



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

Departamento de Ciência de Alimentos

ESTUDO DO EFEITO DO “STRESS” ALCALINO NA PRODUÇÃO DE
GOMA XANTANA

Márcia de Mello Luvielmo
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. 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 – SP

- 2007 -

Ficha catalográfica
(pegar na biblioteca)

BANCA EXAMINADORA

PROFa. Dra. ADILMA REGINA PIPPA SCAMPARINI
(orientadora)

PROFa. Dra. YOKO BOMURA ROSATO
(membro)

PROF. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE
(membro)

Profa. Dra. IRIANI RODRIGUES MALDONADE
(membro)

Profa. Dra. YOLANDA EUGÊNIA ÁLAMO GABRINE BOZA
(membro)

PROF. JOSÉ LUIZ PEREIRA
(membro)

DEDICO...

*Aos meus pais Mário e Elaine por serem meus maiores incentivadores;
Ao Francisco Carlos por seu amor, paciência e compreensão,
Ao Pedro e a Juliana, meus filhos, por serem uma forte razão para
terminar esse trabalho,
Ao amor dessas pessoas que me fez ser capaz de superar todas as
minhas dificuldades,*

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela bolsa de estudos concedida, essencial para que esse trabalho fosse realizado; ao CNPq pelo investimento feito através do projeto de N^o 476668/2003-4 intitulado "Otimização da produção e caracterização da goma xantana"; a UNICAMP por ter me concedido mais essa oportunidade.

A Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini pelo desafio de realizar esse trabalho, por ter me ensinado muito sobre como realmente funcionam as coisas, pela oportunidade de vencer mais um grande desafio em minha vida, pelo livre arbítrio, pela amizade, confiança e calor humano, por tudo isso agradeço de coração pela orientação.

A Karla Nery pela preciosa ajuda e principalmente por sua grande amizade e carinho.

Aos membros da banca examinadora pelas grandes contribuições a esse trabalho.

A Profa. Claire Tondo Vendruscolo pelas sugestões e apoio técnico, por colocar a disposição seu laboratório e a ajuda de sua equipe, mas acima de tudo pela grande amizade.

A Caroline Borges por sua responsabilidade, disposição e amizade.

A Antônia e a Adriana do Laboratório de Microscopia eletrônica do Instituto de Biologia, pela compreensão ao qual fez ser possível terminar esse trabalho.

A Daniela de Oliveira Toyama pela enorme ajuda técnica.

A Priscila Veiga pelo ouvido, pelas sugestões, discussões, incentivo e pelo carinho.

A Ana Maria Carnio por ser uma grande amiga sempre presente.

À todos que, de alguma forma, ajudaram e incentivaram esse trabalho.

Meu muitíssimo obrigada!!!

“O PRIMEIRO DEVER DA INTELIGENCIA É
DESCONFIAR DELA MESMA”.

Albert Einstein

RESUMO GERAL

O presente estudo teve como objetivo fazer uma seleção de linhagens de *X. campestris* para a produção de goma xantana e verificar o efeito do processo de “stress” alcalino em diferentes condições de produção deste biopolímero, através da avaliação da produção de goma e da viscosidade aparente, que é um fator de elevada relevância para designar em quais processos e setores da indústria a goma xantana será aplicada. A pesquisa também teve como objetivo investigar as mudanças na estrutura da goma xantana causadas pelo “stress” alcalino, e as mudanças na ultraestrutura das células, assim como a disposição da goma em diferentes etapas da sua produção e em diferentes tempos de “stress” alcalino, a fim de contribuir com uma maior compreensão desse complexo processo. Foi selecionada a linhagem *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, como a de melhor desempenho em produção e qualidade, com uma produção de goma xantana de 10,8 g/L. A partir destes estudos, *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 passou a ser a bactéria utilizada para os estudos posteriores. O maior valor de produção de goma xantana foi atingido em “stress” alcalino com pH 12 (EA12), seguido do “stress” alcalino em pH 11 (EA11) e “stress” alcalino em pH 8 (EA08). Porém a qualidade da goma obtida após o processo de EA12 é menor se comparada à obtida sem o processo de “stress” alcalino. O hidróxido de sódio (NaOH) foi o álcali que apresentou melhor desempenho para o processo de “stress” alcalino. A produção de goma xantana (g.L^{-1}) e as viscosidades aparentes das gomas não foram afetadas nos diferentes tempos de “stress” alcalino (EA12) testados nesse estudo (1h, 2h, 3h e 4h), na faixa de taxa de deformação testada ($0 - 60 \text{ s}^{-1}$). A produção de goma xantana obtida da fermentação realizada em bioreator de 2 L utilizando *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 foi maior após o processo de “stress” alcalino por 24 horas (EA24h). Ao final de 72 horas de fermentação 9,43 g.L^{-1} de goma xantana foram obtidos e após 24 horas de “stress” alcalino, a produção foi 74,8% maior (16,48 g.L^{-1}). No estudo das ultraestruturas (capítulo IV) foi possível visualizar cada passo dos processos e verificar que, mesmo no inóculo puro, observa-se também uma pequena produção de goma xantana próximo a algumas células. No final da fermentação (FF), observou-se o início de mudanças estruturais nas bactérias, como

a vacuolização citoplasmática e a descontinuidade da membrana, podendo sugerir um início no processo de lise bacteriana. Após o “stress” alcalino (EA12-1h), foram observadas acentuadas diferenças estruturais nas células bacterianas. O conteúdo citoplasmático das bactérias tornou-se mais vacuolizado e verificou-se descontinuidade nas membranas das células bacterianas, indicando processo de lise bacteriana. A goma xantana que se apresentou agrupada em grumos, adquiriu uma conformação organizada em círculos concêntricos. Finalmente, pode ser mencionado que novos estudos com diferentes linhagens e condições de processo devem ser realizados procurando-se sempre melhores resultados de produção e qualidade desse biopolímero.

ABSTRACT

The present study had as objective to make a selection of strains of *X. campestris* for the production of xanthan gum and to verify the effect of the process of alkaline "stress" at different conditions of production of this biopolymer, through the evaluation of the gum production and of the apparent viscosity, which is a factor of high relevance, in order to allocate which processes and sections of the industry the xanthan gum will be applied in. The research also aimed to investigate changes in the structure of the xanthan gum caused by the alkaline "stress", changes in the ultrastructure of the cells, as well as the disposition of the gum at different stages of its production and at different times of alkaline "stress", so as to contribute with a better understanding of such compound process. The strain was selected *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, as better acting in production and quality, with a production of xanthan gum of 10,8 g.L⁻¹ starting from these studies, *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 started to be the bacterium used for the subsequent studies. The largest value of production of gum xantana was reached in alkaline "stress" with pH 12 (EA12), followed by the alkaline "stress" in pH 11 (EA11) and alkaline "stress" in pH 8 (EA08). However, the quality of the gum obtained after the process of EA12 is worse compared to what was obtained without the process of alkaline "stress." The hydroxide of sodium (NaOH) was the alkali that presented better results in obtaining the process of alkaline "stress." The production of xanthan gum (g.L⁻¹) and the apparent viscosities of the gums were not affected in the different times of alkaline "stress" (EA12) tested in that study (1:00, 2:00, 3:00 and 4:00), at the shear rate range tested (0 - 60 s⁻¹). The production of xanthan gum obtained from the fermentation accomplished in bioreactor of 2 L using *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 was larger after the process of alkaline "stress" within 24 hours (EA24h). At the end of 72 hours of fermentation 9,43 g.L⁻¹ of xanthan gum were obtained and after 24 hours of alkaline "stress", the production was 74,8% larger (16,48 g.L⁻¹). In the study of the ultrastructures (chapter IV) it was possible to observe each step of the processes and to verify that, even in the pure inoculum, it is also observed a small production of gum

close to some cells. At the end of the fermentation (FF), the beginning of structural changes was observed in the bacteria, as the vacuolated cytoplasm and the discontinuity of the membrane, could suggest a beginning in the process of bacterial lysis. After the alkaline "stress" (EA12-1h), accentuated structural differences were observed in the bacterial cells. The content cytoplasm of the bacteria became more vacuolated and discontinuity was verified in the membranes of the bacterial cells, indicating process of bacterial lysis. The resulting xanthan gum presented in clots, acquired an organized conformation in concentric circles. Finally, it can be mentioned that new studies with different strains and process conditions should be accomplished being always sought better production results and quality of that biopolymer.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	6
ABSTRACT	8
SUMÁRIO	15
LISTA DE TABELAS	21
LISTA DE FIGURAS	22
INTRODUÇÃO GERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
1.1 O GÊNERO <i>XANTHOMONAS</i>	33
1.1.1 <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i>	35
1.2 A GOMA XANTANA	35
1.2.1 APLICAÇÕES DA GOMA XANTANA	38
1.2.1.1 Aplicação da goma xantana na indústria de petróleo	39
1.2.2 ESTRUTURA QUÍMICA DA GOMA XANTANA	40
1.2.3 BIOSÍNTESE DA GOMA XANTANA	42
1.2.4 PROCESSO FERMENTATIVO PARA OBTENÇÃO DA GOMA XANTANA	45
1.2.4.1 Inóculo	46
1.2.4.2 Meio nutriente para a produção da goma xantana	47
1.2.4.3 Condições operacionais de processamento	49

1.2.4.3.1 Efeito da temperatura no crescimento celular e na produção de xantana	50
1.2.4.3.2 Efeito do pH no crescimento celular e na produção de xantana	51
1.2.4.3.3 Efeito da taxa de transferência de oxigênio no crescimento celular e na produção de xantana	52
1.2.4.3.4 Detergentes	54
1.2.5 RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE NA OBTENÇÃO DE GOMA XANTANA	54
1.2.4.4 Recuperação da goma	57
1.2.6 PROPRIEDADES REOLÓGICAS DA GOMA XANTANA	59
1.2.6.1 Viscosidade e pseudoplasticidade	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
2 CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE LINHAGENS DE <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> PARA A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	72
RESUMO	72
ABSTRACT	72
1 INTRODUÇÃO	73
2 MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1 MICRORGANISMOS	74
2.2 MEIOS DE CULTURA	74
2.3 PROCEDIMENTO DE RE-HIDRATAÇÃO DAS CULTURAS LIOFILIZADAS	74
2.4 PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	75
2.5 PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO	75
2.5.1 PREPARAÇÃO DO PRÉ-INÓCULO E CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS	75
2.5.2 INÓCULO	76
2.5.3 FERMENTAÇÃO	76

