

BIOSSÍNTESE DE GOMA XANTANA A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE SORO DE LEITE: RENDIMENTO E VISCOSIDADE

Tatiana Barreto Rocha Nery* e Líllian Vasconcellos Brandão

Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Bahia, 40210-630 Salvador - BA, Brasil

Maria Cecília Azevedo Esperidião

Departamento de Química, Universidade Federal da Bahia, 40170-290 Salvador - BA, Brasil

Janice Izabel Druzian

Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, 40170-210 Salvador - BA, Brasil

Recebido em 27/6/07; aceito em 2/6/08; publicado na web em 10/11/08

BIOSYNTHESIS OF XANTHAN GUM FROM THE FERMENTATION OF MILK WHEY: PRODUCTIVITY AND VISCOSITY. Xanthan is a polysaccharide synthesized by *Xanthomonas* bacteria and of extreme commercial importance as a microbial polysaccharide. The aim of this work was to produce xanthan using mozzarella cheese whey as substrate, by different isolates natives the *Xanthomonas*. The alternative medium for production was milk whey, urea and K_2HPO_4 . The xanthan maximum productivity was 21.91 g L^{-1} . Analysis of apparent viscosity was made in solutions of gum at 0.5-2.0%, 25-65 °C with shear rate of 25-1000 s^{-1} . The maximum viscosity found was 57.30 mPa.s. The isolates demonstrate capacity to degrade the lactose and to produce xanthan, being constituted an alternative for the industrial production.

Keywords: xanthan gum; milk whey; *Xanthomonas campestris*.

INTRODUÇÃO

Biopolímeros microbianos são macromoléculas formadas por monossacarídeos e derivados ácidos, podendo ser sintetizados por bactérias, fungos e leveduras. Os biopolímeros encontram vasto campo de aplicação nos mais variados ramos industriais, sendo que as características reológicas são dependentes da composição química,¹ que por sua vez depende da cepa, da fonte de carbono e condições utilizadas no processo fermentativo, como o teor de oxigênio dissolvido, temperatura e tempo de fermentação.

A goma xantana é um biopolímero produzido por bactérias gram-negativas do gênero *Xanthomonas* e possui estrutura primária formada por unidades repetidas de pentassacarídeos. A cadeia linear é formada por duas unidades de glicose, e o trissacarídeo das ramificações por duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico,^{2,3} (Figura 1). Em aproximadamente metade das unidades de D-manose terminal, um resíduo de ácido pirúvico está ligado nas posições 4 e 6. A unidade de D-manose não terminal carrega um grupo acetil na posição 6.^{1,2,4} As propriedades reológicas das soluções de xantana mudam com a natureza do polímero, dependendo do peso molecular médio e da estrutura molecular. Os grupos acetil e piruvil contidos podem variar dependendo da composição do meio de cultivo e das condições de processo, assim como das culturas de microrganismos usadas. Fatores como alto grau de acetilação e especialmente baixo grau de piruvatação aumentam a viscosidade de suas soluções, porque as associações intermoleculares são favorecidas.^{4,5}

Provavelmente a goma xantana deve continuar sendo o biopolímero mais utilizado nos próximos anos, devido às suas características reológicas singulares, pois possui capacidade de alterar as propriedades básicas da água como espessante, estabilizante de emulsões, suspensão, geleificação, entre outras. Soluções de xantana possuem alta viscosidade em baixas concentrações, estabilidade em uma ampla

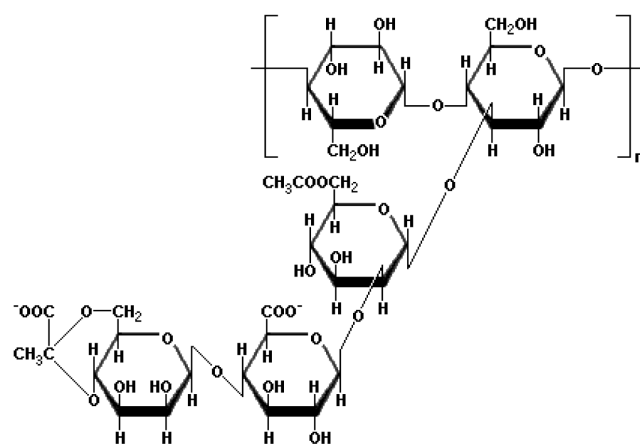


Figura 1. Estrutura unitária (monômero) do polissacarídeo de goma xantana

faixa de temperatura, pH e concentração de sais. Por estas razões, a goma xantana tem sido bastante empregada, principalmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e petrolífera.^{3,4}

