem adição do açúcar (controle) até aproximadamente 36 horas de cultivo e, após este período, mostraram-se superiores (Figuras 17-C e 18-C).

Considerando-se as concentrações de açúcares e extrato de levedura comercial (ELC) onde o aumento no crescimento foi mais acentuado, verificou-se que a linhagem ATCC 31749 teve melhor crescimento em ELC 0,45% e 1,00% de sacarose (destacado na Tabela 10), com aumento de 27,71% no crescimento máximo, em relação ao controle (sem adição do açúcar). Já a linhagem IFO 13140 cresceu melhor em ELC 0,60% e 2,00% de sacarose (destacado na Tabela 11), com aumento de 33,48% no crescimento máximo, em relação ao controle. Estes meios foram escolhidos para a produção dos inóculos nos ensaios apresentados na sequência.

A partir dos ensaios realizados verificou-se que, dos três açúcares empregados, a sacarose, além de proporcionar melhor crescimento, também foi o que apresentou uma menor taxa de consumo durante o cultivo das duas linhagens do microrganismo, tanto para o meio contendo 0,45% de ELC como para o meio contendo 0,60%. Em estudos de avaliação do crescimento microbiano e produção da curdularina, Lee et alii (1997c) observaram que o *Agrobacterium* sp (ATCC 31750) é capaz de utilizar a sacarose para realizar as duas funções e que este açúcar é incorporado pela célula através de transporte facilitado. Na produção de polissacarídeo microbiano verifica-se que uma maior razão C:N é necessária para a biossíntese e a limitação do nitrogênio disponível estimula a formação do polímero (Sutherland, 1996). No crescimento microbiano uma relação inversa é favorável, ou seja, uma maior disponibilidade de nitrogênio no meio atua estimulando o crescimento. Quando se usa a sacarose no meio de crescimento, pelo fato da necessidade de sua clivagem em glucose e frutose, estes monossacarídeos vão sendo liberados lentamente para uso nas funções metabólicas pelo microrganismo e, conseqüentemente, o nitrogênio

está mais disponível (o extrato de levedura é rico neste composto) em comparação à fonte de carbono, proporcionando maior massa celular. Já a glucose é incorporada mais rapidamente no metabolismo microbiano, sem necessidade de clivagem, estando disponível desde o início do cultivo. O melaço de cana-de-açúcar utilizado nos ensaios tem aproximadamente 10% de seus açúcares na forma de açúcares redutores, também diretamente usados no metabolismo microbiano.

Tabela 10: Aumento no crescimento do *Agrobacterium* sp nos meios contendo 0,45% de ELC e diferentes concentrações de açúcares, em relação ao meio controle (sem adição de açúcares)

Fonte de carboidrato	Melhor concentração do açúcar para o crescimento (%)		Aumento no crescimento em relação ao controle (%)		Taxa do açúcar consumido até o crescimento máximo (%)	
	ATCC	IFO	ATCC	IFO	ATCC	IFO
	31749	13140	31749	13140	31749	13140
Glucose	2,00	1,50	27,08	32,22	53,99	75,56
Sacarose	1,00	1,50	27,71	25,92	27,03	25,07
Melaço	1,00	1,00	15,44	21,39	33,64	25,31

Tabela 11: Aumento no crescimento do *Agrobacterium* sp nos meios contendo 0,60% de ELC e diferentes concentrações de açúcares, em relação ao meio controle (sem adição de açúcares)

Fonte de carboidrato	Melhor concentração do açúcar para o crescimento (%)		Aumento no crescimento em relação ao controle (%)		Taxa do açúcar consumido até o crescimento máximo (%)	
	ATCC	IFO	ATCC	IFO	ATCC	IFO
	31749	13140	31749	13140	31749	13140
Glucose	2,00	2,00	21,91	26,91	38,60	39,91
Sacarose	2,00	2,00	20,74	33,48	8,75	24,80
Melaço	2,00	1,00	9,43	14,21	38,60	49,61

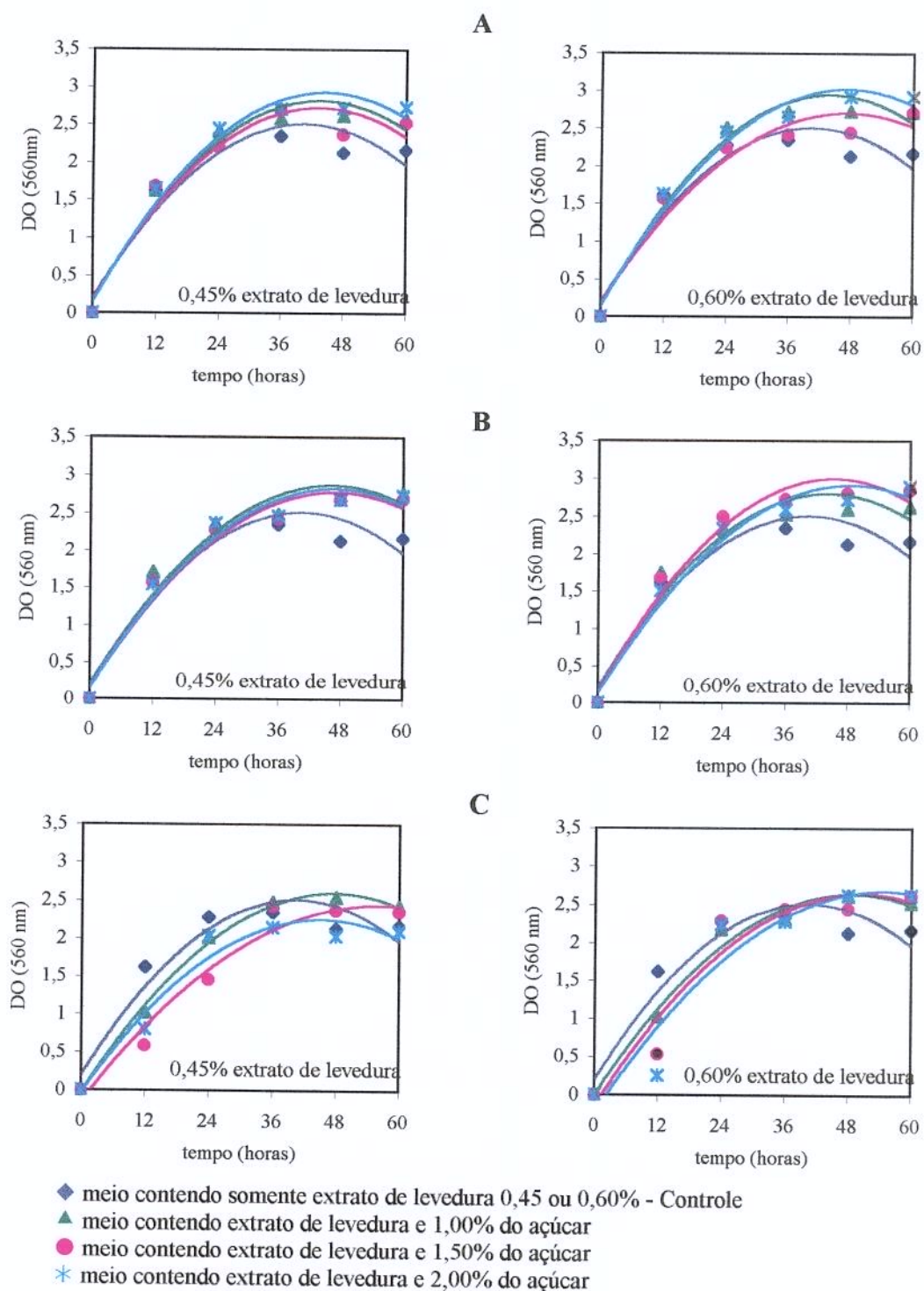


Figura 17: Curvas de crescimento do *Agrobacterium* sp, linhagem ATCC 31749, em meio constituído de extrato de levedura nas concentrações 0,45 e 0,60%, com adição de glucose (A), sacarose (B) ou melaço de cana-de-açúcar (C)