SUMÁRIO	xvii
2.5.4 “STRESS” ALCALINO	76
2.5.5 SEPARAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	77
2.6 MÉTODOS ANALÍTICOS	77
2.6.1 QUANTIDADE DE GOMA XANTANA PRODUZIDA	77
2.6.2 QUALIDADE DA GOMA ATRAVÉS DE VISCOSIDADE APARENTE	77
2.6.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.1 NÚMERO DE CÉLULAS NO INÓCULO	78
3.2 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	79
3.3 EFEITO DO “STRESS” ALCALINO NA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	81
3.4 VISCOSIDADE APARENTE DAS GOMAS PRODUZIDAS	82
3.5 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO QUÍMICA	86
4 CONCLUSÃO	88
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
3 CAPÍTULO III - EFEITO DO “STRESS” ALCALINO NA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA POR XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. MANIHOTIS 280-95	95
RESUMO	95
ABSTRACT	95
1 INTRODUÇÃO	96
2 MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1 MICRORGANISMOS	97
2.2 MEIOS DE CULTURA	97
2.3 PROCEDIMENTO DE RE-HIDRATAÇÃO DAS CULTURAS LIOFILIZADAS	98

2.4 PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	98
2.5 PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO	98
2.5.1 PREPARAÇÃO E CONTAGEM DAS CÉLULAS VIÁVEIS DO PRÉ-INÓCULO	98
2.5.2 INÓCULO	99
2.5.3 FERMENTAÇÃO	99
2.5.4 “STRESS” ALCALINO	99
2.5.5 SEPARAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	100
2.6 AVALIAÇÃO DO PH, DO TIPO DE ÁLCALI E DO TEMPO DE “STRESS” ALCALINO (EA)	100
2.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	100
2.7.1 QUANTIDADE DE GOMA XANTANA PRODUZIDA	100
2.7.2 QUALIDADE DA GOMA ATRAVÉS DE VISCOSIDADE APARENTE	100
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
<hr/>	
3.1 ANÁLISE DAS COLÔNIAS DE <i>X. CAMPESTRIS</i> PV. <i>MANIHOTIS</i> 280-95	101
3.2 AVALIAÇÃO DO PH, DO TIPO DE ALCALI E DO TEMPO DE “STRESS” ALCALINO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DA GOMA	102
4 CONCLUSÃO	109
<hr/>	
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
<hr/>	
<u>CAPÍTULO IV - ESTUDO DA ESTRUTURA DA GOMA XANTANA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E DAS ULTRAESTRUTURAS CELULARES EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO DA GOMA E EM DIFERENTES TEMPOS DE “STRESS” ALCALINO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</u>	114
<hr/>	
RESUMO	114
<hr/>	
ABSTRACT	115
<hr/>	

1 INTRODUÇÃO	116
2 MATERIAL E MÉTODOS	117
2.1 MICRORGANISMOS	117
2.2 MEIOS DE CULTURA	117
2.3 PROCEDIMENTO DE RE-HIDRATAÇÃO DAS CULTURAS LIOFILIZADAS	118
2.4 PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS	118
2.5 INÓCULO	119
2.5.1 CONTAGEM DAS CÉLULAS VIÁVEIS DO INÓCULO	119
2.6 PRODUÇÃO DO BIOPOLÍMERO	119
2.7 “STRESS” ALCALINO	120
2.8 AMOSTRAGEM	120
2.9 SEPARAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	120
2.10 MÉTODOS ANALÍTICOS	121
2.10.1 QUANTIDADE DE GOMA XANTANA PRODUZIDA	121
2.10.2 DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR - MÉTODO INDIRETO	121
2.10.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS	121
2.10.4 QUALIDADE DA GOMA - VISCOSIDADE APARENTE	122
2.10.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CLAE	122
2.10.5.1 Purificação dos biopolímeros	122
2.10.5.2 Hidrólise dos biopolímeros	123
2.10.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE	123
2.10.6 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	123
2.10.7 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	124
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
3.1 PROCESSO FERMENTATIVO E DE “STRESS” ALCALINO	125
3.2 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS	134
3.3 ANÁLISE DA ESTRUTURA DAS GOMAS COM E SEM “STRESS ALCALINO”	137
3.4 ANÁLISE DAS ULTRAESTRUTURAS	138

SUMÁRIO	xx
3.4.1 RESULTADO DO INÓCULO PURO (IP)	139
3.4.2 RESULTADO DO INÍCIO DA FERMENTAÇÃO (IF)	141
3.4.3 RESULTADO DO FINAL DA FERMENTAÇÃO (FF)	142
3.4.5 RESULTADO DO “STRESS” ALCALINO APÓS 24H (EA24H)	147
3.4.6 RESULTADO DO “STRESS” ALCALINO APÓS 48H (EA48H)	148
4 CONCLUSÃO	150
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	152
ANEXO 1	159
ANEXO 2	160

LISTA DE TABELAS**1 CAPÍTULO I**

Tabela 1-I: Condições operacionais usadas para a produção de goma xantana em diferentes bioreatores 56

Tabela 2-I: Máxima concentração e rendimentos de xantana usando diferentes bioreatores e condições de operação 57

2 CAPÍTULO II

Tabela 1-II: Concentração do inóculo para cada um dos patovares testados 79

LISTA DE FIGURAS**1 CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Figura 1-I: Estrutura química da goma xantana 41

Figura 2-I: Biossíntese do exopolissacarídeo goma xantana 43

2 CAPÍTULO II

Figura 1-II: Produção de goma xantana para as linhagens utilizadas na seleção 80

Figura 2-II: Produção de goma xantana para a linhagem 280-95 sem o processo de “stress” alcalino e com o processo de “stress” alcalino em pH 11 por 1 hora utilizando o NaOH 82

Figura 3-II: Viscosidade aparente vs Taxa de deformação, a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), produzidas pelas diferentes linhagens 83

Figura 4-II: Viscosidade aparente vs Taxa de deformação, a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), amostras: 280-95 e 280-95 EA11 84

Figura 5-II: Cromatografia de camada delgada comparativa. Padrões: (P₁) Ácido Glucurônico (AG, R_f 0,30), Manose (M, R_f 0,56) e Ramnose (R, R_f 0,70); (P₂) Glicose (G, R_f 0,54) e Fucose (F, R_f 0,65). Eluido com clorofórmio-Metanol-Ácido Acético-Água (40:40:10:10 v/v/v/v) 87

3 CAPÍTULO III

- Figura 1-III: Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 102
- Figura 2-III: Produção de goma xantana para três fermentações nas mesmas condições de processo utilizando o *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 pelo processo convencional (controle-s/EA) e com “stress” alcalino em diferentes pH 103
- Figura 3-III: Viscosidade aparente vs Taxa de deformação, a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), obtidas pela linhagem 280-95, em diferentes pH de “stress” alcalino 104
- Figura 4-III: Viscosidade aparente vs Taxa de deformação, a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), obtidas pela linhagem 280-95 com EA12 utilizando KOH 2 N e utilizando NaOH 2N 106
- Figura 5-III: Produção de goma xantana para a avaliação do tipo de álcali utilizado no “stress” Alcalino. 107
- Figura 6-III: Produção de goma xantana para a avaliação do tempo de “stress” Alcalino 107
- Figura 7-III: Viscosidade aparente vs Taxa de deformação, a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), obtidas pela linhagem 280-95 submetida a diferentes tempos de “stress” alcalino 108

4 CAPÍTULO IV

- Figura 1-IV: Efeito do tempo de fermentação e do tempo de “stress” alcalino utilizando o *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 na produção de goma xantana 126
- Figura 2-IV: Efeito do tempo de fermentação e do tempo de “stress” alcalino utilizando o *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 na produção de goma xantana, no pH e na concentração de sacarose 128
- Figura 3-IV: Efeito do tempo de fermentação e do tempo de “stress” alcalino utilizando *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 na contagem de células viáveis e no crescimento celular utilizando densidade ótica 131
- Figura 4-IV: Viscosidade aparente vs Taxa de deformação, a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v),
Amostras: sem EA12, com EA12 por 1 h, 24 h e 48 h 133
- Figura 5-IV: Cromatograma da análise de composição de ácidos da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 sem “stress” alcalino 135
- Figura 6-IV: Cromatograma da análise de composição de ácidos da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 com “stress” alcalino 135
- Figura 7-IV: Microscopia eletrônica de varredura da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 sem “stress” alcalino 137
- Figura 8-IV: Microscopia eletrônica de varredura da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 com 1 hora de “stress” alcalino 138

-
- Figura 9-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do inóculo puro com magnificação de 12930 140
- Figura 10-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do início da fermentação com magnificação de 6000 e de 12930 141
- Figura 11-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do final da fermentação com magnificação de 7750 e de 16700 143
- Figura 12-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 1 hora com magnificação de 12930 e de 27800 144
- Figura 13-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 1 hora com magnificação de 6000 145
- Figura 14-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 1 hora com magnificação de 12930 146
- Figura 15-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 24 hora com magnificação de 4646 e de 10000 147
- Figura 16-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 24 hora com magnificação de 2156 e de 7750 149

INTRODUÇÃO GERAL

Na década de 50, uma nova geração de produtos surgiu no mercado internacional: os polissacarídeos de origem microbiana. Até então, os polissacarídeos utilizados eram os originados de plantas marinhas e terrestres.

A produção desses polímeros, em condições controladas de fermentação, garante um material de qualidade e fornecimento constante não influenciada por variações climáticas. A grande diversidade de estruturas químicas capaz de ser elaborada pelos microrganismos possibilita a obtenção de polímeros hidrossolúveis com diferentes propriedades. A esse grupo de polissacarídeos solúveis em água, de origem vegetal, animal ou microbiológica, foi dada a designação de gomas industriais.

O polissacarídeo que para uma bactéria é usado como proteção contra a dessecação, o ataque de amebas, fagócitos e bacteriófagos, é para nós um produto capaz de formar soluções viscosas em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações (SOUZA e VENDRUSCULO, 1999).