Devido ao mercado crescente, muitos estudos têm sido conduzidos objetivando o melhoramento das linhagens, dos meios de cultivo e dos processos de fermentação, extração e purificação de goma xantana. A maior parte da literatura referente à produção de xantana cita o uso de glicose ou sacarose como fontes de carbono preferenciais,^{1,2,5} entretanto, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas,^{6,7} visando principalmente reduzir os problemas relacionados às questões ambientais com o aproveitamento de resíduos industriais e a diminuição nos custos de produção.

O soro de leite, resultante da fabricação de queijos, vem sendo estudado como alternativa promissora, em bioprocessos, para a obtenção da goma xantana.^{8,9} A utilização de substratos alternativos poderá auxiliar a produção de goma xantana no país, ajudando a eliminar

*e-mail: tatianabr@ufba.br

os problemas ambientais como o descarte de efluentes, além do que o Brasil poderia suprir sua própria demanda de goma xantana com maior competitividade no preço final, visto que toda goma xantana utilizada no país é importada.

O soro de leite é um líquido obtido da coagulação do leite na elaboração do queijo, logo após a separação da caseína e da gordura. No leite, o soro representa de 80 a 90% do volume total que entra no processo industrial e contém em torno de 6,0 a 6,4% de extrato seco. Aproximadamente 55% dos nutrientes do leite original permanecem no soro, como proteínas solúveis, lactose, vitaminas e sais minerais, tornando-se muito atrativo, além de economicamente viável, para processos fermentativos.¹⁰

O presente trabalho teve por objetivos avaliar o rendimento da produção de goma xantana por diferentes linhagens nativas de *Xanthomonas campestris*, utilizando como substrato fermentativo o soro de leite, determinar a viscosidade aparente das soluções aquosas da goma xantana obtida com a cepa que apresentou melhor produtividade e comparar com dados obtidos para a goma xantana obtida com a sacarose.

PARTE EXPERIMENTAL

Microrganismos

Foram utilizadas as seguintes bactérias nativas das linhagens biofilizadas de *Xanthomonas*, doadas da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico – IBSBF, Campinas, SP: nº 2149 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; nº 1866 *Xanthomonas campestris campestris*; nº 2103 *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae*.

Soro de leite

O soro de leite utilizado foi doado pela Escola Agrotécnica Federal de Catu, BA. O material foi obtido durante a produção de queijo mussarela com leite desnatado. O soro foi imediatamente congelado após recebimento, em volumes de 500 mL, e mantido a -5 °C para ser utilizado durante o decorrer do trabalho.

Análise da composição centesimal do soro de leite

Os teores de umidade, proteína bruta e cinzas foram determinados segundo metodologia da AOAC.¹¹ O teor de lipídios totais foi determinado pelo método Bligh e Dyer.¹² O percentual de carboidratos foi calculado pela diferença entre 100 e a soma das porcentagens de água, proteína, lipídios totais e cinzas.

Meios de cultura

Para o processo de repicagem utilizou-se o meio YM-agar (sólido) (Tabela 1). O volume de 10 mL do meio foi transferido para tubos de ensaio, autoclavados por 121 °C/15 min e esfriados inclinados. A repicagem foi realizada com uma alçada de cada cultura, em tubos diferentes, e mantidos em estufa por 48 h numa temperatura de 28 °C.

Para a preparação do inóculo foi utilizado o meio YM padrão (Yeast-Malt) líquido,¹³ (Tabela 1). O volume de 50 mL do meio YM foi autoclavado (121 °C/15 min) em erlenmeyers de 250 mL, esfriado, inoculado com uma alçada da cultura de *Xanthomonas campestris* e incubado a 28 °C/50 rpm/48 h.