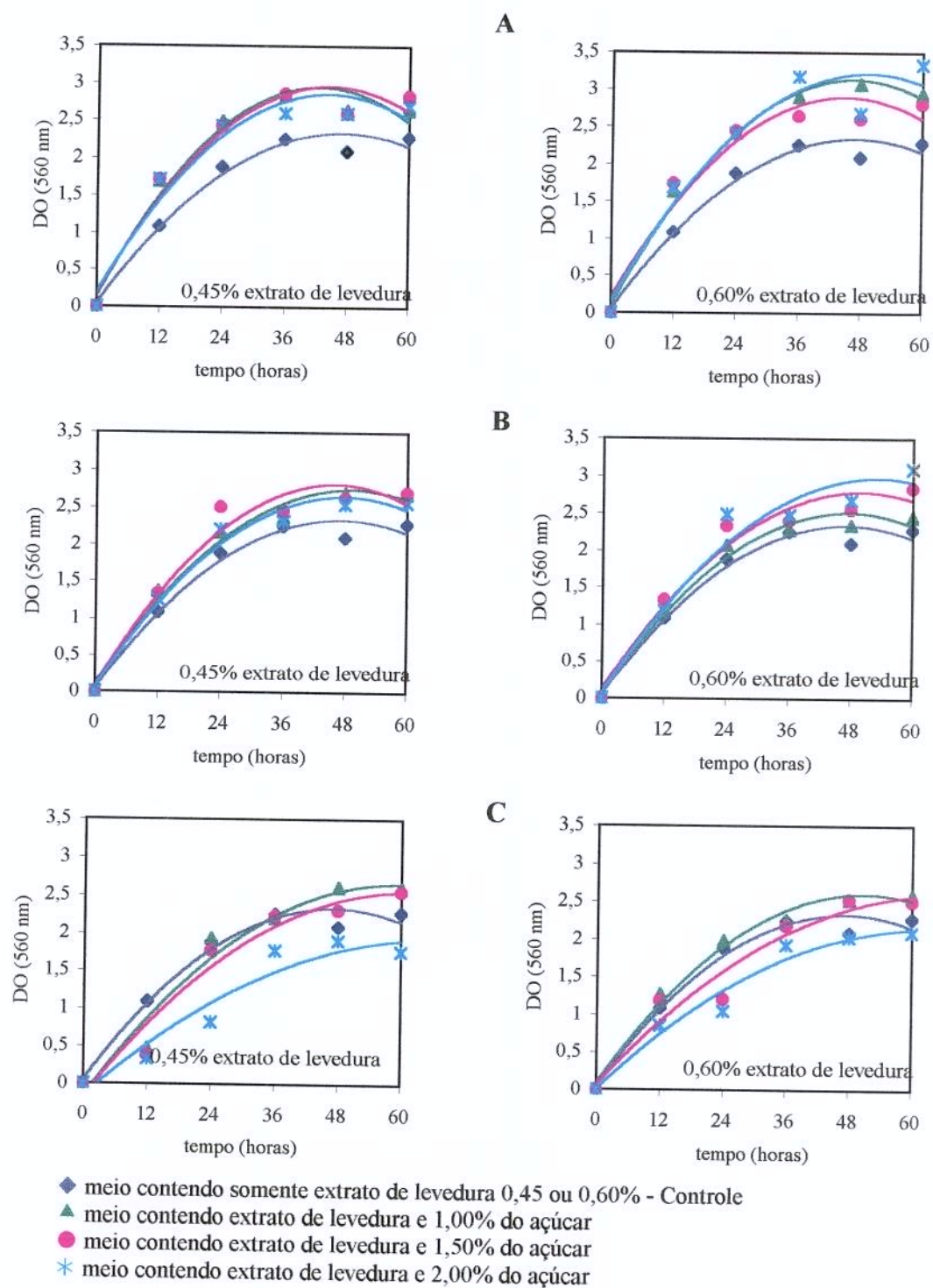


Figura 18: Curvas de crescimento do *Agrobacterium* sp, linhagem IFO 13140, em meio constituído de extrato de levedura nas concentrações 0,45 e 0,60%, com adição de glucose (A), sacarose (B) ou melaço de cana-de-açúcar (C)

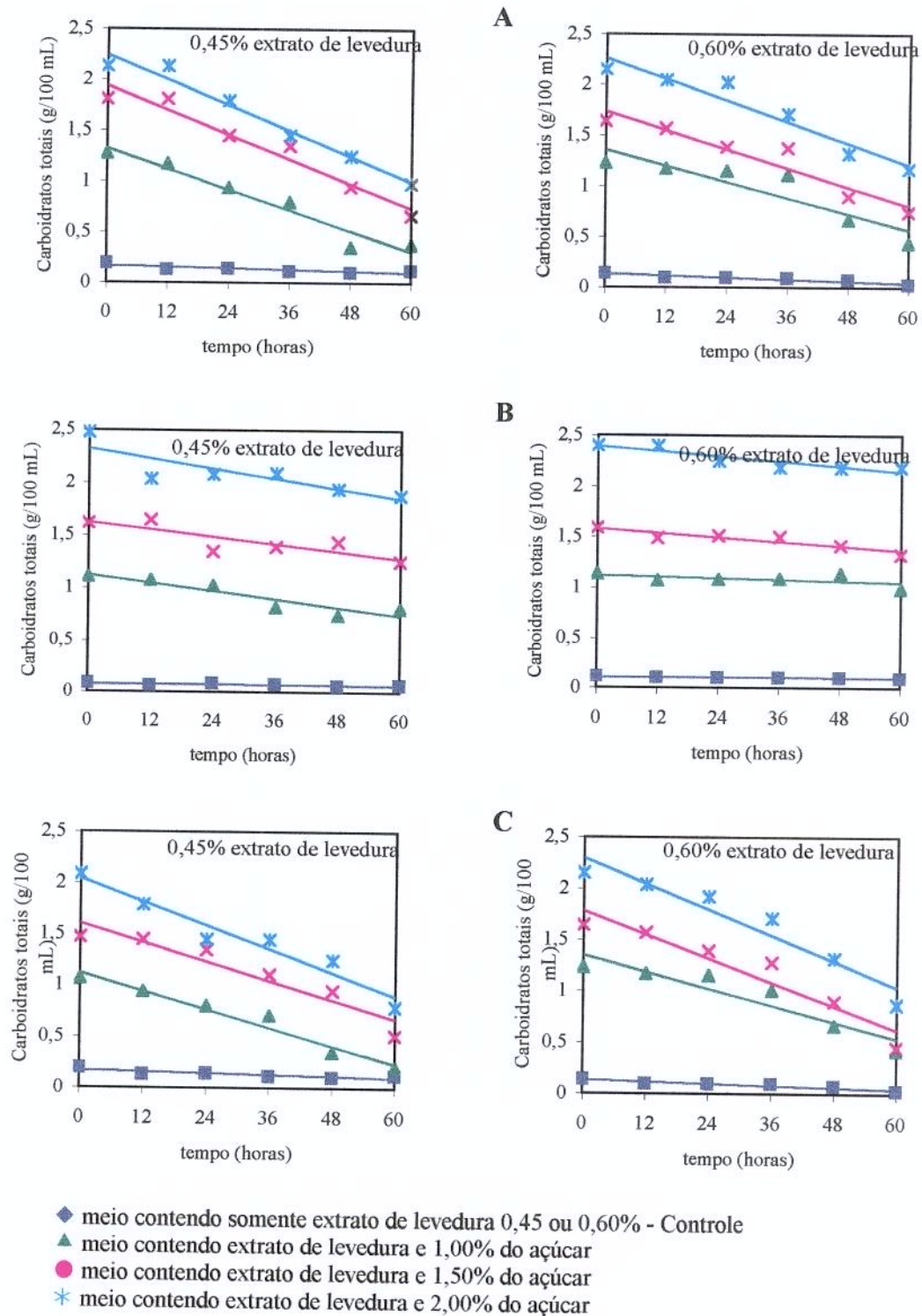


Figura 19: Acompanhamento do consumo de açúcares durante o crescimento do *Agrobacterium* sp, linhagem ATCC 31749, em meio constituído de extrato de levedura nas concentrações 0,45 e 0,60%, com adição de glucose (A), sacarose (B) ou melaço de cana-de-açúcar (C)

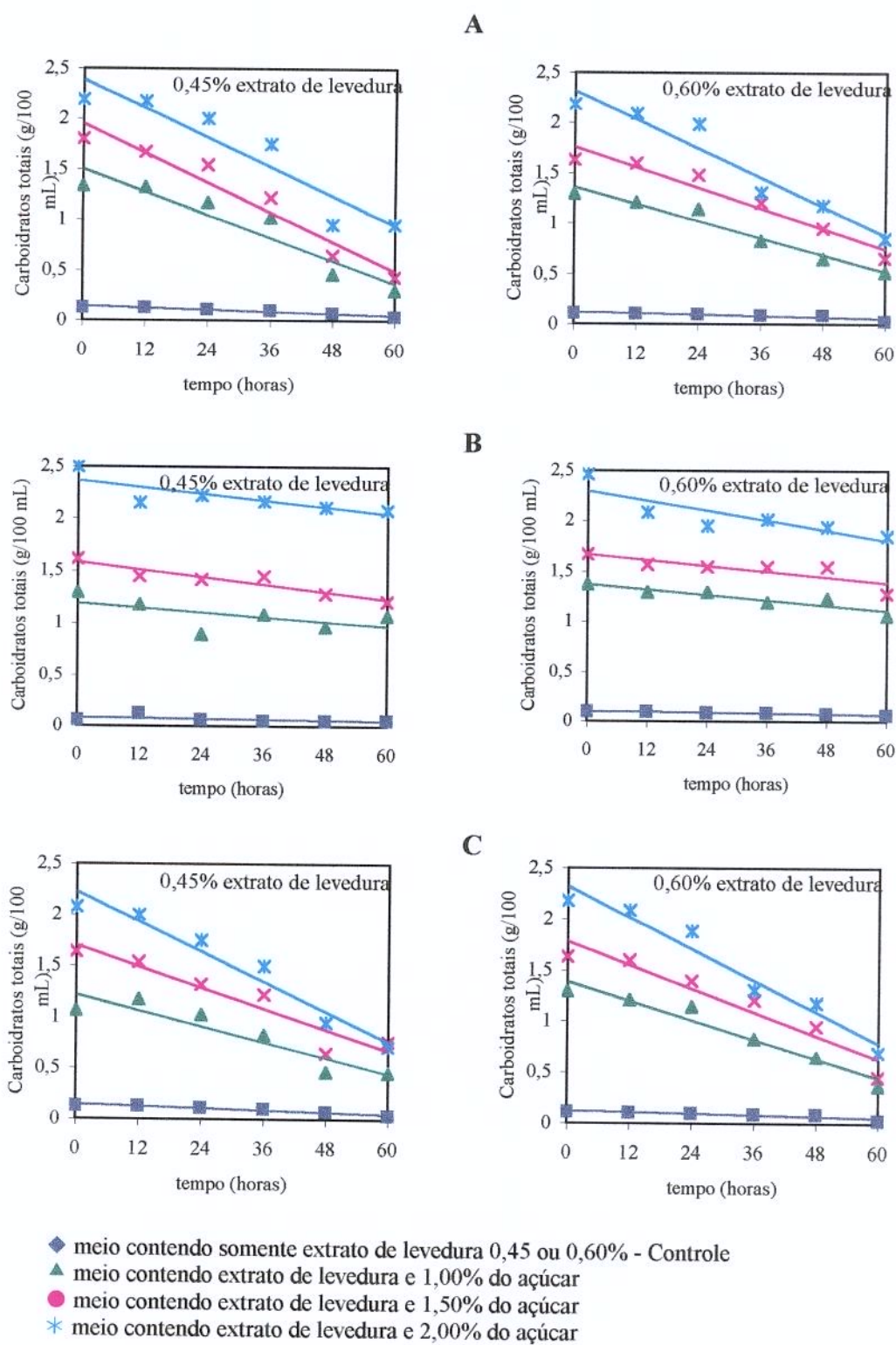


Figura 20: Acompanhamento do consumo de açúcares totais durante o crescimento do *Agrobacterium* sp, linhagem IFO 13140, em meio constituído de extrato de levedura nas concentrações 0,45 e 0,60%, com adição de glucose (A), sacarose (B) ou melaço de cana-de-açúcar (C)

4.1.5. Efeito da concentração do inóculo sobre a produção do polissacarídeo microbiano

O inóculo padronizado, através de leituras de densidade óptica, foi introduzido no meio de produção em diferentes porcentagens (volume/volume).