A goma xantana é um polissacarídeo sintetizado por uma bactéria fitopatogênica do gênero *Xanthomonas*, tem extrema importância comercial. Esse polímero tem sido o mais utilizado em alimentos, no Brasil e no mundo. Foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1969, sendo aplicado a inúmeros produtos em diferentes segmentos industriais, entre eles, alimentos, fármacos, cosméticos, químico e petroquímico, o que se deve principalmente a suas propriedades reológicas, que permitem a formação de soluções viscosas a baixas concentrações (0,05-1,0%), e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura (FONTANIELLA et al., 2002; NAVARRETE et al., 2001; SCAMPARINI et al., 2000; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND e KENNEDY, 1996; MEYER et al., 1993).

O processo de produção da goma consiste nas etapas de obtenção do pré-inóculo, inóculo, fermentação, pasteurização, remoção das células, precipitação, separação e secagem da goma. O crescimento dos microrganismos e a produção da goma xantana são influenciados por fatores tais como o tipo de reator, o modo de operação (batelada ou contínuo), composição do meio, e as condições da cultura (temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido) (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Para a produção da goma utiliza-se, no meio de fermentação, como fontes de carbono, os substratos glicose ou sacarose (YOO e HARCUM, 1999).

Devido à grande aplicação da goma xantana e ao seu amplo mercado mundial, várias pesquisas vêm sendo feitas para otimizar a produção através da seleção de novas linhagens, da adequação das condições ótimas de crescimento celular, produção, recuperação e purificação desse polissacarídeo (ROTTAVA, 2005; BOZA, 2002; FUNAHASHI et al., 1987; KENNEDY et al., 1982).

A maioria dos estudos informa uma dependência clara entre a linhagem usada, a produção e as propriedades da goma xantana. Assim, a seleção das melhores linhagens deveria ser o primeiro passo quando se tenta um processo específico de produção (ROTTAVA, 2005; BORGES, 2003; LÓPEZ et al., 2001; HASSLER e DOHERTY, 1990).

Uma aplicação muito importante da goma xantana é na área de petróleo, visto que a exploração de bacias de petróleo e de gás é de vital importância para o País. A maioria de nossos reservatórios desativados não foram completamente explorados, possuindo ainda óleo a ser recuperado. Para manter a capacidade de produção de petróleo em uma bacia sedimentar madura, como a do Recôncavo Baiano (que se encontra em adiantado estágio de exploração – primário e secundário), é necessário utilizar técnicas especiais de recuperação, como injeção de CO₂ e adição de polímeros e surfactantes, sendo a goma xantana um polímero extremamente usado em processos de EOR (Processos de recuperação terciária de petróleo) (NAVARRETE et al., 2001).

O Brasil tem um elevado potencial econômico e científico para a implantação da indústria de produção de goma xantana, pois possui matéria-prima básica para a

produção e recuperação da goma tal como: açúcar, extrato de levedura e álcool do provenientes do setor sucro-alcooleiro, o que não acontece em outros países, onde o custo do meio de fermentação representa um fator crítico sob o aspecto comercial na produção do polissacarídeo (PADILHA, 2003). Isso coloca o Brasil numa posição favorável e competitiva frente a países que dominam esta tecnologia, como o Japão, E.U.A., França e Áustria.

A industrialização e a comercialização extensiva da xantana tiveram início a partir de 1964. Hoje em dia, os maiores produtores de goma são Merck, CPKelco e Pfizer nos Estados Unidos, Rhône-Poulenc, Mero-Rousselot-Satia e Sanofi-Elf, na França e Jungbunzlauer na Áustria (LIMA et al., 2001; GARCÍA-OCHOA, 2000). Atualmente toda a xantana consumida no país, principalmente pelas indústrias de petróleo e de alimentos, é produzida pelos Estados Unidos e França.

Inverter essa situação é fundamental para a autonomia e o desenvolvimento econômico do país, tornando-o independente e competitivo internacionalmente na produção de goma xantana e conseqüentemente na utilização de tecnologias especiais para extração de petróleo.

O presente estudo teve por objetivo geral otimizar o processo de produção de goma xantana e contribuir para o estudo microscópico (estrutura e ultraestrutura) dos processos fermentativo e de “stress” alcalino.

O desenvolvimento e os resultados dessa pesquisa são apresentados em três artigos; os objetivos específicos de cada artigo estão logo a seguir.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

CAPÍTULO II - Seleção entre linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana

O capítulo II teve como objetivos selecionar linhagens de *X. campestris* em processo de fermentação normal, e testar o efeito do processo de “stress” alcalino ao final do processo fermentativo, avaliando produção e qualidade dos biopolímeros obtidos.

CAPÍTULO III - Efeito do “stress” alcalino na produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 280-95

O capítulo III teve como objetivos testar diferentes condições para o “stress” alcalino ao final do processo fermentativo de produção de goma xantana por *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95. Para isso foram testados diferentes tipos de álcalis, diferentes pHs e diferentes tempos de “stress” alcalino, avaliando a produção e a qualidade do biopolímeros obtidos.

CAPÍTULO IV - Estudo da estrutura da goma xantana através de microscopia eletrônica de varredura e estudo das ultraestruturas celulares em diferentes etapas da produção da goma e em diferentes tempos de “stress” alcalino através de microscopia eletrônica de transmissão

O capítulo IV teve como objetivos avaliar os efeitos do “stress” alcalino ao final do processo fermentativo de produção de goma xantana por *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, em bioreator de 2 L. Foram analisadas a concentração de açúcar

residual, o crescimento celular, o rendimento de produção do biopolímero e a qualidade do biopolímero no processo de fermentação normal. Foram também investigadas as mudanças na estrutura da goma xantana e na ultraestrutura das células, assim como a disposição da goma em diferentes etapas da produção de goma xantana e em diferentes tempos de “stress” alcalino.

CAPÍTULO I

Revisão Bibliográfica

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O gênero *Xanthomonas*

Xanthomonas é um gênero da família da *Pseudomonaceae*. Todos os microrganismos desse gênero são fitopatogênicos, com exceção do *Xanthomonas maltophilia* (GARCIA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND, 1993; SWINGS et al., 1993). A *Xanthomonas* infecta uma extensa variedade de plantas, incluindo alguns de interesse para a agricultura, como a alcachofra, o algodão, a ameixa, a berinjela, o brócolis, a couve, a couve-flor, a couve de Bruxelas, o maracujá, a mostarda, a nectarina, a pimenta, o pimentão, o rabanete, o repolho, o tomate, a alfafa, o pêssego e outras (NCPFB, 2006).

Uma das mais sérias bacterioses de cultivos vegetais é a Podridão Negra, causada pelo *X. campestris* pv. *campestris*. Essa doença pode ser observada em qualquer estágio de desenvolvimento da planta e caracteriza-se por veias nas folhas que se tornam amarelas e negras, deixando uma lesão no formato de um “V” ao longo de suas margens. É de desenvolvimento rápido, propagando-se em poucas semanas, levando a planta à morte e, conseqüentemente, a grandes perdas econômicas (AZEVEDO et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2000;).

O que para uma bactéria é usado como proteção contra a dessecação, contra o ataque de amebas, de fagócitos e de bacteriófagos, é para nós um produto capaz de formar soluções viscosas em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações (SOUZA e VENDRUSCULO, 1999).

Ramírez et al. (1988) sugerem que o grau de virulência deve ser usado como um critério para selecionar e isolar bactérias que produzirão uma goma xantana com alta qualidade.

As células do *Xanthomonas*, morfologicamente, apresentam-se como bastonetes retos e isolados, com 0,4 – 0,7 μm de largura e 0,7 – 1,8 de comprimento, são Gram negativas e movimentam-se por um flagelo polar simples (1,7 – 3,0 μm de comprimento). As colônias são normalmente amarelas, planas e viscosas. Os pigmentos amarelos estão presentes em todas as espécies de *Xanthomonas*, porém esses pigmentos (xantomonadinas) podem estar ausentes quando ocorre mutação ou degradação da cepa. Este microorganismo é quimiorganotrófico, tem capacidade de utilizar uma variedade de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fonte de carbono. Seu metabolismo requer oxigênio como aceptor de elétrons terminal (BRADBURY, 1984).

A ocorrência de mutação espontânea resulta de mudanças na informação genética armazenada na célula. Tais mudanças podem afetar os mecanismos de regulação da atividade de enzimas envolvidas em todo e qualquer processo celular, inclusive o de biossíntese de polissacarídeos. Um exemplo de mutação indesejada é a degeneração de uma espécie com alto rendimento em um produtor do polímero menos eficiente (KENNEDY e BRADSHAW, 1984).

Sabendo-se que o número de mutações espontâneas é proporcional ao número de gerações, deve-se ter o cuidado para minimizar o número de reproduções, usando um método apropriado de preservação, que mantenha o microorganismo viável mas biologicamente inativo. Para preservação de células microbiais por longos períodos, os principais métodos empregados são: a liofilização, o congelamento e a “secagem-L” (secagem do estado líquido), sendo a última técnica a mais favorável (KENNEDY e BRADSHAW, 1984).

Métodos de armazenagem em curto prazo mantêm a célula microbiana em uma forma acessível, da qual uma alta recuperação de células viáveis pode ser obtida, as quais crescem com uma mínima fase de isolamento térmico. A armazenagem em lugares inclinados é o procedimento mais popular por curto prazo (KENNEDY e BRADSHAW, 1984).

Em particular, problemas com o desenvolvimento de espécies variantes durante a armazenagem por curto prazo em ágar inclinado têm sido observados com *X. campestris*, resultando em mudanças no rendimento da xantana produzida e na viscosidade da goma. Também foi sugerido o uso de cultura liofilizada fresca, a cada três meses, para iniciar uma nova série de culturas de ágar inclinado (KENNEDY e BRADSHAW, 1984).

1.1.1 *Xanthomonas campestris*

Entre cepas da mesma subespécie, diferenças na demanda nutricional, no rendimento e composição química do biopolímeros, podem ocorrer (MOREIRA, 2001). ANTUNES et al. (2000) e NITSCHKE e TOMAS (1995) detectaram diferenças no rendimento e na viscosidade quando estudaram os biopolímeros produzidos por algumas cepas de *X. campestris* pv. *campestris* e *X. campestris* pv. *pruni*.