Produção de goma xantana

Para a produção de goma xantana foram utilizados o meio fermentativo padrão (sacarose como fonte de carbono) e o meio alternativo

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados para a repicagem e para o inóculo das cepas de *Xanthomonas* e no processo fermentativo de produção de goma xantana

Componente	Meio	
	Meio YM fermentativo Padrão	Meio fermentativo alternativo
Glicose (g L ⁻¹)	10	-
Peptona (g L ⁻¹)	5	-
Extrato de levedura (g L ⁻¹)	3	-
Extrato de malte (g L ⁻¹)	3	-
Sacarose (%)	-	2
Soro de leite (mL)	-	-
Uréia (%)	-	0,01
K ₂ HPO ₄ (%)	-	0,1

(soro de leite), conforme descritos na Tabela 1. O pH dos meios foi ajustado para 7,0 com adição de HCl. Os meios foram autoclavados, em erlenmeyers, a 121 °C por 15 min. Após a autoclavagem, o meio alternativo apresentou aspecto turvo com coloração marrom, devido à degradação dos açúcares presentes e precipitação das proteínas.

Foram transferidos 16 mL dos inóculos produzidos com cada cepa (2103, 1866 e 2149) para erlenmeyers de 250 mL contendo 80 mL do meio padrão (sacarose) e para erlenmeyers contendo meio alternativo (soro de leite). O cultivo aeróbico em batelada foi realizado em agitador orbital, modelo Tecnal, com agitação de 250 rpm a 28 °C por 120 h, de acordo metodologia aplicada por García-Ochoa.²

Recuperação da goma xantana

Para a separação de goma xantana produzida, foi adicionado álcool etílico na proporção de 3 partes de álcool para 1 parte do meio fermentativo. A goma formada, nos diferentes meios, foi separada por centrifugação a 4 °C e 9625 x g por 15 min, transferida para placas, previamente taradas. A goma obtida foi seca em estufa (30 ± 2 °C) até se obter massa constante e moída.

O rendimento de goma xantana por litro de meio fermentativo utilizado foi medido por gravimetria. O rendimento da produção foi calculado e os valores foram expressos em g L⁻¹.

Viscosidade

A viscosidade aparente foi medida em função da taxa de cisalhamento em um viscosímetro Haake Rheotest, com dispositivo de cilindros concêntricos, acoplado a um banho-maria. Foram requeridos, para esse modelo de viscosímetro, 25 mL das soluções aquosas de goma xantana. A dissolução das soluções para análise ocorreu sob agitação manual constante por aproximadamente 5 min em temperatura ambiente. As soluções diluídas foram mantidas a temperatura ambiente por 12 h antes de se proceder às medições de viscosidade. Cada amostra foi transferida para o equipamento e aplicou-se uma velocidade de rotação variável aos eixos metálicos imersos no líquido. Foi realizada análise de viscosidade aparente de soluções aquosas nos intervalos de concentração de 0,5 a 2% de xantana, temperatura de 25, 45, 65 e 85 °C e taxa de cisalhamento de 25 a 1000 s⁻¹. As unidades de medida utilizadas foram: mPa.s, para viscosidade aparente (η), 1/s (s⁻¹) para taxa de cisalhamento e (mPa) para tensão de cisalhamento. O efeito da taxa de cisalhamento na viscosidade das soluções de goma xantana foi descrito pelo modelo cinético de Ostwald-de Waele:

$$\mu = K.(\dot{\gamma})^{n-1} \quad (1)$$

onde K é o índice de consistência, n é o índice do comportamento do fluxo, μ é a viscosidade aparente e γ é a taxa de cisalhamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coloração do biopolímero, precipitado e seco, variou de acordo com a fonte de carbono utilizada. A goma xantana obtida pela bioconversão da sacarose apresentou coloração mais clara que a obtida com o soro de leite, devido ao escurecimento do meio composto de soro de leite após a esterilização em autoclave, provavelmente resultante da reação de Maillard.

Na Tabela 2 são mostrados os resultados da composição centesimal do soro de leite, obtido da produção de queijo mussarela com leite desnatado, usado como meio fermentativo alternativo para a biossíntese de goma xantana.