Para a linhagem ATCC 31749 do *Agrobacterium* sp um maior rendimento no processo ocorreu na concentração de 1,00% de inóculo (Figura 21). Nas concentrações maiores de inóculo há uma maior demanda de energia consumida para a manutenção do microrganismo, o que pode ter levado a uma queda no rendimento do polissacarídeo.

A linhagem IFO 13140 apresentou maior rendimento na produção do polissacarídeo em concentrações mais elevadas do inóculo, tendo o rendimento máximo com 4,0% de inóculo (Figura 21).

As concentrações do inóculo de 1,00% para a linhagem ATCC 31749 e 4,0% para a linhagem IFO 13140 foram empregadas nos ensaios de produção da goma.

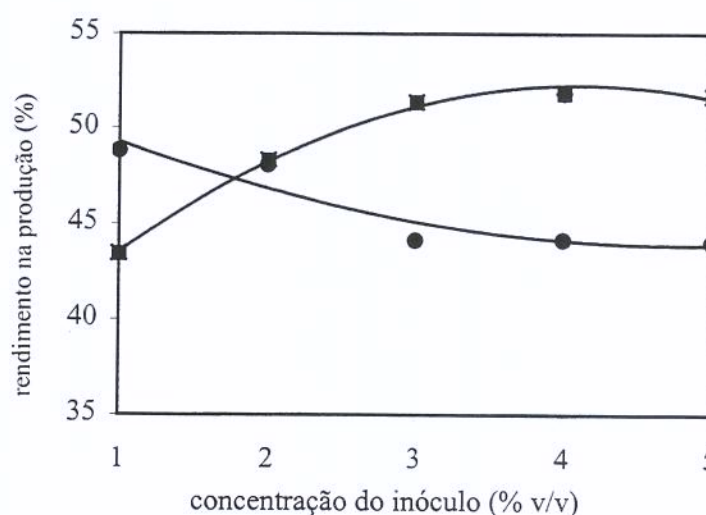


Figura 21: Demonstração do efeito da concentração do inóculo sobre a produção de polissacarídeo insolúvel no meio convencional a partir do *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (●) e IFO 13140 (■)

4.2. ENSAIOS DE PRODUÇÃO

4.2.1. Avaliação do efeito da relação de carbono para nitrogênio (C:N) na produção do polissacarídeo microbiano

De acordo com Sutherland (1996), os meios utilizados na elaboração de exopolissacarídeos, tanto em nível laboratorial como em nível industrial, são baseados em elevadas razões de carbono para nitrogênio disponível (C:N).

Três diferentes proporções C:N foram empregadas na elaboração do polissacarídeo insolúvel pelas duas linhagens de *Agrobacterium* sp: 25:1, 50:1 e 100:1. A fonte de carbono empregada foi a glucose e a de nitrogênio foi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Verificou-se que, das três proporções empregadas, a que continha uma quantidade de carbono 50 vezes superior à de nitrogênio foi a mais satisfatória. Os rendimentos do polissacarídeo insolúvel recuperado foram calculados em termos de massa seca pela massa de açúcares redutores totais consumidos e os resultados estão apresentados na Tabela 12 e na Figura 22.

Na proporção de 25:1 (C:N) verificou-se, para as duas linhagens empregadas, bom consumo do açúcar presente. Entretanto, os rendimentos de 39,74% e 37,79% (para as linhagens ATCC 31749 e IFO 13140, respectivamente) foram abaixo do esperado, considerando que o emprego da glucose pode levar a rendimentos próximos de 50%. Apesar de Phillips & Lawford (1979b) afirmarem que a demanda de carbono envolvida na elaboração do polímero não está associada à demanda de energia para a manutenção do microrganismo, neste experimento verificou-se que pode ter sido a utilização da energia (do açúcar) na manutenção do microrganismo o motivo do rendimento ser menor do que o esperado.

A proporção de 50:1 (C:N) é a que utiliza a glucose em concentração de 4,00% no meio de produção, apresentado por Nakanishi et alii (1976). Como pode ser verificado, através dos resultados apresentados na Tabela 12, no presente trabalho encontraram-se rendimentos compatíveis (49,13% para a linhagem ATCC 31749 e 46,00% para a linhagem IFO 13140) ao apresentado por Harada et alii (1966) (de 48,30%). A taxa de consumo do açúcar foi mais elevada (98,29% e 97,09%, respectivamente para as linhagens ATCC 31749 e IFO 13140) do que a mostrada na literatura (de 87,00% para Harada et alii, 1966).

Na proporção de 100:1, a concentração de glucose é de 8% no meio de produção. Pesquisadores da indústria Takeda (citados por Harada & Harada, 1996) utilizaram esta concentração de glucose no meio principal de produção do polissacarídeo insolúvel, com produção de 38 mg/mL (aproximadamente 47,5% de rendimento), resultado superior ao encontrado no presente trabalho (36,89% para a linhagem ATCC 31749 e 33,89% para a linhagem IFO 13140).

Estudos realizados por Souw & Demain (1979), já demonstravam que alterações no meio de cultura, especificamente na porcentagem de fonte de carbono, promoviam diferentes rendimentos no polissacarídeo produzido por fermentação. Estes autores verificaram que, para a produção de xantana, em concentrações de sacarose superiores a 4% nos meios de cultura, os rendimentos decresciam. Para a produção do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp, no presente trabalho, esta tendência também foi verificada.

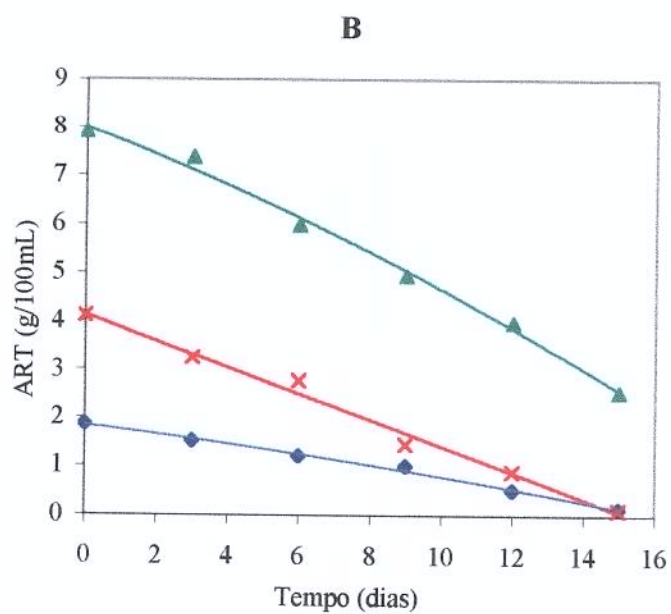
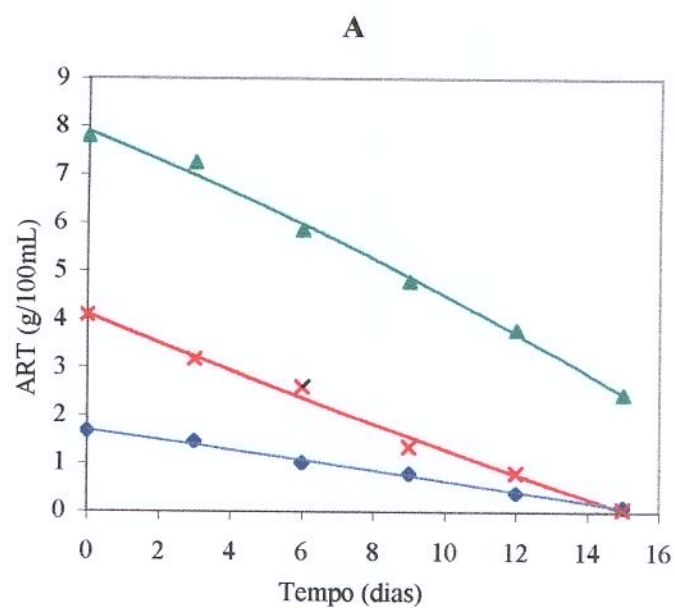
Tabela 12: Taxa de consumo de açúcares (% ART consumidos) e rendimentos* na produção de polissacarídeo insolúvel (PSI) por *Agrobacterium* sp, utilizando diferentes proporções de carbono para nitrogênio

Proporção C:N	% ART consumidos		Rendimento	
	ATCC 31749	IFO 13140	ATCC 31749	IFO 13140
25:1	93,41	91,98	39,74	37,79
50:1	98,29	97,09	49,13	46,00
100:1	68,55	67,68	36,89	33,89

* calculados em porcentagem do polissacarídeo produzido sobre a quantidade dos ART consumidos pelo microrganismo durante a produção (massa/massa)

4.2.2. Produção de polissacarídeo insolúvel em meio contendo extrato de levedura comercial acrescentado de glucose

Como já foi citado, a produção de muitos polissacarídeos microbianos está associada à fase estacionária do crescimento microbiano, quando se observa exaustão do nitrogênio (Harada, Terasaki & Harada, 1993).