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* podem produzir goma xantana, mas algumas espécies são mais eficientes, tal como *Xanthomonas campestris* (KENNEDY e BRADSHAW, 1984). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* CA110 corresponde à linhagem NRRL B-1459 tem sido extensamente usado para a produção industrial de xantana (SUTHERLAND, 1993; JEANES, 1974) muito estudada e utilizada por diferentes pesquisadores (HSU e LO, 2003; ESGALHADO et al., 2002; ESGALHADO et al., 2001; KATZEN et al., 1996; SOUW e DEMAINE, 1979; MORAINÉ e ROGOVIN, 1973).

1.2 A goma xantana

X. campestris é uma bactéria fitopatogênica que infecta diversas espécies de crucíferas, causando a morte destas plantas. Quando esta bactéria infecta a planta, ela produz um polissacarídeo de alto peso molecular, conhecido como goma xantana, que está relacionado aos fatores de virulência (FONTANIELLA et al., 2002).

Atualmente a goma xantana é o único polissacarídeo microbiano que vem sendo comercializado em grande escala (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND e KENNEDY, 1996; MEYER et al., 1993). No ano de 2002 o Brasil importou um milhão e setecentos mil quilos de goma xantana na forma primária (SECEX, 2002).

A goma xantana é um polissacarídeo de elevado interesse industrial, principalmente para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de petróleo. O interesse deve-se às suas propriedades físico-químicas, que superam todas as dos outros polissacarídeos disponíveis no mercado. Dentre estas propriedades destacam-se a sua elevada viscosidade em baixas concentrações, bem como sua estabilidade em ampla faixa de temperatura e de pH, mesmo na presença de sais (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND e KENNEDY, 1996; MEYER et al., 1993).

A goma xantana é altamente estável em ampla faixa de pH, sendo afetada apenas com valores de pH >11 e < 2.5. Essa estabilidade depende da concentração: quanto maior a concentração, maior a estabilidade da solução (PETTITT, 1982).

A goma xantana é também estável em ampla faixa de temperatura; entre as temperaturas de 10°C e 90°C, e a viscosidade é pouco afetada na presença de sais. Após a esterilização (120°C/30 min) de produtos alimentícios contendo diferentes gomas, apenas 10% da viscosidade é perdida em produtos que contêm a xantana, redução inferior a observada nos produtos que contêm outros hidrocolóides, como a goma guar, alginato e carboximetilcelulose (URLACHER e DALBE, 1992).

Uma importante propriedade da solução de xantana é a interação com galactomananas, tais como gomas locusta e guar. A adição de alguma dessas galactomananas numa solução de xantana a temperatura ambiente causa sinergismo, aumentando a viscosidade (CASAS e GARCÍA-OCHOA, 1999 *apud* GARCÍA-OCHOA et al., 2000; KANG e PETTITT, 1993; MAIER et al., 1993; DEA et al., 1986; TAKO et al., 1984; KOVACS, 1973).

Dentre os biopolímeros utilizados em Recuperação Terciária de Petróleo (EOR), a xantana é o mais utilizada, não tendo até o momento nenhum outro substituto em

escala comercial que supere suas qualidades. A goma xantana tem sido usada junto com hidróxido de sódio e surfactantes na técnica conhecida como APS (álcali-polímero-surfactante).

Em nosso país encontramos diversificada microflora bacteriana do gênero *Xanthomonas*, além de substratos provenientes de resíduos industriais, que podem ser empregados como insumos. No entanto, atualmente toda a goma xantana consumida no Brasil provém de importações.

A indústria de petróleo nos EUA não utiliza grandes quantidades deste polímero, e sim associações de goma xantana com outros polímeros, devido ao custo elevado de produção da goma xantana que utiliza glicose ou sacarose como fonte de carbono (STREDANSKY et al., 1999; YOO e HARCUM, 1999).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do planeta, com os menores custos de produção, e também o maior exportador do produto. Em média, 55% da cana brasileira é transformada em álcool, e 45% em açúcar (SEAG, 2005). De acordo com o Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias do IBGE em 2005, o Brasil produziu 425.534.061 ton de cana de açúcar.

A sacarose e o álcool etílico são importantes como insumos para a produção da goma xantana, como substrato da fermentação e para a separação da goma, respectivamente. O custo do meio de fermentação no Brasil é baixo; entretanto, em outros países, este representa um fator crítico sob o aspecto comercial na produção do polissacarídeo, o que coloca o Brasil numa posição favorável e competitiva frente a países que dominam esta tecnologia.

A xantana é um dos polissacarídeos mais estudados no que se refere à segurança. Testes de alimentação intensa em curto prazo em ratos e cães no Laboratório de Farmacologia do Setor de Pesquisa Regional do Oeste do USDA (United States Department of Agriculture) indicaram que a xantana não causa intoxicação aguda ou atividade inibidora do crescimento. Os estudos de alimentação em longo prazo (dois anos de estudos em ratos e cães e um estudo de reprodução de três

gerações de ratos) não revelaram efeitos significativos na taxa de crescimento, sobrevivência, valores hematológicos ou peso dos órgãos; e tumores não foram detectados (KANG e PETTITT, 1993).

A goma xantana foi liberada pela FDA (Administração Americana de Alimentação e Medicamentos) em 1969, permitindo o uso da goma xantana na produção de alimentos.

O Comitê da Junta de Peritos das Organizações de Alimentação e Agricultura / Organização da Saúde Mundial das Nações Unidas (FAO/WHO) declarou a aceitabilidade de ingestão diária da xantana (ADI). Além disso, muitos outros países têm aprovado a xantana para diversos usos alimentares.

1.2.1 Aplicações da goma xantana

A aplicação da goma xantana na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica está relacionada principalmente à sua capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhe fornece propriedades reológicas únicas. (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND e KENNEDY, 1996; MEYER et al., 1993).

A goma xantana tem sido usada em uma extensa variedade de alimentos, por apresentar importantes propriedades, como: espessante de soluções aquosas, agente dispersante, estabilizadora de emulsões e suspensões, estabilizadora da temperatura do meio, propriedades reológicas e pseudoplásticas e compatibilidade com ingredientes alimentícios (KIOSSEOGLOU et al., 2003; KATZBAUER, 1998; WHISTLER e BEMILLER, 1993). Quando utilizada em baixas concentrações, gera estabilidade na estocagem, capacidade de resistência à água e apelo estético (NUSSINOVITCH, 1997; URLACHER e DALBE, 1992).

A goma xantana é altamente estável em ampla faixa de pH e de temperatura, mesmo na presença de sais, o que a torna um excelente estabilizante para alimentos, como cremes, sucos artificiais, molhos para saladas, carne, frango ou peixe, assim

como para xaropes e coberturas para sorvetes e sobremesas. Ainda apresenta compatibilidade com a maioria dos colóides usados em alimentos, incluindo o amido. Fato que a torna ideal para a preparação de pães e outros produtos para panificação (SCAMPARINI et al., 2000; NUSSINOVITCH, 1997).

O estudo realizado por Vélez et al. (2003) sobre o papel dos hidrocolóides na cremosidade de emulsões óleo em água mostra que a presença de goma xantana em concentrações muito baixas (< 0,075%) aumenta a cremosidade desse tipo de emulsão.

A xantana é usada na agricultura em suspensões, como agente estabilizante para herbicidas, pesticidas, fertilizantes e fungicidas (NUSSINOVITCH, 1997).

A alta viscosidade das soluções e a solubilidade em água do biopolímero têm assegurado importantes aplicações para a xantana na indústria de petróleo, onde é habitualmente usada em processo de perfurações para recuperação de óleo (NAVARRETE et al., 2001a; NAVARRETE, 2001b; NAVARRETE et al., 2000; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

A goma xantana é, assim como muitas gomas (exceto o amido), não digestível em humanos, e serve para baixar o conteúdo calórico de alimentos e melhorar sua passagem através do trato gastrintestinal. O valor calórico da goma xantana é aproximadamente 0,6 kcal/g (KATZBAUER, 1998).

1.2.1.1 Aplicação da goma xantana na indústria de petróleo

O uso da xantana na composição da lama, utilizada como fluido de perfuração, é resultado de estudos que buscam atingir a maior eficiência com o menor custo para o processo.

Os fluidos de perfuração são de uma maneira geral sistemas multifásicos, que podem conter água, material orgânico, sais dissolvidos e sólidos em suspensão nas mais diversas proporções. Esses fluidos são indispensáveis durante as atividades de perfuração de um poço, pois desempenham uma série de funções essenciais, tais

como: resfriar e lubrificar a broca e o tubo de perfuração, exercer pressão nas paredes do poço para estabilizá-lo, auxiliar a suspensão de cascalho gerado durante a perfuração e formar uma torta de filtração que sele poros e outras aberturas nas formações penetradas pela lama. Para satisfazer essas exigências, o fluido de perfuração deve possuir propriedades físico-químicas que possam ser cuidadosamente controladas (SERRA, 2003).

1.2.2 Estrutura química da goma xantana

A goma xantana é um heteropolissacarídeo com uma estrutura primária consistindo de unidades repetidas de pentassacarídeo formados por unidades de glicose, de manose e de ácido glucurônico, na proporção molar de 2,8:2,0:2,0 (Figura 1-1), de extrema importância no aspecto comercial (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; NUSSINOVITCH, 1997; WHISTLER e BeMILLER, 1993; KENNEDY e BRADSHAW, 1984). A cadeia principal consiste de unidades de β -D-glicose ligadas nas posições 1 e 4. A estrutura química da cadeia principal é idêntica à da celulose. A cadeia contém uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de cada resíduo de glicose na cadeia principal. Aproximadamente metade da D-manose terminal contém um resíduo de ácido pirúvico ligado via grupo keto. Para as posições 4 e 6, possui distribuição desconhecida. A unidade de D-manose ligada na cadeia principal contém um grupo acetil em posição O-6. A presença de ácidos acético e pirúvico produzem um tipo de polissacarídeo aniônico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; NUSSINOVITCH, 1997; WHISTLER e BeMILLER, 1993; KENNEDY e BRADSHAW, 1984; SANDFORD e BAIRD, 1983).