Tabela 2. Composição centesimal do soro de leite utilizado como meio fermentativo para biossíntese de goma xantana

Análises	Composição (%)
Umidade	93,39 ± 0,06
Cinzas	0,47 ± 0,01
Proteína bruta	2,24 ± 0,02
Lipídios totais	0,46 ± 0,01
Carboidratos	3,44 ± 0,01

O soro de leite apresentou 93,39% de umidade e, portanto, 6,61% de matéria seca. Em relação à matéria integral, o valor de proteínas apresentado ficou em torno de 2,0%, enquanto que para as cinzas e carboidratos foi de 0,5 e 3,4%, respectivamente. Estes compostos têm grande importância considerando a utilização dos mesmos como substratos na fermentação pelas bactérias *Xanthomonas*, uma vez que irão fazer parte dos nutrientes tanto para o crescimento celular como para a biossíntese de goma xantana durante o processo fermentativo.

Segundo Nitschke *et al.*,¹⁰ o soro do queijo representa de 80 a 90% do volume total do leite que entra no processo industrial e contém em torno de 6,0 a 6,4% de extrato seco. O valor obtido para o soro de leite utilizado neste trabalho está neste intervalo (Tabela 2). Os resultados dos rendimentos das produções de gomas xantana obtidas pelas diferentes cepas, utilizando o meio fermentativo padrão constituído por uréia, K_2HPO_4 e sacarose e o meio alternativo constituído por uréia, K_2HPO_4 e soro de leite como fontes de nitrogênio, potássio e carbono a 28 °C, 250 rpm por 120 h de fermentação, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Média da produção de goma xantana ($g L^{-1}$) em triplicatas, utilizando diferentes fontes de carbono e diferentes cepas de *Xanthomonas campestris*

Cepas de <i>X. campestris</i>	Soro de leite	Sacarose
1866	12,36 ± 0,05	3,75 ± 0,04
2103	21,91 ± 0,07	6,62 ± 0,08
2149	- ^a	5,58 ± 0,06

^aHouve formação de goma porém não precipitou com álcool etílico.

Comparando os valores de produção de gomas xantana obtidas a partir da sacarose, fonte de carbono padrão, com valores obtidos para gomas xantana a partir do soro de leite, constatam-se rendimentos maiores para a bioconversão a partir da fonte alternativa. Com a cepa 2103 a produção de xantana a partir do soro de leite ($21,90 g L^{-1}$) foi três vezes maior que a produção utilizando a sacarose ($6,62 g L^{-1}$) como

fonte de carbono. Esses resultados indicam que é possível obter goma xantana a partir do meio alternativo testado, com as cepas 2103 e 1866, reduzindo os custos de produção, uma vez que os substratos utilizados são subprodutos da agroindústria, possuindo baixo valor agregado.

O cultivo pelas linhagens 1866, 2103 e 2149 de *Xanthomonas campestris* em incubadora a 28 °C, 250 rpm por 120 h de fermentação converteu a lactose do soro de leite de 12,40 a 21,90 $g L^{-1}$ de goma xantana, dependendo da cepa. A maior produção de xantana em $g L^{-1}$ foi obtida com a cepa 2103.

A bioconversão de soro de leite a goma xantana pelas cepas 2103 e 1866 indica a presença de β -galactosidade nestas linhagens. A cepa 2149, baseando-se nos resultados obtidos, foi a que apresentou menor adaptação à fonte de carbono alternativa (soro de leite), provavelmente, devido à baixa concentração da enzima β -galactosidade. Vale salientar que houve aumento considerável da viscosidade do meio após a fermentação, o que indica que houve formação de goma pela cepa 2149 com soro de leite, porém não foi possível precipitá-la com álcool etílico. Isto se deve provavelmente ao baixo peso molecular da goma produzida. Estudos alterando a composição do meio fermentativo devem ser desenvolvidos a fim de se obter goma xantana precipitável a partir do soro de leite com a cepa 2149.

Dentre os poucos estudos utilizando soro de leite para a produção de biopolímeros, encontrou-se a produção de $14,70 g L^{-1}$ de goma xantana, com 72 h de fermentação a 200 rpm e 28 °C pela cepa *Xanthomonas campestris* C₇L relatado por Nitschke *et al.*;¹⁰ e a produção de $25,40 g L^{-1}$ de goma xantana pela cepa de *Xanthomonas campestris* 1230, a 28 °C, 72 h e agitação a 180 rpm, valores obtidos por Silva e Treichel.¹⁴

O principal problema encontrado na produção de goma xantana a partir de soro de leite é a baixa capacidade de utilização da lactose pelas bactérias *Xanthomonas campestris*, fato que se deve à pouca expressão da enzima β -galactosidase da bactéria. As β -galactosidases, popularmente conhecidas como lactases e classificadas como hidrolases, são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose, que serão utilizadas por isomerase e polimerase das bactérias de *Xanthomonas*.