- ◆ meio contendo 25:1 em C:N
- × meio contendo 50:1 em C:N
- ▲ meio contendo 100:1 em C:N

Figura 22: Acompanhamento do consumo de açúcares redutores totais (ART) durante a produção de polissacarídeo insolúvel por *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) em meio elaborado a partir de três proporções de C:N

Na literatura consultada, o extrato de levedura é referido como um composto possível de se utilizar nos meios de cultura como fonte de nitrogênio. Harada e colaboradores (citados por HARADA et alii, 1966) obtiveram um rendimento de 50% de goma curdulana sobre a glucose quando 0,75% de extrato de levedura foi empregado na produção.

O meio convencional de produção do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp, que utiliza 0,15% de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, contém cerca de 0,032% de nitrogênio, enquanto que 0,15 e 0,30% de extrato de levedura, utilizados no presente ensaio, contém cerca de 0,013% e 0,026% de nitrogênio respectivamente (dados obtidos no laboratório).

A Figura 23 mostra o acompanhamento do consumo de glucose (como ART) durante a produção de polissacarídeo insolúvel pelas duas linhagens do *Agrobacterium* sp. A produção no meio convencional (MP) foi realizada em paralelo como um controle. Verificou-se que, durante a produção do polissacarídeo, as duas linhagens consumiram mais rapidamente e completamente a glucose presente quando se utilizou o MP, onde observou-se também maior rendimento (com valores apresentados na Tabela 13). Nos meios elaborados a partir do extrato de levedura, para as duas linhagens, não houve consumo total da glucose. No meio contendo 0,30% de extrato de levedura, as linhagens apresentaram melhor rendimento (46,95% e 51,82% para ATCC 31749 e IFO 13140, respectivamente) do que no meio com 0,15%, verificando-se também um maior aproveitamento da glucose presente (96,32% e 93,44%). Neste meio, a linhagem IFO 13140 produziu o polissacarídeo com maior rendimento, apesar de apresentar uma menor taxa de aproveitamento do açúcar, quando comparada com a linhagem ATCC 31749. Estes resultados mostram que o extrato de levedura é uma fonte de nitrogênio viável na elaboração de polissacarídeo insolúvel a partir das linhagens avaliadas.

Vernami et alii (1995) fizeram um experimento comparando a produção de zooglana a partir da bactéria *Zooglea ramigera* 115SLR num meio quimicamente definido com um meio contendo extrato de levedura, que pode-se classificar como um meio quimicamente não definido, já que este composto tem constituição bastante complexa. Os autores verificaram que a composição dos polissacarídeos produzidos a partir dos dois meios era idêntica, mas as massas moleculares diferentes. Isto indicou que a modificação

no meio de cultura levou a uma produção de polissacarídeos com diferentes graus de polimerização.

Portanto, estudos mais detalhados são necessários para confirmar-se a viabilidade do uso do extrato de levedura comercial na produção de polissacarídeo insolúvel pelas linhagens estudadas.

Tabela 13: Taxa de consumo de açúcares (%ART consumidos) e rendimentos* na produção de polissacarídeo insolúvel pelas duas linhagens de *Agrobacterium* sp, a partir de diferentes meios de cultura

Linhagem microbiana	Meio composto por extrato de levedura					
	Meio convencional		0,15%		0,30%	
	% ART consumidos	rendimento (%)	% ART consumidos	rendimento (%)	% ART consumidos	rendimento (%)
ATCC 31749	100,00	54,25	87,30	35,80	96,32	46,95
IFO 13140	97,34	52,89	84,75	36,32	93,44	51,82

* calculados em porcentagem de polissacarídeo insolúvel obtido a partir da quantidade de ART consumidos no meio (massa/massa)

4.2.3. Produção do polissacarídeo insolúvel em meio convencional, usando diferentes fontes de carbono

A glucose tem sido a única fonte de carbono descrita usualmente para a produção do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp (Harada et alii, 1966, Lawford & Phillips, 1982, Phillips & Lawford, 1983a; Phillips & Lawford, 1983b; Lawford et alii, 1986, Lawford & Rousseau, 1991).

Segundo Sutherland (1996), os hidrolisados do amido e a glucose são amplamente aceitos na indústria de transformação microbiana porque, apesar de apresentarem diferentes graus de pureza, são substratos disponíveis na maior parte do mundo e, geralmente, apresentam preços mais baixos. Esta observação também é válida para os melaços de cana-de-açúcar, que necessitam de um processo de clarificação antes do uso.

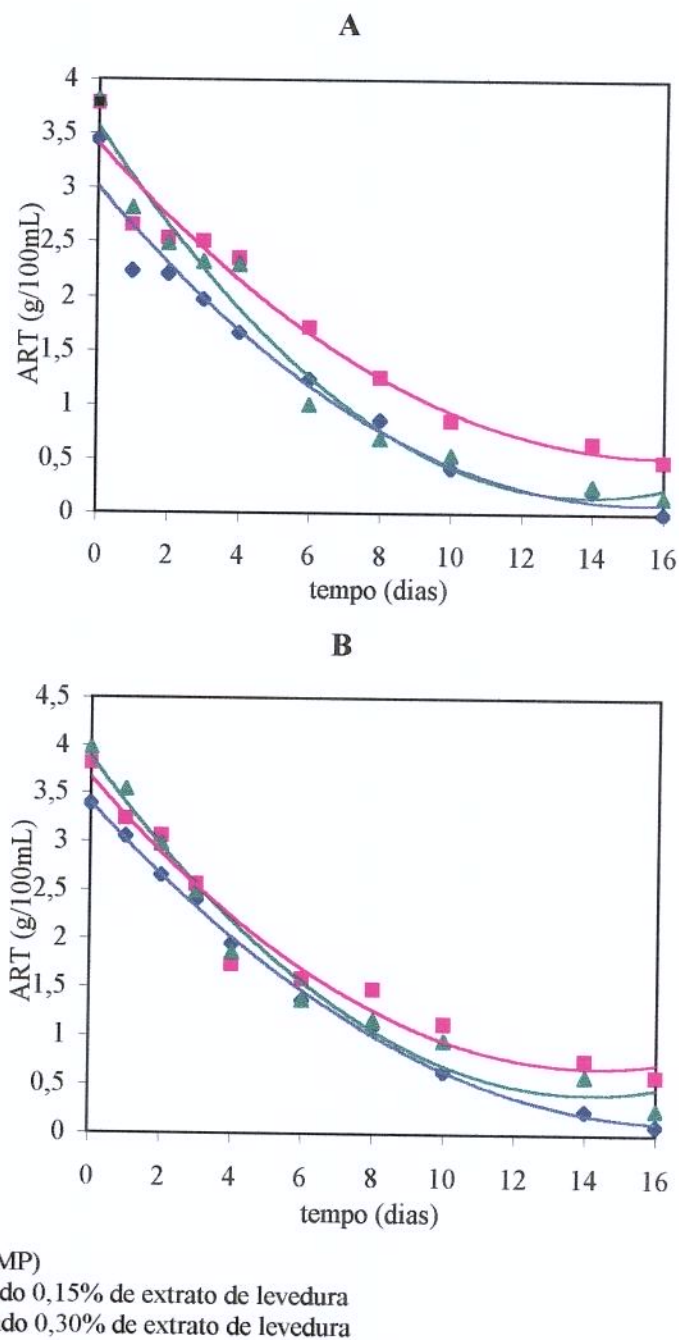


Figura 23: Acompanhamento do consumo de açúcares redutores totais (ART) durante a produção de polissacarídeo insolúvel por *Agrobacterium* sp em meio constituído por 0,15% e 0,30% de extrato de levedura acrescentado de glucose, em comparação ao meio convencional (MP). Linhagem ATCC 31749 (A) e linhagem IFO 13140 (B)

Em substituição à glucose grau analítico, utilizada nos experimentos em laboratório, foram empregados produtos comerciais, à base de glucose e de maltose, como fontes de carbono para a elaboração do polissacarídeo insolúvel utilizando as duas linhagens disponíveis. A fermentação foi acompanhada através de determinações periódicas de açúcares redutores totais (ART) e carboidratos totais (CHT).

As duas linhagens tiveram comportamentos distintos durante a produção quando se utilizaram as fontes comerciais de carbono. Os rendimentos para cada produto comercial e para a glucose grau analítico (meio considerado como um controle) são apresentados na Tabela 14 e o acompanhamento do consumo de ART e CHT na Figura 24.

Quando utilizou-se a glucose de milho ("Excell") como fonte de carbono, as duas linhagens mostraram produção satisfatória do polissacarídeo, considerando-se o rendimento (54,96% para a linhagem ATCC 31749 e 50,00% para a linhagem IFO 13140) sobre os ART consumidos. Para a linhagem IFO 13140, das três fontes alternativas pesquisadas, este produto foi o que mostrou melhor resultado (com destaque na Tabela 14).

As duas linhagens foram capazes de utilizar os carboidratos presentes no produto comercial "Mor-sweet" (maltose de milho). A linhagem ATCC 31749 foi a mais eficiente das duas, mostrando rendimento de 84,68% (com destaque na Tabela 14), enquanto a linhagem IFO rendeu 47,62% de polissacarídeo insolúvel sobre os açúcares redutores totais - ART - consumidos durante a fermentação. O *Agrobacterium* sp é capaz de utilizar a maltose, como demonstrado por Lee et alii (1997c). Estes autores verificaram a produção da goma curdulana a partir de um meio quimicamente definido contendo maltose como fonte de carbono, com produção de 48 g do polímero por 100 g do dissacarídeo.