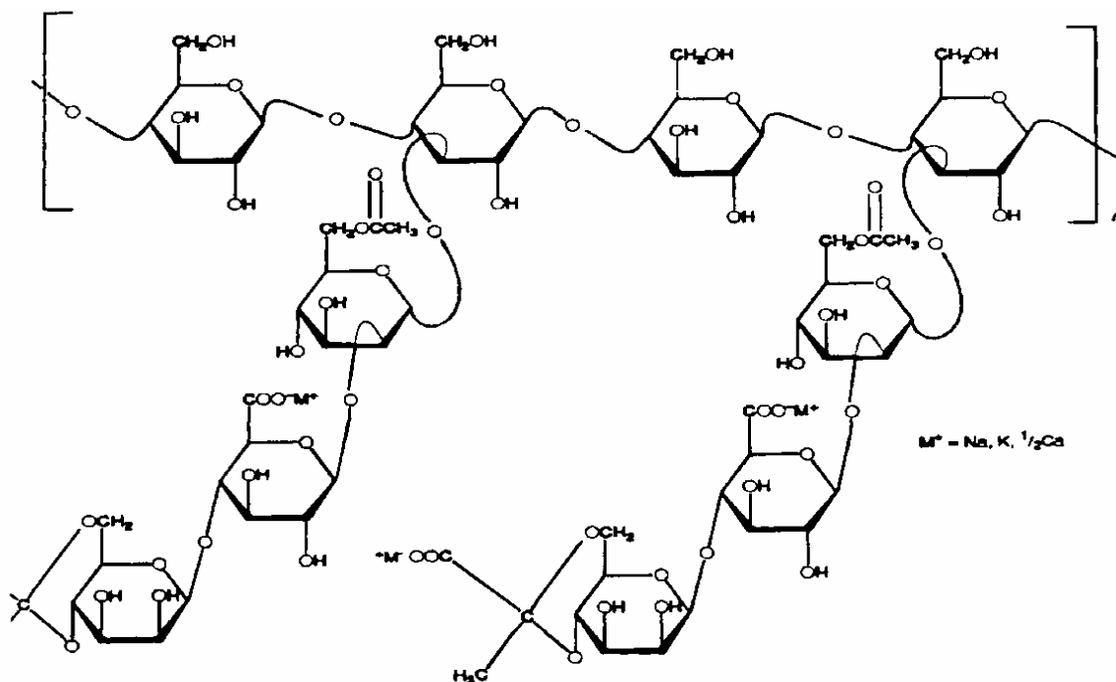


Figura 1-I: Estrutura química da goma xantana (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

A conformação molecular da xantana, conforme determinado por estudos de difração de Raio X, consiste de uma espiral (NUSSINOVITCH, 1997) com um campo de 4,7 nm e estabilizada via pontes de hidrogênio. Foi proposto que as macromoléculas de xantana em solução deveriam ser consideradas como espirais rígidos únicos, sem rejeitar a existência de espirais duplos e triplos. Sob influência da temperatura, a xantana passa de um estado rígido ordenado a um estado mais flexível e desordenado (NUSSINOVITCH, 1997).

A xantana pode estar em uma ou duas conformações ordenadas sob as formas nativa e/ou renaturada. A segunda é mais viscosa na mesma concentração, mesmo assim seu peso molecular é o mesmo. A transição do estado nativo para o desnaturado é irreversível, ao passo que a transição do desnaturado para o renaturado é reversível. A temperatura de transição depende da concentração da goma, da força iônica e dos ácidos pirúvico e acético que estão presentes na xantana. A transição pode ser monitorada por rotação ótica, calorimetria, dicroísmo ou viscosimetria (NUSSINOVITCH, 1997; URLACHER e DALBE, 1992).

O peso molecular das moléculas de xantana está distribuído entre 2.106 e 20.106 Da. Este peso molecular depende da associação entre as cadeias, formando agregados de diferentes cadeias individuais. As variações das condições de fermentação usadas na produção são fatores que podem influenciar no peso molecular da xantana (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Segundo Morris (1984), variação na estrutura química da xantana tende a ocorrer, principalmente, devido a mudanças nos níveis de piruvato e acetato; porém, também podem ocorrer variações na composição de carboidratos.

O peso molecular e o volume dos substituintes ácido pirúvico e acetila na xantana dependem da cepa de *Xanthomonas* (SOUW e DEMAÏN, 1979; KENNEDY et al., 1982; CADMUS et al., 1978), da composição do meio e das condições operacionais usadas na produção (CADMUS et al., 1978;).

Nas xantanas comerciais, o nível de substituição é de 30-40% por piruvato, e 60-70% por acetato, embora existam variações substanciais nesta proporção. A estrutura covalente da goma xantana está relacionada à sua função de agente gelatinoso, que engrossa ou suspende (SYMES, 1980 *apud* NUSSINOVITCH, 1997).

1.2.3 Biossíntese da goma xantana

Inúmeros estudos vêm sendo realizados para caracterizar a via de biossíntese deste polímero; estudos correlacionam a síntese de goma xantana com a virulência da bactéria quando esta infecta plantas (RUDOLPH, 1993; RAMÍREZ et al., 1988).

Estudos *in vitro* têm indicado que a biossíntese da goma ocorre no mínimo em dois estágios: primeiramente, a unidade repetitiva pentassacarídica é seqüencialmente montada, ligando-se ao poliprenol através de uma ligação difosfato; num segundo estágio, as unidades repetitivas são polimerizadas e o polímero liberado para o meio de crescimento (IELPI et al., 1993; VOJNOV et al., 1998) (Figura 2-1).

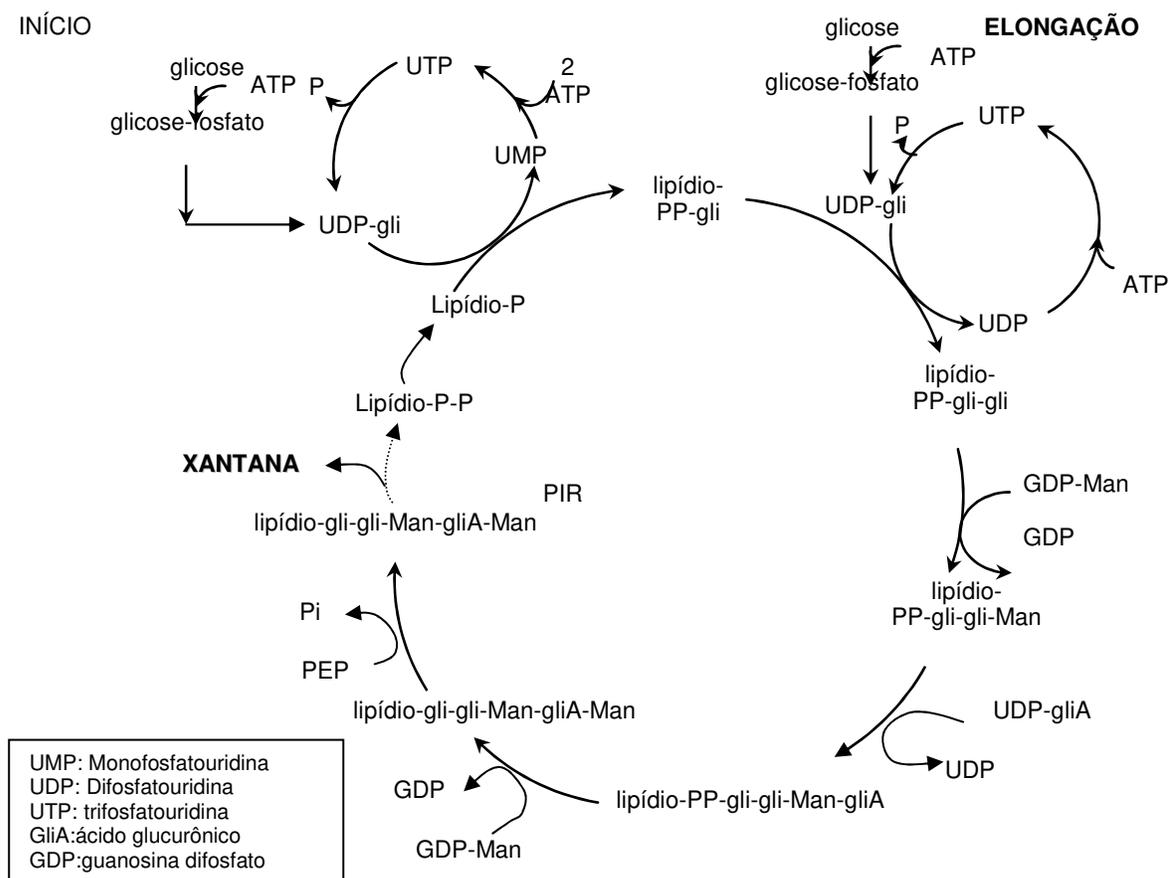


Figura 2-I: Biossíntese do exopolissacarídeo goma xantana (SUTHERLAND e TAIT, 1992).

Os polissacarídeos extracelulares podem ser classificados em dois tipos, dependendo de sua organização com relação à célula microbiana: (i) polímeros que são fisicamente anexos à célula microbiana em forma de cápsulas; e (ii) polímeros excretados pelas células microbianas dispersas no meio. A xantana é do segundo tipo de polissacarídeo extracelular (KENNEDY e BRADSHAW, 1984).

A função natural da xantana e de outros polissacarídeos microbiais ainda não foi totalmente esclarecida, mas várias hipóteses têm sido levantadas para explicar sua existência. Uma delas é que a camada de polissacarídeo ao redor da célula microbiana

a protege. Em particular, a capacidade dos polissacarídeos de reter a água oferece ao microorganismo uma camada protetora sob condições ambientais secas, provendo assim um grau de resistência à dissecação. Além disso, a camada de polissacarídeos pode agir como uma barreira contra o ataque de bacteriofagias. Uma outra função mais específica tem sido sugerida para a xantana, que seria a de reconhecer os lugares apropriados na planta hospedeira para que a colonização da bactéria aconteça (KENNEDY e BRADSHAW, 1984).

Segundo Rudolph (1993), as bactérias colonizam a superfície dos vegetais pela adesão a certas estruturas; o exopolissacarídeo parece regular esse processo. Após invadirem os espaços intercelulares, desenvolvem microcolônias rodeadas de material fibrilar, provavelmente o exopolissacarídeo xantana. Após 24 horas, encontram-se abundantemente rodeadas por exopolissacarídeos. O muco secretado pela colônia bacteriana apresenta alta capacidade de retenção de água, os espaços tornam-se obstruídos. Causando contínua desintegração tecidual. Fato que consiste no primeiro sintoma da infecção e pré-requisito para a efetiva colonização bacteriana.