Foi avaliada a viscosidade da goma xantana obtida pela cepa 2103, visto que demonstrou maior bioconversão de lactose a goma xantana. As propriedades reológicas foram avaliadas através da análise de viscosidade aparente. A principal característica exibida pela goma é sua habilidade de modificar o comportamento reológico das suas soluções. Esta variação está relacionada principalmente à composição química, arranjo e/ou ligação molecular e peso molecular médio da goma xantana. A concentração da solução de biopolímeros possui efeito direto na viscosidade e no grau de pseudoplasticidade.¹⁵

O comportamento típico da viscosidade aparente das soluções aquosas de goma xantana é um aumento do valor proporcional ao aumento da concentração do biopolímero (Figuras 2 e 3).

A viscosidade da goma xantana, obtida pela bioconversão do soro de leite, diminuiu com o aumento da temperatura (Figuras 2 e 4). Este comportamento está associado às mudanças da conformação das moléculas de xantana.¹⁶

O efeito da taxa de cisalhamento na viscosidade das soluções de goma xantana pode ser descrito pelo modelo cinético de Ostwald-de Waele.

Nas Figuras 3 e 4 observa-se o efeito da taxa de cisalhamento na viscosidade da goma xantana de acordo com a Equação 1. A viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento.

Os resultados do comportamento reológico da goma xantana produzida com soro de leite no processo fermentativo e a linhagem 2103 em diferentes tensões de cisalhamento, concentrações e temperaturas estão ilustrados na Figura 4. As soluções preparadas com os polissacarídeos apresentaram comportamento pseudoplástico, típico de soluções de xantana.^{1,2}

Os resultados de viscosidade aparente das gomas obtidas pela fermentação do soro de leite pela cepa nativa *X. campestris mangiferaindicae* 2103 foram menores que os encontrados por Antunes et al.,¹⁷ onde as soluções aquosas de goma xantana (3%) obtida a partir

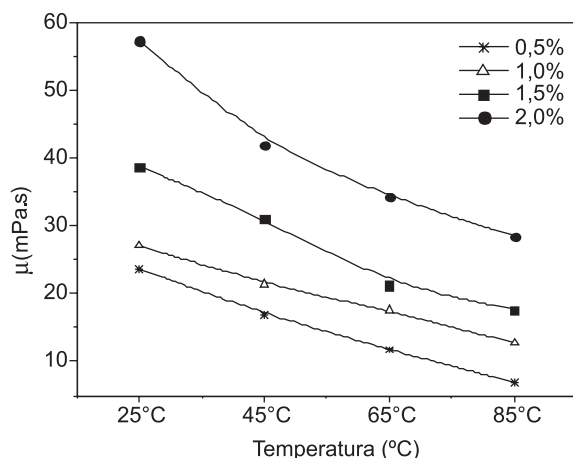


Figura 2. Comportamento da viscosidade aparente da goma xantana obtida a partir do soro de leite, fixando-se $\dot{\gamma}$ em 25 s^{-1} e variando-se as temperaturas de 21 a $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e as concentrações de 0,5 a 2,0%

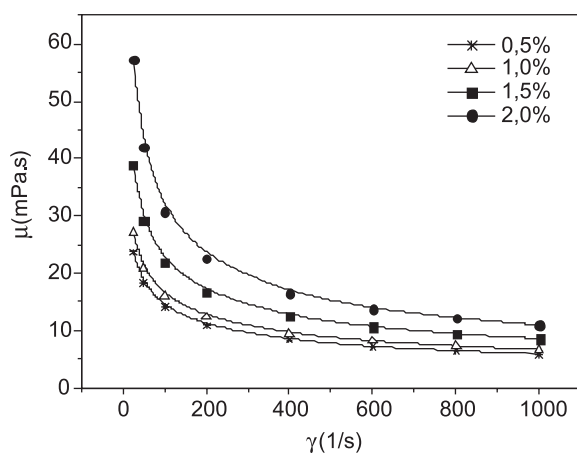


Figura 3. Comportamento da viscosidade aparente da goma xantana obtida a partir do soro de leite, fixando-se a temperatura em $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e variando-se as concentrações de 0,5 a 2,0% e $\dot{\gamma}$ de 25 a 1000 s^{-1}