Com o emprego da glucose de mandioca ("Manicandy") também houve produção do polissacarídeo a partir das duas linhagens empregadas. Dos três produtos comerciais avaliados, este foi o que levou a resultados menores nos rendimentos, de 44,28% sobre os ART consumidos para a linhagem ATCC 31749 e de 45,37% para a linhagem IFO 13140.

Apesar dos compostos comerciais utilizados não terem a composição química exatamente definida, verificou-se a viabilidade de seu emprego na produção do

polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp. O que deve ser observado com atenção, no presente trabalho, é que os rendimentos apresentados foram calculados a partir dos açúcares redutores totais consumidos pelas linhagens microbianas. As duas linhagens do *Agrobacterium* sp não consumiram totalmente os açúcares presentes nos produtos comerciais (Figura 24). Deve-se avaliar, neste ponto, a quantidade total de carboidratos presentes em cada produto comercial. Como se tratam de xaropes obtidos a partir do amido, devem-se considerar os açúcares não dosados pelo método de Somogyi-Nelson (que abrange apenas os açúcares redutores). Durante a produção do polissacarídeo insolúvel, o microrganismo assimilou os açúcares redutores, mas também atuou na transformação de outros açúcares não redutores (di, oligo e polissacarídeos) presentes nas amostras comerciais (vide Tabela 7 - características dos xaropes de glucose e maltose de procedência comercial). Estes açúcares foram quantificados, no presente trabalho, em termos de carboidratos totais, pelo método fenol-sulfúrico (que quantifica todos os carboidratos presentes: ART e outros), com curvas de acompanhamento mostradas na Figura 24 - A2 e B2 - e taxas de consumo de CHT apresentadas na Tabela 14.

Tabela 14: Taxas de consumo de açúcares (% ART e CHT consumidos) e rendimentos* obtidos na fermentação para a produção de polissacarídeo insolúvel pelas linhagens ATCC 31749 e IFO 13140 de *Agrobacterium* sp, utilizando diferentes fontes de carbono

Fonte de carbono	% ART consumidos		% CHT consumidos		Rendimento	
	ATCC	IFO	ATCC	IFO	ATCC	IFO
	31749	13140	31749	13140	31749	13140
Glucose de mandioca	72,70	63,00	45,15	25,47	44,28	45,37
Maltose de milho	53,11	17,09	21,13	11,12	84,68	47,62
Glucose de milho	59,36	53,39	25,45	18,46	54,96	50,00
Glucose grau analítico	98,29	97,09	96,44	93,91	49,13	46,00

* calculados em porcentagem do polissacarídeo produzido sobre a quantidade dos ART consumidos pelo microrganismo durante a produção (massa/massa)

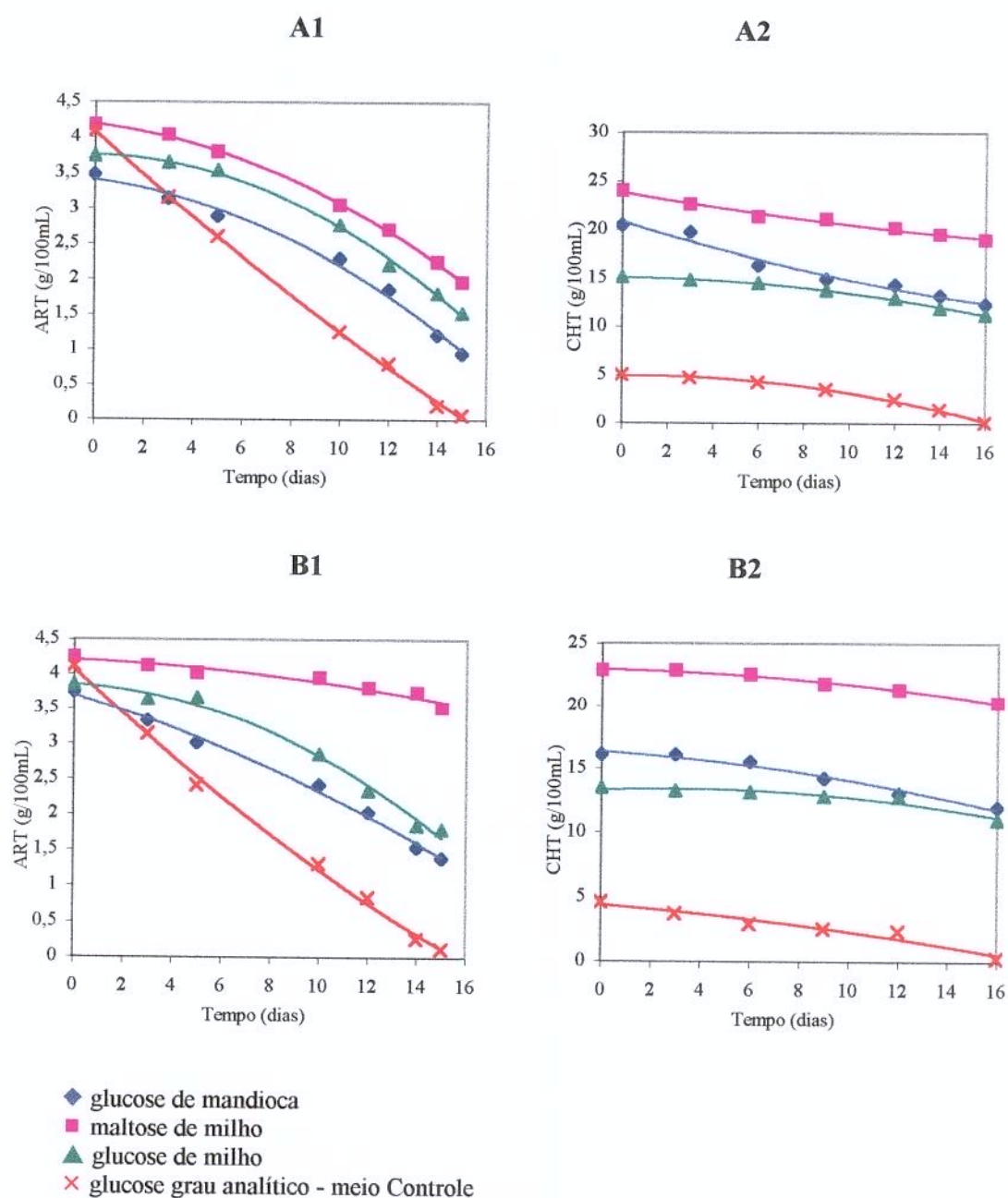


Figura 24: Acompanhamento do consumo de açúcares redutores totais (ART) (A1 e B1) e carboidratos totais (CHT) (A2 e B2) durante a produção de polissacarídeo insolúvel pelas linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) de *Agrobacterium* sp em meio elaborado a partir de diferentes fontes de carbono.

4.3. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.3.1. Doseamento das amostras

As amostras do polissacarídeo insolúvel das duas linhagens do *Agrobacterium* sp obtidas no laboratório e a amostra comercial foram quantificadas em termos de porcentagem de goma curdulana. O método de doseamento proposto pelo JECFA (1999) é um método que quantifica os carboidratos totais (CHT) da amostra, semelhante ao método fenol-sulfúrico utilizado, no presente trabalho, em outros ensaios. A amostra comercial, pelo método empregado, contém 86,11% de CHT, enquanto as amostras obtidas no laboratório apresentam valores de 80,01% para o polissacarídeo da linhagem ATCC 31749 e de 82,12% em CHT para o produto da linhagem IFO 13140.

Os resultados indicam que as amostras obtidas no laboratório apresentaram menor grau de pureza (em termos de polissacarídeo) em comparação ao produto comercial. Entretanto, todos os teores calculados foram superiores a 80%, valor mínimo especificado segundo JECFA (1999) para a goma curdulana.

4.3.2. Solubilidade do polissacarídeo microbiano em água, solução alcalina e DMSO. Capacidade em formar gel.

Para as avaliações de solubilidade, verificou-se comportamento muito semelhante entre as amostras de polissacarídeos insolúveis obtidos a partir das duas linhagens e a amostra comercial de goma curdulana. Tanto as amostras obtidas no laboratório como a goma comercial foram insolúveis na água fria, sendo, porém, intumescidas. O aspecto da suspensão 2% em água das amostras e da goma comercial está ilustrado na Figura 25.

Com o aquecimento da suspensão aquosa, os materiais se tornaram solúveis e formaram gel característico (Figura 26). Tanto as suspensões como os géis formados pelas amostras obtidas a partir das duas linhagens avaliadas mostraram-se mais opacas que a suspensão e o gel formado pela amostra comercial (Figuras 25 e 26), provavelmente em decorrência do menor teor de pureza.

Também verificou-se a solubilização em solução de hidróxido de sódio 1N e no solvente dimetilsulfóxido (DMSO), confirmando o verificado na literatura consultada para o polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp (Harada et alii, 1991).

Quando se compararam as amostras obtidas no laboratório com a amostra comercial, verificou-se mais facilidade na solubilização desta última em relação às anteriores, para os três solventes empregados. Isto pode ter sido decorrência de possíveis impurezas presentes nas amostras produzidas no laboratório, provenientes do meio de fermentação ou do próprio metabolismo microbiano.

4.3.3. Análises cromatográficas do polissacarídeo microbiano hidrolisado

A glucose aparece como produto de hidrólise da goma, tanto na amostra comercial como nas amostras produzidas a partir das linhagens disponíveis. Isto é sugerido a partir de cromatografia em camada delgada e líquida de alta resolução (CLAE) (Figura 27). Na Figura 27, (a) corresponde ao solvente e (b) à glucose, com tempo de retenção 7,5 minutos.

4.3.4. Análises de espectrometria no infravermelho

Os espectros obtidos das análises de infra-vermelho das duas amostras obtidas das linhagens estudadas e da curdulana comercial (Figura 28), confirmaram a semelhança entre os três materiais. Os três espectros mostraram absorção característica de ligações β em aproximadamente 890 cm^{-1} (assinalado pela seta na Figura 28), como foi sugerido por Seguchi & Kusunose (2001).