A maioria dos relatos sobre a síntese da xantana por *X. campestris* tem se preocupado com a otimização das condições de fermentação para a produção industrial do polímero. É certo que a biossíntese de um heteropolissacarídeo microbial como a xantana é um processo complicado, envolvendo um sistema de multienzimas.

O primeiro passo na biossíntese de um polissacarídeo microbial é uma rápida conversão do substrato (geralmente carboidrato); o substrato que entra na célula é fosforilado, quer durante o processo de transporte ativo, quer via enzimática. Após a fosforilação, o substrato está sujeito ou a um processo catabólico para geração de energia celular ou a um processo anabólico que conduz à formação de polímeros (exopolissacarídeos, lipopolissacarídeos, polissacarídeos de parede celular) (LETISSE et al., 2002, BECKER et al., 1998).

O passo subsequente do processo anabólico envolve a conversão do substrato fosforilado em vários nucleotídeos de açúcar (geralmente nucleotídeos monossacarídeos), necessários para o agrupamento da unidade repetitiva do polímero

através da ação de enzimas. Estudos da biossíntese da xantana por *X. campestris* “in vitro” têm demonstrado que a Glicose UDP, a manose GDP e o ácido glucurônico UDP são necessários para a síntese do polímero com a correta unidade repetitiva. Apenas pequenas quantidades do polímero foram produzidas quando qualquer um destes nucleotídeos monossacarídeos estavam ausentes (LETISSE et al., 2002; BECKER et al., 1998).

1.2.4 Processo fermentativo para obtenção da goma xantana

Em 1961 surgiu a primeira importante pesquisa publicada sobre a produção de goma xantana. Os laboratórios de pesquisa do Departamento de Agricultura dos EUA descobrem que a bactéria *X. campestris* encontrada em repolho roxo produz um polissacarídeo extracelular com excepcionais propriedades reológicas (KATZBAUER, 1998).

A produção de goma xantana usando *X. campestris* tem melhorado nas últimas décadas em função da seleção genética que vem sendo realizada e por melhoramentos no processo experimental (LETISSE et al., 2002).

No processo de produção da goma xantana, primeiramente, a cepa microbiana selecionada é preservada para possível estocagem por longo prazo através de métodos que mantenham as propriedades desejadas. Para produzir a goma xantana, culturas de *X. campestris* puras são cultivadas usando fermentação aeróbica submersa. O meio esterilizado composto de carboidratos, uma fonte de nitrogênio e sais minerais é inoculado com cultura selecionada, na escala piloto de fermentação, é seguido por incubação a 30°C por três dias em uma escala industrial de fermentação, e por um tratamento térmico para eliminar microrganismos viáveis. A goma é precipitada em solvente, (isopropanol, etanol ou acetona), separada, seca, moída, peneirada, e então embalada. O crescimento dos microrganismos e a produção de xantana são influenciados por fatores tais como o tipo de bioreator usado, o modo de operação (batelada ou contínuo), a composição do meio, as condições da cultura (temperatura,

pH, concentração de oxigênio dissolvido) (CHI e ZHAO, 2003; GARCÍA-OCHOA, 2000; NUSSINOVITCH, 1997).

1.2.4.1 Inóculo

Em função da goma xantana constituir uma espécie de cápsula bacteriana, sua produção está associada ao crescimento celular. Durante o período de inoculação, ocorre um aumento da concentração celular, mas diminui a produção de goma xantana, porque a goma ao redor da célula impede o transporte de nutrientes e estende a fase lag de crescimento (PONS et al., 1990; PONS et al., 1989; DE VUYST et al., 1987; CADMUS et al., 1978).

Os microrganismos são transferidos de um meio de cultura sólido complexo (normalmente meio YM ágar) para um volume pequeno (5 a 7 mL) de um meio de cultura líquido complexo (normalmente meio YM). A cultura é transferida para 40 - 100 mL de meio contendo sais inorgânicos; fase na qual células vão se adaptar a uma nova condição que deverão encontrar na fase de produção. O volume de inóculo para a produção de xantana no fermentador deve ser 5% - 10% do volume total de caldo fermentado (SANTOS, 1993 *apud* GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Segundo Gupte e Kamat (1997), o volume ideal de inóculo para a produção de xantana em fermentador deve ser de 10% do volume total de caldo fermentado.

Gupte e Kamat (1997) testaram várias formulações de meio de crescimento, utilizando como fonte de carbono a sacarose, a glicose, a lactose e o amido, nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 g.L⁻¹, e para a sacarose ainda foi testada a concentração de 60 g.L⁻¹. Quando 50 g.L⁻¹ de sacarose foram utilizadas como fonte de carbono, foi observada maior síntese de polissacarídeo exocelular, comparada à mesma condição de glicose, lactose e amido. Como fonte de nitrogênio foram testados extrato de levedura, peptona, uréia, glicose de milho, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl, NaNO₃ e uma composição de extrato de levedura + peptona, nas concentrações de 0,5, 1, 3 e 5 g.L⁻¹. As maiores sínteses de polissacarídeo exocelular obtidas foram com a composição

extrato de levedura (3 g.L^{-1}) + peptona (5 g.L^{-1}), com de peptona (5 g.L^{-1}) e com extrato de levedura (3 g.L^{-1}) com produções de xantana de 7,2, 5,0 e $4,9 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

1.2.4.2 Meio nutriente para a produção da goma xantana

Para produzir a goma xantana, a bactéria *X. campestris* precisa de vários nutrientes, macronutrientes, tais como carbono e nitrogênio e micronutrientes (como potássio, ferro, e cálcio). A concentração da fonte de carbono afeta o rendimento de goma xantana, sendo a glicose e a sacarose as fontes de carbono mais freqüentemente utilizadas.

O efeito da concentração de glicose na produção de goma xantana por *X. campestris* ATCC 13951 foi estudada por Funahashi et al. (1987). Segundo o estudo concentrações de glicose entre 30 g - 40 g/kg de meio consiste na melhor faixa de concentrações para a produção de goma xantana. A possibilidade da adição intermitente de glicose de forma a manter seu teor no meio entre 30g/kg - 40 g/kg, preveniu a inibição do crescimento celular e da produção de goma. Através dessa alimentação estratégica de glicose, a concentração de goma xantana atingiu 43 g/kg após 96 horas de fermentação. A concentração ótima inicial de glicose foi considerada pelos autores como a de 40 g glicose/kg de meio.

O nitrogênio é um nutriente essencial, como componente orgânico ou como molécula inorgânica. A razão C/N normalmente utilizada para a produção é menor que aquela usada durante o crescimento (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; De VUYST et al., 1987). Geralmente, baixas concentrações de ambos são úteis para a produção do polímero xantana. Resultados similares foram obtidos por Souw e Demain (1979). Segundo autores quando o carbono e o fósforo são nutrientes limitantes, a produção de goma xantana é melhorada. Foi comprovado serem os açúcares (sacarose ou glicose) as melhores fontes de carbono, e o glutamato em uma concentração de 15 mM a melhor fonte de nitrogênio.

A concentração da fonte de carbono afeta a eficiência da conversão em polissacarídeos. É relatado na literatura que concentrações de glicose entre 1 – 5% dão o melhor rendimento, enquanto que em mais altas concentrações de glicose, decresce o rendimento do produto (PAPAGIANNI et al., 2001).

O estudo nutricional realizado por GARCÍA-OCHOA et al. (1992) mostrou que nitrogênio, fósforo, e magnésio influenciam o crescimento da bactéria, enquanto nitrogênio, fósforo e enxofre influenciam a produção da goma xantana. No estudo de García-Ochoa et al. (1992), a melhor produção foi obtida com a seguinte composição do meio: sacarose (40 g.L^{-1}), ácido cítrico ($2,1 \text{ g.L}^{-1}$), NH_4NO_3 ($1,144 \text{ g.L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($2,866 \text{ g.L}^{-1}$), MgCl_2 ($0,507 \text{ g.L}^{-1}$), Na_2SO_4 ($0,089 \text{ g.L}^{-1}$), H_3BO_3 ($0,006 \text{ g.L}^{-1}$), ZnO ($0,006 \text{ g.L}^{-1}$), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,020 \text{ g.L}^{-1}$), CaCO_3 ($0,020 \text{ g.L}^{-1}$) e HCl ($0,13 \text{ mL/L}$), e o pH foi ajustado para 7,0 por adição de NaOH .

Jana e Ghosh (1997) verificaram que a biossíntese de xantana por *X. campestris*, sob condições limitadas de oxigênio; a adição acima de 2,6 g de ácido cítrico por litro melhora a viabilidade celular, assim como aumenta o rendimento da xantana. Porém, quando não há limitação de oxigênio, a adição de ácido cítrico não melhora a produção de xantana.

Borowski et al. (2006) utilizaram diferentes meios fermentativos para a produção de goma xantana com e sem ácido cítrico, utilizando *X. campestris* pv. *pruni* em condições limitadas de oxigênio. Os resultados obtidos mostraram que a influência do ácido cítrico na produção da goma depende da cepa, porém a presença do ácido afetou negativamente os resultados de viscosidade.

No meio para a produção de goma xantana, o ácido cítrico é usado como um agente seqüestrante para prevenir a precipitação de sais durante a esterilização (PETER et al., 1993).

Letisse et al. (2003) desenvolveram um modelo cinético não estruturado para a produção de xantana. O modelo proposto é hábil para descrever o consumo de nitrogênio, o consumo de fosfato inorgânico e de carbono e a evolução da biomassa

(considerando os vários estados fisiológicos das células). Segundo o modelo proposto para produção de goma xantana a concentração inicial de fosfato inorgânico demonstrou o efeito positivo da limitação de fosfato no rendimento de xantana.

Estudos preliminares têm indicado que fermentações com *X. campestris* em escala industrial utilizando o melaço ou soro de leite bovino como caldo fermentativo podem resultar em goma xantana com peso molecular médio, que pode ser usada para certas aplicações (KIOSSEOGLU et al., 2003).