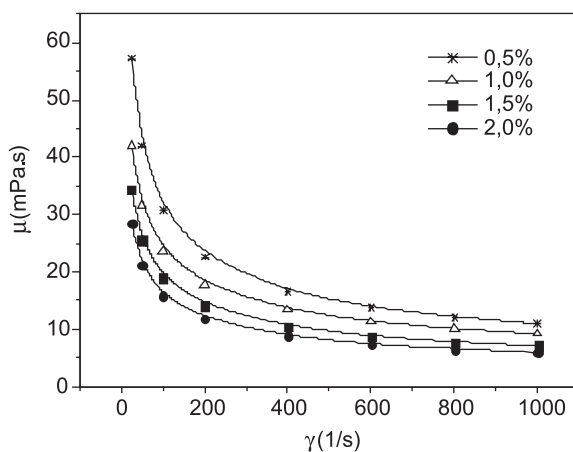


Figura 4. Comportamento da viscosidade aparente da goma xantana obtida a partir do soro de leite, fixando-se a concentração em 2,0% e variando-se a temperatura de 25 a $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $\dot{\gamma}$ de 25 a 1000 s^{-1}

de soro de leite fermentado a 12 rpm e $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ alcançaram medidas entre 10.000 e 15.000 mPa.s. Nitschke et al.,¹⁰ obtiveram viscosidade variando de 2030 a 6161 mPa.s para soluções aquosas a 1%, 10 s^{-1} e $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, de goma xantana, pelo isolado C₇L, em meios à base de soro de leite. Silva e Treichel¹⁴ obtiveram viscosidade aparente de 61,3 mPa.s, a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $13,2 \text{ s}^{-1}$, para soluções aquosas a 3,0% de gomas sintetizadas a partir do soro de leite, com 72 h de fermentação.

Segundo Sutherland,¹ uma elevada concentração de nitrogênio é necessária para um rápido crescimento celular, entretanto, quando a concentração de nitrogênio no meio de cultura for muito elevada, a xantana produzida possui propriedades reológicas inadequadas. Meios contendo elevado teor de carbono e baixo teor de nitrogênio favorecem o acúmulo de polímero. Em geral, os processos industriais procuram utilizar meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento como para o acúmulo de goma.¹⁸

Os dados da composição centesimal obtidos para o soro de leite (Tabela 2) comprovam que o meio contém alta relação entre C e N, o que levou à biossíntese em grandes quantidades de goma xantana, mas com viscosidades aparentes relativamente baixas, confirmando a teoria de Sutherland.¹

Para confirmação do comportamento pseudoplástico das soluções, foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald-de Waele aos dados experimentais, a partir da regressão de potência.

As amostras das soluções de goma xantana obtidas a partir do soro de leite seguiram o modelo descrito, com todos os coeficientes de correlação R^2 iguais a 0,99. O valor de n, em todos os casos, foi menor que a unidade, o que implica em um comportamento pseudoplástico⁸ (Tabela 4).

O índice da consistência (K) tende a aumentar com o aumento da concentração de goma xantana (Tabela 4). Este efeito foi descrito também por Xuewu et al.¹⁹

Ahmed e Ramaswamy²⁰ relataram que com o aumento da concentração da solução de goma xantana ocorre simultaneamente o decréscimo nos valores do índice de fluxo (n). Silva e Treichel¹⁴ obtiveram valores de $R^2 = 0,9992$, $K = 1,926$ e $n = 0,475$ para as soluções aquosas a 3,0% ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) de goma sintetizada a partir de soro de leite e *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* com 72 h de fermentação.