Figura 25: Aspecto das suspensões aquosas a 2% das amostras do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) e da curdulana comercial (C)



Figura 26: Aspecto dos géis a 2% das amostras do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (A) e IFO 13140 (B) e da curdulana comercial (C)

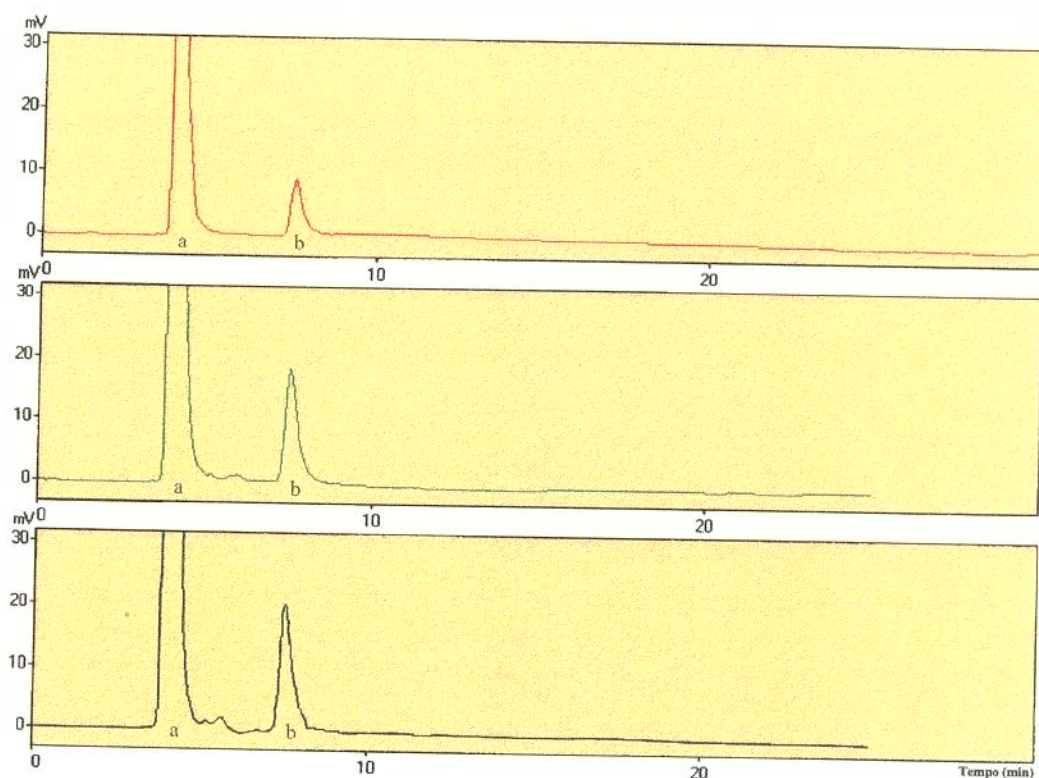


Figura 27: Cromatografia líquida de alta resolução do açúcar liberado após hidrólise do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp, linhagens ATCC 31749 (—) e IFO 13140 (—), e de uma amostra de glucose (—)

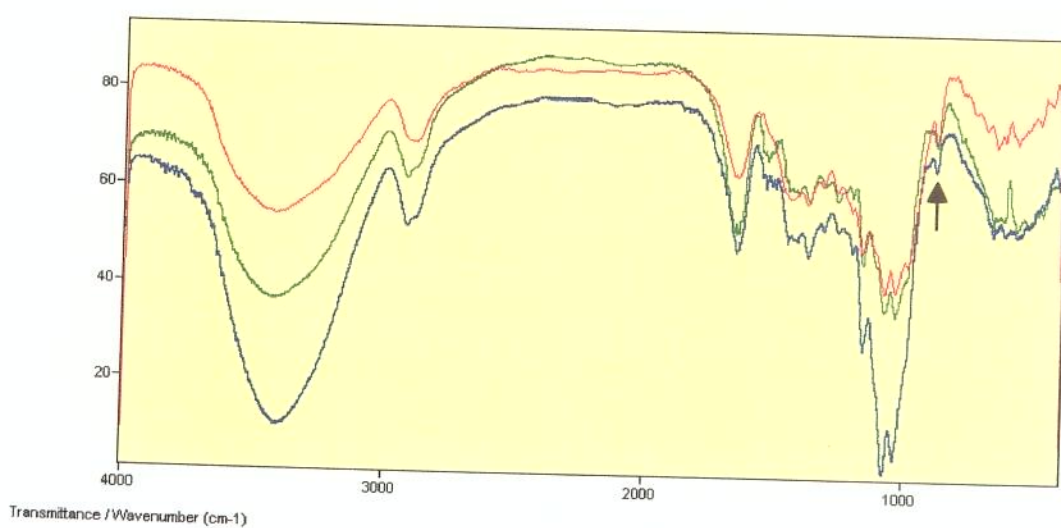


Figura 28: Espectro no infravermelho do polissacarídeo insolúvel de *Agrobacterium* sp, ATCC 31749 (—) e IFO 13140 (—), e de uma amostra comercial da curdulana (—)

5. CONCLUSÕES E COMENTÁRIOS

5.1. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados no presente trabalho, para as linhagens ATCC 31749 e IFO 13140 do *Agrobacterium* sp, na elaboração de polissacarídeo insolúvel, pode-se concluir o que segue.

a) Quanto às características do microrganismo

O microrganismo da linhagem ATCC 31749, que a literatura descreve como auxotrófico em uracila, cresceu bem nos meios avaliados sem adição deste composto.

As duas linhagens foram capazes de incorporar o corante Azul Anilina acrescentado ao meio de cultivo solidificado, descrito na literatura como indicador da produção de β -1,3-glucanas.

b) Quanto à produção do inóculo microbiano

A ausência do $MgSO_4$ no meio de crescimento (indicado por um dos fornecedores das linhagens como um constituinte) elaborado a partir do extrato de levedura comercial não afetou o crescimento microbiano das duas linhagens.

O extrato de levedura comercial na forma pastosa foi empregado com sucesso nos meios para a elaboração do inóculo microbiano na concentração de 0,45% para a linhagem ATCC 31749 e 0,60% para a linhagem IFO 13140. O emprego da sacarose nos meios elaborados a partir do extrato de levedura levou a melhores resultados de crescimento celular, com 1,00% de adição para o ATCC 31749 (com aumento de 27,71% no crescimento em relação a um controle sem o açúcar) e 2,00% de adição para o IFO 13140 (com 33,48% de aumento no crescimento em relação a um controle).

Considerando o emprego do inóculo na forma de uma suspensão microbiana padronizada, as concentrações de 1,00% e 4,00% (volume suspensão/volume meio de produção) foram as mais satisfatórias para a produção do polissacarídeo insolúvel pelas linhagens ATCC 31749 e IFO 13140, respectivamente.

c) Quanto à produção do polissacarídeo insolúvel

A proporção 50:1 de carbono para nitrogênio, no meio convencional de produção do polissacarídeo, foi a que levou a melhores rendimentos para as duas linhagens, com 49,13% para a linhagem ATCC 31749 e 46,00% para a linhagem IFO 13140, resultados compatíveis com os apresentados na literatura.

O emprego de 0,30% (peso seco/volume) de extrato de levedura comercial na forma pastosa como fonte de nitrogênio e sais no meio de produção, acrescentado de 4,00% de glucose, levou a uma produção de 46,30% e 51,82% de polissacarídeo insolúvel, respectivamente, a partir das linhagens ATCC 31749 e IFO 13140. Este composto é um substrato econômico e viável para a produção do polímero microbiano.

Xaropes comerciais de glucose de milho, glucose de mandioca e maltose de milho foram aproveitados pelas duas linhagens na produção do polissacarídeo insolúvel, porém sem o aproveitamento completo dos açúcares redutores presentes. A linhagem ATCC 31749 produziu melhor a partir da maltose de milho, com rendimento de 84,68% sobre os açúcares redutores totais consumidos e a linhagem IFO 13140 apresentou maior produção com a glucose de milho, apresentando rendimento de 50,00%. Estes resultados são indicativos de que os hidrolisados de amido são boas fontes de carbono para a elaboração do polissacarídeo pelo microrganismo avaliado, nas condições dos ensaios.

d) Quanto às características do polissacarídeo insolúvel produzido

O polissacarídeo das duas linhagens do *Agrobacterium* sp não solubilizou-se na água, formando uma suspensão. Com o aquecimento, tornou-se solúvel e formou um gel firme e resistente, semelhante ao gel formado pela amostra da "curdulana" comercial.

A hidrólise ácida do polissacarídeo insolúvel produzido a partir das duas linhagens, quando se usou o meio convencional, levou à liberação de glucose no meio, demonstrado através de cromatografia líquida de alta eficiência. Isto é indicativo de que o polissacarídeo tem a glucose como o principal constituinte.

Através de estudos comparativos de espectrofotometria no infravermelho entre o polissacarídeo insolúvel das duas linhagens avaliadas e o produto comercial "curdulana", verificaram-se muitas semelhanças entre os produtos.

5.2. COMENTÁRIOS

Apresentados os resultados obtidos nesse trabalho, alguns comentários se fazem necessários.