Vendruscolo et al. (2002) utilizaram resíduo industrial fibroso da proteína de soja como fonte de carbono na produção de goma xantana. Em fermentações com *X. campestris* pv. *campestris* NRR-B-1459, a fibra influenciou positivamente, elevando a produção do polímero, porém influenciou negativamente sobre a qualidade da goma obtida.

1.2.4.3 Condições operacionais de processamento

Segundo Casas et al. (2000) as variáveis, temperatura, velocidade de agitação e concentração inicial de nitrogênio afetam a taxa e o rendimento da produção de xantana. Mudanças nessas condições operacionais também influenciam a estrutura molecular consequentemente influenciando as propriedades da xantana.

Existem diversos trabalhos sobre a influência das condições operacionais na estrutura e peso molecular médio da goma xantana, mas cada autor estuda somente uma variável e assim não existe concordância nas conclusões obtidas. As variáveis estudadas no trabalho de Casas et al. (2000) são principalmente aquelas que mostram influência no conteúdo de ácido pirúvico. A influência da temperatura tem sido estudada somente para o grau de piruvato, e todos os autores acreditam que o conteúdo de piruvato máximo é obtido em 27°C (PETERS et al., 1993; SHU e YANG, 1990; TAKO e NAKAMURA, 1984; CADMUS et al., 1978).

1.2.4.3.1 Efeito da temperatura no crescimento celular e na produção de xantana

Em geral, o processo de fermentação da goma xantana em batelada exhibe uma cinética de fermentação metabólica secundária. Durante a fermentação em batelada de glicose por *X. campestris*, duas fases podem ser distinguidas: a tropofase, em que há um rápido crescimento, mas pequena produção de xantana, e a idiofase, em que não ocorre crescimento celular, mas onde uma grande quantidade de xantana é produzida. As condições ótimas para o crescimento celular e a produção de xantana podem não ser as mesmas. A quantidade e a qualidade de xantana produzida em uma cultura de batelada variam com a composição do meio e os parâmetros do meio, e com as condições de fermentação (GARCIA-OCHOA et al., 2000; SHU e YANG, 1990; KENNEDY et al., 1982).

Segundo Casas et al. (2000) o crescimento da biomassa e a produção de xantana aumentam com a temperatura, rendendo um máximo em 28°C. Como a xantana é parcialmente associada ao aparecimento metabólitos, a produção de goma xantana é baixa quando o crescimento e a concentração de biomassa também estão baixos.

O estudo de Shu e Yang (1990) concluiu que maiores rendimentos de xantana podem ser obtidos com fermentações realizadas em temperaturas mais altas. O estudo verificou também que o conteúdo de piruvato na goma xantana varia com a temperatura da fermentação. O conteúdo de piruvato na goma variou de 1,9% a 4,5%, ocorrendo com temperaturas entre 27°C e 30°C. O mecanismo que explica esse comportamento ainda não foi esclarecido.

Segundo Gupte e Kamat (1997) com *X. campestris* ICa-125, as maiores concentrações de exopolissacarídeo extracelular verificaram-se na temperatura de 32°C, porém nesse estudo foram testadas apenas as temperaturas de 25°C, 32°C, 35°C e 38°C, obtendo-se 4,2, 9,0, 8,7 e 3,6 g.L⁻¹, respectivamente.

Os experimentos computacionais de Cacik et al. (2001) mostram que o tempo ótimo de fermentação para produzir 15 g.L⁻¹ de goma é 16,3% mais baixo quando a temperatura usual é de 28°C.

1.2.4.3.2 Efeito do pH no crescimento celular e na produção de xantana

Tanto o pH como a temperatura são importantes fatores ambientais para a concentração celular, e de xantana, bem como para o índice de consistência.

Muitos autores concordam que o pH neutro é o melhor para o crescimento do *X. campestris*. Durante a produção da goma xantana, o pH decresce de neutro para valores próximos a 5,0 por causa da formação de grupos ácidos presentes na xantana. Alguns autores sugerem que não seja necessário fazer o controle do pH durante o processo, mas outros recomendam manter o pH neutro utilizando para isso KOH, NaOH e NH₄OH. O estudo do efeito do pH mostra que o controle do pH acentua o crescimento das células, porém não influencia a produção da goma xantana. Quando o pH é controlado, a produção da goma cessa uma vez que a fase de crescimento estacionária seja atingida, e este efeito independe do álcali usado para controlar o pH. Quando o pH não é controlado, a produção da goma continua durante a fase estacionária de crescimento (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

O efeito da interação entre o pH e a temperatura é de pouca importância para o crescimento celular e parece ter uma influência negativa tanto na produção dos polissacarídeos quanto na viscosidade do caldo.

O estudo de Esgalhado et al. (1995) mostrou que os melhores valores de pH e temperatura para o crescimento celular e a produção da xantana são um tanto diferentes; entretanto, dentro dos melhores valores para a produção da xantana, a qualidade do polissacarídeo permaneceu inalterada. Assim, segundo os resultados discutidos anteriormente, para o crescimento do *Xanthomonas campestris*, os melhores intervalos de pH e temperatura são: entre 6,0 a 7,5 e de 25°C a 27°C respectivamente e para a produção da xantana e qualidade do polímero os melhores intervalos de pH e

temperatura são: entre 7,0 – 8,0 e de 25°C - 30°C. Esta diferença de valores mais adequados de pH e temperatura para o crescimento celular e para a produção da xantana pode ser uma informação útil a ser incluída em uma estratégia de fermentação em duas etapas e na elaboração de novos ambientes microbianos. Este ponto é particularmente importante no processo de otimização quando é desejável maximizar um dos fatores, mas não o outro.

Vendruscolo et al. (2004) mostraram que o controle de pH nos valores 5,5 e 7,0 durante a fermentação produz polímeros de aparência diferente (cor) e viscosidade, embora a quantidade produzida seja a mesma: 11,4 g.L⁻¹ e 11,6 g.L⁻¹, respectivamente. Entretanto a viscosidade das soluções aquosas do biopolímero produzido em pH 7,0 foi superior ao produzido em pH 5,5.

1.2.4.3.3 Efeito da taxa de transferência de oxigênio no crescimento celular e na produção de xantana

Limitação de oxigênio foi observada no estudo de Peters et al. (1989), quando utilizaram baixas velocidades de agitação para uma fermentação de xantana em batelada. Isto resultou em uma taxa de produção específica de xantana significativamente menor do que ao obtido em altas velocidades.

Casas et al. (2000) observaram dois efeitos com o aumento da velocidade de agitação: aumento na taxa de transferência de massa de oxigênio e também um dano nas células. Em velocidades mais altas (800 rev./min) o crescimento celular e a produção de xantana são mais baixos, provavelmente devido ao dano celular por “stress” hidrodinâmico; e em velocidades muito baixas (100 rev./min) também se observou mais baixo crescimento de biomassa e produção de xantana, devido à limitação na transferência de oxigênio. Para esse estudo foi utilizado um bioreator com volume de trabalho de 1,5 L, e ambos, o crescimento de biomassa e produção de xantana, alcançaram um máximo quando a velocidade de agitação foi fixada em 500 rev./min. Em velocidades de agitação mais baixas ocorre limitação de oxigênio, e em

velocidades de agitação mais altas ocorre “stress” hidrodinâmico, resultando em um decréscimo do peso molecular médio, e também em um decréscimo nos parâmetros reológicos.

Papagianni et al. (2001) observaram que o aumento do nível de agitação, resulta em níveis de produção de goma xantana mais altos. No estudo em questão, a produção de xantana quase dobrou quando a velocidade de agitação foi aumentada de 100 para 600 rpm, e similar foi o efeito no crescimento celular.

A viscosidade da goma xantana é afetada por fatores tais como o peso molecular da cadeia e o conteúdo de piruvato. O uso de goma xantana com peso molecular médio, como a obtida em laboratório, resulta em géis mais aceitos comparados àqueles preparados com a xantana comercial. Estes géis serão como aqueles preparados com xantana de alto peso molecular, porém de baixa elasticidade, coesividade e mastigabilidade e por esse motivo são mais aceitos pelo consumidor (KIOSSEOGLOU et al., 2003).

Pode existir uma dependência do grau de piruvação da xantana com a velocidade de agitação (1,54% em 100 rpm e 3,49% em 600 rpm) (PAPAGIANNI et al., 2001).

O grau de piruvação pode ter uma importante influência na efetividade de certas aplicações. A aplicação da xantana para melhorar a recuperação de óleo pode depender principalmente do grau de piruvação, devido à precipitação da xantana ou adsorção no solo (BRANDFORD e BAIRD, 1983).

Peter et al. (1989) demonstram que existe uma forte relação entre a demanda microbiológica de oxigênio e o grau de piruvação. A limitação de oxigênio, nesse estudo, utilizando um sistema em batelada ou contínuo, leva a uma concentração de piruvato mais baixa. A dependência da piruvação com relação ao fornecimento de oxigênio não é inesperada. Por ser um componente altamente oxidado do polímero, aumentando o nível de oxigênio dissolvido em mais altas velocidades de agitação, pode

explicar o aumento da quantidade de piruvato obtido no estudo de PAPAGIANNI et al. (2001).

O peso molecular foi pouco influenciado pela velocidade de agitação (100 – 600 rpm); de acordo com os resultados de HPLC, ficaram em redor de 500 kDa (PAPAGIANNI et al., 2001). O peso molecular da xantana é crítico para a viscosidade intrínseca e para as propriedades espessantes do polímero.

1.2.4.3.4 Detergentes

O estudo de Galindo e Salcedo (1996) mostra que o uso de detergentes melhora o rendimento e a qualidade dos polímeros obtidos de culturas de *X. campestris*. Em fermentações realizadas em frasco e em bioreator, o Triton X-100 produziram respectivamente 1,5 vezes e 1,24 vezes mais goma xantana do que no experimento controle. Em testes realizados em reator de 2 L foram utilizados 0,1 g.L⁻¹ de detergente Triton X-100. Com relação à biomassa, não houve diferença entre o controle sem detergente e o com detergente.

Os estudos sobre a tendência do pH ao longo da fermentação de xantana por *X. campestris* são contraditórios. Estudos revelam que o pH pode aumentar, ou diminuir durante a fermentação, dependendo da cepa e da composição do meio utilizados (LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES et al., 1997).