Tabela 4. Valores do índice de fluxo (n) e de consistência (K) da goma xantana produzida a partir do soro de leite por *Xanthomonas campestris* 2103 nas temperaturas de 25 a $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Solução da goma obtida a partir do soro de leite				
	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %
T (°C)				
<i>n</i>				
25	0,515	0,487	0,386	0,396
45	0,581	0,520	0,418	0,380
65	0,659	0,580	0,433	0,367
85	0,633	0,644	0,492	0,360
T (°C)				
<i>K</i>				
25	234,6	287,1	727,1	844,7
45	133,1	209,6	527,8	785,3
65	68,0	117,1	407,2	707,2
85	66,6	62,4	197,7	656,0
T (°C)				
R^2				
25	0,99	0,99	0,99	0,99
45	0,99	0,99	0,99	0,99
65	0,99	0,99	0,99	0,99
85	0,99	0,99	0,99	0,99

CONCLUSÕES

Foi possível produzir goma xantana precipitável por fermentação em batelada do soro de leite suplementado com uréia e fosfato pelas cepas nativas de *Xanthomonas campestris campestris* n° 1866 e *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* n° 2103. Os rendimentos das bioconversões a partir do soro de leite pelas cepas 2103 e 1866 foram 3 a 4 vezes superiores aos rendimentos da bioconversão de sacarose, fonte padrão de carbono.

A fermentação com a cepa 2103 foi a que obteve maior rendimento, biossintetizando 21,91 g de goma xantana por litro de meio fermentativo composto de soro de leite suplementado com uréia e K_2HPO_4 , em 120 h de fermentação a 28 °C. A goma xantana produzida pela cepa 2103 a partir do soro de leite apresentou comportamento reológico pseudoplástico, característico de soluções poliméricas de goma xantana, com viscosidade máxima de 57,30 mPa.s para soluções aquosas de 2,0% de goma a 25 °C e baixa taxa de cisalhamento. Portanto, o soro de leite pode ser uma fonte viável de substrato para a produção de xantana, por apresentar rendimento de goma superior ao obtido com sacarose como fonte de carbono.

REFERÊNCIAS

1. Sutherland, I. W.; *Adv. Microb. Physiol.* **1982**, 23, 80.
2. García-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A.; Gómez, E.; *Biotechnol. Adv.* **2000**, 18, 549.
3. Moraine, R. A.; Rogovin, P.; *Biotechnol. Bioeng.* **1973**, 15, 225.
4. Maugeri, F. Em *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W., eds.; Edgard Blücher: São Paulo, 3ª ed., 2001.
5. Souw, P.; Demain, A. L.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, 6, 1186.
6. Yoo, S. D.; Harcum, S. W.; *Bioresour. Technol.* **1999**, 70, 105.
7. Druzian, J. I.; Pagliarini, A. P.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2007**, 27, 26.
8. Schwartz, R. D.; Bodie, E. A.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, 51, 203.
9. Thorne, L.; Tansey, L.; Pollock, T. J. J.; *Ind. Microbiol.* **1988**, 3, 321.
10. Nitschke, M.; Rodrigues, V.; Schinatto, L. F.; *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2001**, 21, 82.
11. Association of Official Analytical Chemists; *Official methods of analysis*, Ed. Rev Arlington, AOAC **1995**, 32, 7.
12. Bligh, E. G.; Dyer, W. J.; *J. Biochem.* **1959**, 37, 911.
13. Casas, J. A.; Santos, V. E.; García-Ochoa, F.; *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, 26, 282.
14. Silva, M. F.; Treichel, H.; *Vivências - Erechim* **2006**, 1, 213.
15. Sutherland, I. W.; *Food Biotechnol.* **1992**, 6, 75.
16. Milas, M.; Rinaudo, M.; *Carbohydr Res.* **1979**, 76, 189.
17. Antunes, A. E. C.; Moreira, A. S.; Vendruscolo, J. L. S.; Vendruscolo, C. T.; *Revista Brasileira de Agrobiologia* **2000**, 6, 123.
18. Vashitz, O.; Sheintuch, M.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, 37, 383.
19. Xuewu, Z.; Xin, L.; Dexiang, G.; Wei, Z.; Tong, X.; Yonghong, M. J.; *Food Eng.* **1996**, 27, 203.
20. Ahmed, J.; Ramaswamy, H. S.; *Food Hydrocolloids* **2004**, 18, 367.