As duas linhagens utilizadas nos ensaios são amplamente citadas na literatura consultada como boas na produção de polissacarídeo insolúvel, o que foi comprovado no presente trabalho. Apesar de terem sido adquiridas de instituições reconhecidas internacionalmente, as duas linhagens mostraram comportamento diferente do apresentado na literatura. A linhagem ATCC 31749 cresceu e produziu o polissacarídeo sem adição de uracila nos meios (a literatura a refere como auxotrófica em uracila). Isto foi observado desde a reativação do microrganismo, o que pode indicar tratar-se de uma sub-linhagem diferente da citada na literatura. Um estudo mais detalhado da linhagem poderia levar a conclusões sobre essa observação. Ambas linhagens utilizadas mostraram tempo de produção muito acima do esperado, cerca de 3 a 4 vezes maior que o indicado na literatura. Se forem considerados os processos industriais, uma produção por tempo prolongado pode levar a problemas de contaminação nos meios, com produção de metabólitos indesejáveis e menor rendimento, devido à competição entre o microrganismo produtor e contaminantes pelo substrato e nutrientes, além de se produzir menor número de lotes por tempo de produção (no caso 3 a 4 vezes menor do que o esperado). Considerando essas observações, do ponto de vista industrial, o processo seria mais interessante se o (s) fator (es) que leva (m) a esse prolongamento no tempo de produção fosse (m) identificado (s) e resolvido (s).

A caracterização do polissacarídeo produzido pelas duas linhagens estudadas se faz necessária. A modificação no meio de cultura pode levar à elaboração de produto com características diferentes daquele produzido no meio original.

A partir da constatação de que o extrato de levedura, como fonte de nitrogênio e de sais, e xaropes comerciais de glucose de milho e de maltose de milho, como fontes de carbono, podem ser empregados na produção do polissacarídeo insolúvel, a otimização do meio de cultura levaria a melhores resultados de produtividade. O melaço de cana-de-açúcar, após tratamento adequado, poderia também ser avaliado na produção do polímero insolúvel.

6. REFERÊNCIAS

- ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 386. **Diário Oficial da União**. Brasília, 05 ago. 1999. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm. Acesso em: 28 mar. 2002.
- CHEESMAN, Iain, BROWN, R. Malcom. **Microscopy of curdlan structure**. 1995, Austin. Disponível em: <http://www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown/ongres/icheese.htm>. Acesso em: 07 mai. 1998.
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS. **Food additives permitted for direct addition to food for human consumption**. Curdlan. 21 CFR 172. Federal Register 61(242): 65941, 1996. Disponível em: http://www2.ncsu.edu/ncsu/cals/cours/food_law/module2/freminid.html. Acesso em: 08 set. 1998.
- CRUEGER, Wulf; CRUEGER, Anneliese. **Biotechnología: Manual de Microbiología Industrial**. Traducción Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, 1993, p. 379-383.
- DEMAIN, Arnold L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnhnology Advances**, n. 18, p. 499-514, 2000.
- DUBOIS, Michel; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. et alii. colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, March 1956.
- EVANS, Leigh R.; LINKER, Alfred; IMPALLOMENI, Giuseppe. Structure of succinoglycan from an infectious strain of *Agrobacterium radiobacter*. **International Journal of biological Macromolecules**, n. 27, p. 319-326, 2000.
- FUNAMI, T.; FUNAMI, M.; YADA, H.; NAKAO, Y. Gelation mechanisms of curdlan by dynamic viscoelasticity measurements. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 1, p. 129-132, 1999.
- FUNAMI, T.; FUNAMI, M.; YADA, H.; NAKAO, Y. A rheological study on the effects of heating rate and dispersing method on the gelling characteristics of curdlan aqueous dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 5, p. 509-518, Sept. 2000.

- GAO, Ying; FUKUDA, Akiko; KATSURAYA, Kaname; KANEKO, Yutaro; MUMURA, Toru; NAKASHIMA, Hideki; URYU, Toshiyuki. Synthesis of regioselective substituted curdlan sulafates with medium molecular weights and their specific anti-HIV-1 activities. **Macromolecules**, v. 30, p. 3224-3228, 1997.
- GAO, Ying; KATSURAYA, Kaname; KANEKO, Yutaro; MINURA, Toru; NAKASHIMA, Hideki; URYU, Toshiyuki. Synthesis of azidothymidine-bound curdlan sulfate with anti-human immunodeficiency virus activity *in vitro*. **Polymer Journal**, v. 30, n. 1, p. 31-36, 1998.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, n. 18, p. 549-579, 2000.
- GUILLOUET, S.; CHOI, J. H.; RHA, C. K.; STINSKEY, A. J. Effects of yeast extract on the production and the quality of the exopolysaccharide, zooglan, produced by *Zoogloea ramigera* 115SLR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 51, p. 235-240, 1999.
- HAMASE, Kenji; NAKAMURA, Hiroshi; NAKAJIMA, Terumi. Curdlan gel as a promising support for electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 7, p. 812-817, Oct. 1999.
- HARADA, Tokuya, FUJIMORI, Ken, HIROSE, Susumu, MASADA, Matsue. Growth and β -glucan 10C3K production by a mutant of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* in defined medium. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 30, n. 8, p. 764-769, 1966.
- HARADA, Tokuya, HARADA, Akira. Curdlan and Succinoglycan. In: DUMITRU, Severian. **Polysaccharides in Medical Applications**. New York: Marcel Dekker, 1996. Chapter 2, p. 21-58.
- HARADA, Tokuya, MISAKI, Akira, SAITO, Hiroshi. Curdlan: a bacterial gel-forming β -1,3-glucan. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 124, p. 192-298, 1968.
- HARADA, Tokuya, TERASAKI, Mamoru, HARADA, Akira. Curdlan. In: WHISTLER, Roy L., BEMILLER, N. **Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives**. New York: Academic Press, 1993. Chapter 15, p. 427-445.

- HARADA, Tokuya, YOSHIMURA, Tadashi. Production of a new acidic polysaccharide containing succinic acid by a soil bacterium. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 83, p. 374-376, 1964.
- HARADA, Tokuya, YOSHIMURA, Tadashi. Rheological properties of succinoglucan 10C3 from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1027-1032, 1965.
- HARADA, Tokuya. Studies on bacterial gel forming β -1,3-glucans (curdlan-type polysaccharides) in Japan. In: TERUI, Gyoza (Ed.). **Proc. IV IFS: Fermentation Technology Today**, Osaka: Society of Fermentation Technology, 1972. p. 603-607.
- HARADA, Tokuya. Succinoglucan 10C3: a new acidic polysaccharide of *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 112, p. 65-69, 1965.
- HARADA, Tokuya. Succinoglucan and gel-forming beta-1,3-glucan. **Process Biochemistry**, v. 9, n. 1, p. 21-25, 1974.
- HARADA, Tokuya; KANZAWA, Yoshimi; KANENAGA, Kazuko; KOREEDA, Atuo; HARADA, Akira. Electron microscopic studies on the ultrastructure of curdlan and other polysaccharides in gels used in foods. **Food Structure**, v. 10, p. 101-106, 1991.
- HARADA, Tokuya; OKUYAMA, Kenji; KONNO, Akira; KOREEDA, Atuo; HARADA, Akira. Effect of heating on formation of curdlan gels. **Carbohydrate Polymers**. n. 24, p. 1010-106, 1994.
- HISAMATSU, M.; OTT, I.; AMEMURA, A. Change in ability of *Agrobacterium* to produce water-soluble and water-insoluble β -glucans. **Journal of General Microbiology**, v. 103, p. 375-379, 1977.
- IGARASHI, Ikuo; NJONGE, Francis Kimani; KANEKO, Yutaro; NAKAMURA, Yoshihiro. *Babesia bigemina*: *in vitro* and *in vivo* effects of curdlan sulfate on growth of parasites. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 290-293, 1998.

- JECFA - JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Compendium of Food Additive Specifications**. Addendum 7. 53rd session. Rome, 1-10 June 1999. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/x3860e/x3860e00.htm>. Acesso em 23 set. 2001.
- JEZEQUEL, Valerie. Curdlan: a new functional β -glucan. **Cereal Foods World**, v. 43, n. 5, p. 361-364, May 1998.
- KAI, Akira, ARASHIDA, Takaaki, HATANAKA, Kenichi; AKAIKE, Toshihiro; MATSUZAKI, Kei; MIMURA, Tohru; KANEKO, Yutaro. Analysis of the biosynthetic process of cellulose and curdlan using ^{13}C -labeled glucoses. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, p. 235-239, 1994.
- KAI, Akira, ISHINO, Tatsuya, ARASHIDA, Takaaki; HATANAKA, Kenichi; AKAIKE, Toshihiro; MATSUZAKI, Kei; KANEKO, Yutaro; MUMURA, Toru. Biosynthesis of curdlan from culture media containing ^{13}C -labeled glucose as the carbon source. **Carbohydrate Research**, v. 240, p. 153-159, 1993.
- KANEKO, Yuraro; YOSHIDA, Osamu; NAKAGAWA, Tyusuke et al. Inhibition of HIV-1 infectivity with curdlan sulfate *in vivo*. **Biochemical Pharmacology**, v. 39, n. 4, p. 793-797, 1990.
- KANKE, Motoko; KATAYAMA, Hirokazu; NAKAMURA, Masayo. Application of curdlan to controlled drug delivery. II. *In Vitro* and *in Vivo* drug release studies of theophylline-containing curdlan tablets. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 8, p. 1104-1108, 1995.
- KANKE, Motoko; KODA, Keiko; KODA, Yoko; KATAYAMA, Hirokazu. Application of curdlan to controlled drug delivery. I. The preparation and evaluation of theophylline-containing curdlan tablets. **Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 3, p. 414-418, 1992.
- KANKE, Motoko; TANABE, Emi; KATAYAMA, Hirokazu; KODA, Yoko; YOSHITOMI, Hironori. Application of curdlan to controlled drug delivery. III. Drug release from sustained release suppositories *in vitro*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, n. 8, p. 1154-1158, 1995.

- KANZAWA, Yoshimi; HARADA, Tokuya; KOREEDA, Atsuo; HARADA, Akira. Curdlan gel formed by neutralizing its alkaline solution. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1839-1843, 1987.
- KANZAWA, Yoshimi; HARADA, Tokuya; LOREEDA, Atuo; HARADA, Akira; OKUYAMA, Kenji. Difference of molecular association in two types of curdlan gel. **Carbohydrate Polymers**, n. 10, p. 299-313, 1989.
- KANZAWA, Yoshimi; KOREEDA, Atuo; HARADA, Akira; HARADA, Tokuya. Electron microscopy of the gel-forming ability of polysaccharide food additives. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 979-986, 1986.
- KIMURA, Hiroshi; SATO, Shigehiko; NAKAGAWA, Tsutuo et al. **New thermo-gelable polysaccharide-containing foodstuffs**. Int. Cl. A231 1/04, C12b 1/00. US n. 3.754.925. 22/03/1971; 28/08/1973.
- KONNO, Akira; AZECHI, Yasuhiro; KIMURA, Hiroshi. Properties of curdlan gel. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 101-104, Jan. 1979.
- KUGE, Takashi; SUETSUGU, Nobuyuki; NISHIYAMA, Koji. Heat-melt of β -1,3-D-glucan gel. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1315-1316, 1977.
- LAWFORD, H. G.; PHILLIPS, K. Railton. A two stage continuous process for the production of thermogelable curdlan-type exopolysaccharide. **Biotechnology Letters**, v. 4, n. 11, p. 689-694, 1982.
- LAWFORD, Hugh; ROUSSEAU, Joyce. Effect of oxygen on the rate of β -1,3-glucan microbial exopolysaccharide production. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 2, p. 125-130, 1989.
- LAWFORD, Hugh; KEENAN, Judy; PHILLIPS, Kim; ORTS, William. Influence of bioreactor design on the rate and amount of curdlan-type exopolysaccharide production by *Alcaligenes faecalis*. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 3, p. 145-150, 1986.
- LAWFORD, Hugh; ROUSSEAU, Joyce D. Bioreactor design considerations in the production of high-quality microbial exopolysaccharide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28/28, p. 667-683, 1991.

- LEE, I-Y; SEO, W. T.; KIM, G. J.; KIM, M. K.; PARK, C. S.; PARK, Y. H. Production of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* species. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 255-259, 1997.
- LEE, J. W.; YEOMANS, W. G.; ALLEN, A. L.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. L. Microbial production of water-soluble non curdlan type exopolymer-B with controlled composition by *Agrobacterium* sp. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 12, p. 1217-1221, 1997.
- LEE, Jin W.; YEOMANS, Walter G.; ALLEN, Alfred L.; KAPLAN, David L.; DENG, Frank; GROSS, Richard A. Exopolymers from curdlan production: incorporation of glucose-related sugars by *Agrobacterium* sp. strain ATCC 31749. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 149-156, 1997.
- LEHNINGER, Albert Lester. **Bioquímica**. v. 3: biossíntese e a utilização da energia das ligações de fosfato. Tradução: José Reinaldo Magalhães. São Paulo: Edgard Blücher. 5ª reimpressão, 1987.
- MALLETTE, M. F. Evaluation of growth by physical and chemical means. **Methods in Microbiology**, v. 1, p. 521-561, 1969.
- MAURY, Adélaïde; ROQUE, Jean. Les Polysaccharides. **Biofutur**, p. 17-31, Sep. 1986.
- NAKANISHI, Itaru; KIMURA, Kazutsugu; KUSUI, Sadao; YAMAZAKI, Enchiro. Complex formation of gel-forming bacterial (1→3)-β-D-glucans (curdlan-type polysaccharides) with dyes in aqueous solutions. **Carbohydrate Research**, v. 32, p. 47-52, 1974.
- NAKANISHI, Itaru; KIMURA, Kazutsugu; SUZUKI, Takashi; ISHIKAWA, Michio; BANNO, Isao; SAKANE, Takeshi; HARADA, Tokuya. Demonstration of curdlan-type polysaccharide and some other β-1,3-glucan in microorganisms with aniline blue. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 1-11, Feb. 1976.
- NAKAO, Yukihiro; KONNO, Akira; TAGUCHI, Tetsuya; TWADA, Toshio; KASAI, Hiroshi; TODA, Jun; TERASAKI, Mamoru. Curdlan: properties and application to foods. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 3, p. 769-776, 1991.

- NISHINARI, K.; HIRASHIMA, M.; MIYOSHI, E.; TAKAYA, T. Rheological and DSC studies of aqueous dispersions and gels of curdlan. In: WILLIAMS, P. A., PHILLIPS, G. O. **Gums and Stabilisers for the Food Industry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998. v. 9, p. 26-33.
- NISHINARI, K; ZHANG, H.; IKEDA, S. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. n. 5, p. 195-201, 2000.
- OGAWA, Kozo; TSURUGI, Jitsuo. The dependence of the conformation of a (1→3)-β-D-glucan on chain-length in alkaline solution. **Carbohydrate Research**, v. 29, p. 397-403, 1973.
- OGAWA, Kozo; WATANABE, Takehiko; TSURUGI, Jitsuo; ONO, Sôzaburo. Conformational behavior of a gel-forming (1→3)-β-D-glucan in alkaline solution. **Carbohydrate Research**, v. 23, p. 399-405, 1972.
- OHYA, Yuichi; NISHIMOTO, Takehiro; OUCHI, Tatsuro. Design of D-glucose analogue of MDP/CM-curdlan conjugate and its immunological enhancement activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 20, p. 43-49, 1993.
- PACE, Gary W. Polímeros microbianos. In: BU'LOOCK, John; KRISTIANSEN, Bjorn. **Biotecnología Básica**. Traducción: Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, 1991. p. 449-462.
- PACE, Gary W.; RIGHELATO, Renton C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 15, p. 41-70, 1980.
- PHILLIPS, K. R.; LAWFORD, H. G. Theoretical maximum and observed product yields associated with curdlan production by *Alcaligenes faecalis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1270-1276, 1983a.
- PHILLIPS, K. Railton; LAWFORD, H. G. Curdlan: its properties and production in batch and continuous fermentations. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 18, p. 201-229, 1983b.

- PHILLIPS, K. Railton; PIK, J.; LAWFORD, H. G. Production of curdlan-type polysaccharide by *Alcaligenes faecalis* in batch and continuous culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1331-1338, 1983.
- PSZCZOLA, Donald E. Curdlan differs from other gelling agents. **Food Technology**, v. 51, n. 4, p. 30, 1997a.
- PSZCZOLA, Donald E. High Technology: taking ingredients to a new level. **Food Technology**, v. 51, n. 6, p. 79-80, June 1997b.
- ROLLER, S.; DEA, I. C. M. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 261-277, 1992.
- ROSENBERG, Eugene. Exploiting microbial growth on hydrocarbons - new markets. **Trends in Biotechnology**, v. 11, p. 419-424, 1993.
- SAITÔ, Hazime; YOKOI, Motoko; YOSHIOKA, Yuko. Effect of hydration on conformational change or stabilization of (1-3)- β -D-glucans of various chain lengths in the solid state as studied by high-resolution solid-state ^{13}C NMR spectroscopy. **Macromolecules**, n. 22, p. 3892-3898, 1989.
- SASAKI, Takuma; ABIKO, Noriko; SUGINO, Yukio; NITTA, Kazuo. Dependence on chain length of antitumor activity of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan from *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*, IFO 13140, and its acid-degraded products. **Cancer research**, v. 38, p. 379-383, Feb. 1978.
- SCHWARTZ, R. D.; BODIE, E. A. Production of high-viscosity whey broths by a lactose-utilizing *Xanthomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 50 p. 1483-1485, 1985.
- SEGUCHI, M.; KUSUNOSE, C. Liophilization of curdlan granules by heat-treatment or chlorination. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 177-183, 2001.
- SOUW, P.; DEMAÏN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiologyn**, n. 37, p. 1186-1192, 1979.

- SOUZA, Angelita M. de; SUTHERLAND, I. W. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 76, p. 463-468, 1994.
- SPICER, E. J. F.; GOLDENTHAL, E. I.; IKEDA, T. A toxicological assessment of curdlan. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 455-479, 1999.
- STIPANOVIC, A. J., GIAMMATTEO, P. J. CP/MAS ¹³C-NMR studies on aqueous polysaccharide gels. In: YALPANI, M. **Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 281-292.
- SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysaccharides - involving molecules. **Abstracts Papers of American Chemical Society**, 185 meet, CARB 14, Oct. 1999.
- SUTHERLAND, Ian W. Biosynthesis of extracellular polysaccharides (exopolysaccharides). In: WHISTLER, Roy L.; BEMILLER, James N. **Industrial Gums**. 3rd ed. New York: Academic Pres, 1993. p. 69-85.
- SUTHERLAND, Ian W. Microbial biopolymers from agricultural products: production and potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 38, n. 3-4, p. 249-261, 1996.
- SUTHERLAND, Ian W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, n. 11, p. 663-674, 2001.
- SUTHERLAND, Ian W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 12, p. 393-448, 1994.
- TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Introducción a la Microbiología**. Traducción: Rafael Rotger Anglada. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 224-225.
- TREVAN, M. D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, B. **Biotecnología: principios biológicos**. Traducción: Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, 1990.
- VANDAMME, E. J.; BRUGGEMAN, G.; BAETS, S. de; VANHOOREN, P. T. Useful polymers of microbial origin. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**, p. 21-25, Sep-Oct. 1996.
- ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Succinoglycan and galactoglucan. **Carbohydrate Polymers**. n. 33, p. 139-144, 1997.

ZHANG, H.; HUANG, L.; NISHINARI, K.; WATASE, M.; KONNO, A. Thermal measurements of curdlan in aqueous suspension during gelation. **Food Hydrocolloids**, v. 14, n. 2, p. 121-124, Mar 2000.