1.2.5 Rendimento e Produtividade na obtenção de goma xantana

Galindo et al. (1994), no estudo das cepas E2 (variante espontânea da κ -NRRL-1459) e B-1459 de *X. campestris* pv. *campestris*, obtiveram como resultados de produção de xantana 11,2 g.L⁻¹ e 9,3 g.L⁻¹, respectivamente. No trabalho de Nitschke e Thomas (1995) com cepas selvagens de *X. campestris* pv. *campestris*, obteve-se como menor produção 10,6 g.L⁻¹ para cepa C5 e como maior produção 14,5 g.L⁻¹ para cepa Cv2C8.

Foresti (2003) determinou a produção de xantana ($6,4 \text{ g.L}^{-1}$) pela cepa padrão NRRL B-1459 de *X. campestris* pv. *campestris*.

A Tabela 2, confeccionada por García-Ochoa et al. (2000), faz um apanhado sobre o rendimento de xantana, concentração de xantana obtida e tempo de fermentação em vários tipos de bioreatores, resultado de estudo de vários autores.

Tanques agitadores (*stirred-tanks*) parecem ser o melhor tipo de bioreator para a produção de xantana, embora outros tipos de equipamentos sejam usados em produção de larga-escala (FLORES CANDIA e DECKWER, 1999).

No trabalho de Gupte e Kamat (1997), o maior rendimento obtido foi $21,3 \text{ g.L}^{-1}$, utilizando o *X. campestris* ICa-125. Esgalhado et al. (1995) atingiram uma produção do biopolímero de 10 a 14 g.L^{-1} .

Em estudos mais recentes utilizando o melaço como fonte de carbono em uma fermentação com o *X. campestris* ATCC 1395, encontramos a maior concentração dessa goma já relatada em meio industrial ou laboratorial. O estudo realizado por Kalogiannis et al. (2003) relata uma produção de goma xantana de 53 g.L^{-1} . Entretanto, Abd el Salam et al. (1994) relataram uma produção de goma xantana mais alta (70 g.L^{-1}) usando melaço de cana de açúcar com uma concentração inicial de açúcar relativamente alta de 25%.

Tabela 1-I

Condições operacionais usadas para a produção de goma xantana em diferentes bioreatores

Referência	Tipo de bioreator	T (°C)	pH	Volume (L)	Taxa de aeração (L/L min)	Velocidade agitação (rpm)
Cadmus et al. (1978)	<i>Stirred tank</i>	20-30	6,8 c	10	1,5	225-300
Rogovin et al. (1965)		28	7	227 2268	0,5	90-290 30-250
Moraine e Rogovin (1966)		28	7	-	1	1000
Moraine e Rogovin (1971)		28	7, 7,1 c	8	1	500-1000
Moraine e Rogovin (1973)		28	7 c	-	-	-
Souw e Demain (1980)		25	7 c	-	0,5	500
Pinches e Pallent (1986)		30	7 c	10 2,5	0,4	600 1000
De Vuyst et al. (1987 a,b)		28	7	6	1	250-700
Funahashi et al. (1987)		30	7	6	1	350-1200
Peters et al. (1989)		28	7 c	-	0,3	200-800
Shu e Yang (1990)		20-34	7 c	-	1,16	800
Pons et al. (1990)		29	6,9 c	3,6	0,3-0,6	500-900
Kennedy et al. (1990)		30	7,0 c	3,5	0,5	400-600
Schweikart e Quinlan (1989)		26	7 c	1,2	1	300-1300
García-Ochoa et al. (1997)		28	7	1,5	1	210-1200
Pons et al. (1989)	<i>bubble column</i>	29	6,9 c	13	1, 1,5 ct	-
Suh et al. (1992)	<i>Airlift</i>	28	7 c	50	7,7-54 ct	-
Kessler et al. (1993)		27	7 c	60-70	5-10 var	-
Zaidi et al. (1991)	<i>Plugging jet</i>	28	7 c	100	0,33 ct	-

Fonte: García-Ochoa et al. (2000).

Nota: c = controlado

ct = constante

var = (variável)

Tabela 2-I

Máxima concentração e rendimentos de xantana usando diferentes Bioreatores e condições de operação (ver Tabela 1)

Referência	Bioreator	Y _P (% p/p)	t (h)	C _P (g.L ⁻¹)
Cadmus et al. (1978)	<i>stirred tank</i>	46	72-96	14
Rogovin et al. (1965)		67	96	15
Moraine e Rogovin (1966)		70	96	15
Moraine e Rogovin (1971)		73	40	14,6
Moraine e Rogovin (1973)		75	96	29
Souw e Demain (1980)		50	60	10,5
Pinches e Pallent (1986)		76	45	17
De Vuyst et al. (1987 a, b)		75	144	27,9
Funahashi et al. (1987)		66	96	30
Peters et al. (1989)		34	90	18,5
Shu e Yang (1990)		81	52	19
Pons et al. (1990)		65	50	13
Kennedy et al. (1982)		45	69	22,5
Schweikard e Quinlan (1989)		50	96	12,5
García-Ochoa et al. (1997)		75	70	30
Pons et al. (1989)	<i>bubble column</i>	50	120	20
Zaidi et al. (1991)	<i>Plugging jet reactor</i>	<50	100	18
Suh et al. (1992)	<i>Airlift</i>	50	80	25
Kessler et al. (1993)		45	49 ^a	25

^a Uma fermentação com dois passos foi utilizada; o primeiro passo (12 h, tanque agitador) não está incluído neste valor.

Legenda:

Y_P = rendimento de produção sob fonte de carbono

t = tempo de fermentação

C_P = concentração de goma xantana

Fonte: García-Ochoa et al. (2000).

1.2.4.4 Recuperação da goma

A recuperação da goma xantana do caldo fermentativo é geralmente difícil e cara. O caldo fermentativo contém, ao final do processo, geralmente 10 a 30 g.L⁻¹ de goma, 1 a 10 g.L⁻¹ de células e 3 a 10 g.L⁻¹ de nutrientes residuais e outros metabólitos (GARCÍA-OCHOA et al., 1993). Em função da alta concentração de goma xantana, o caldo é altamente viscoso e difícil de manusear. A alta viscosidade complica a remoção

da biomassa do caldo. Para o processamento, o caldo é normalmente diluído em algum estágio do processo (KENNETY e BRADSHAW, 1984).

Os principais passos no processo de recuperação da goma são: desativação e remoção (ou lise) das células microbianas, precipitação do biopolímero, lavagem, secagem, moagem e embalagem (GARCÍA-OCHOA et al., 1993). Após a moagem esse produto pode passar por peneiras para selecionar-se uma pré-determinada granulometria para controlar as taxas de dispersabilidade e dissolução do produto (SMITH e PACE, 1982). A embalagem deve ser a prova de água porque a xantana é um produto higroscópico e sujeito a degradação hidrolítica. Geralmente, o caldo fermentado é pasteurizado ou esterilizado para matar as células bacterianas (GARCÍA-OCHOA et al., 1993); esse tratamento térmico acentua a remoção da goma xantana das células.

A pasteurização do caldo fermentado em uma temperatura alta freqüentemente causa degradação térmica do exopolissacarídeo microbiano. Quando o caldo é tratado sob condições apropriadas (80 – 130°C, 10 – 20 min, pH 6,3 – 6,9), a dissolução da xantana ocorre sem degradação térmica, e o rompimento das células é observado (SMITH e PACE, 1982). O aumento da temperatura também diminui a viscosidade do meio, facilitando a remoção dos insolúveis por centrifugação (BOZA et al., 2004; MOREIRA et al., 2003; GIAVASIS et al., 2000) ou filtração (GIAVASIS et al., 2000).

A precipitação do polímero é realizada por diminuição da solubilidade do colóide dissolvido, usando-se métodos tais como adição de sais, de solventes miscíveis em água e concentração por evaporação, além da precipitação com solventes orgânicos, tais como o etanol e o isopropanol, o uso de misturas de álcool e sais (BOZA et al., 2004; MOREIRA et al., 2003; GIAVASIS et al., 2000; GARCÍA-OCHOA et al., 1993) e da precipitação com sais trivalentes e tetravalentes (KENNEDY e BRADSHAW, 1984). Também o uso de ultrafiltração tem sido relatado (LO et al., 1997). De todas essas técnicas, a que normalmente é mais usada é a de precipitação com álcool, principalmente etanol e isopropanol. O custo para a recuperação do álcool e as perdas inevitáveis contribuem significativamente para o custo total de produção.

Os álcoois (metanol, etanol ou isopropanol), a acetona, podem ser adicionados ao caldo fermentado não só para diminuir a solubilidade do exopolissacarídeo, mas também para lavar impurezas tais como componentes coloridos, sais e células. A quantidade necessária de álcool depende da natureza do reagente (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

A adição de sais em suficiente concentração também causa precipitação devido a ligações dos cátions dos sais adicionados com os grupos ionizados polianiônicos. Isto leva a uma reversão das cargas quando todos os grupos aniônicos estão ligados a um cátion. Os cátions polivalentes tais como cálcio, alumínio e os sais quaternários de amônio são especialmente efetivos para a precipitação do polímero (PAGE e RIGHELATO, 1981).

O polissacarídeo pode ser tratado, química, física ou biologicamente durante sua separação visando a obter certas características especiais no produto final. Por exemplo, para aumentar sua dispersabilidade é tratado com dialdeídos; para aumentar sua viscosidade faz-se reagir com formaldeído; e para torná-lo compatível com outros polissacarídeos, como a carboxi metil celulose (CMC), trata-se com celulasas (LIMA et al., 2001).

1.2.6 Propriedades reológicas da goma xantana

Soluções de xantana obtidas por dissolução em temperatura moderada tendem a ser altamente viscosas. A temperatura de dissolução afeta grandemente a viscosidade por controlar a conformação molecular. A molécula xantana parece ter duas conformações, helicoidal e randômica, dependendo da temperatura de dissolução (MORRIS, 1997; GARCÍA-OCHOA e CASAS, 1994; HORTON et al., 1985; *apud* GARCÍA-OCHOA et al., 2000;).

A viscosidade da goma é uma função de sua concentração na dispersão (NUSSINOVITCH, 1997; PETTITT, 1982).

1.2.6.1 Viscosidade e pseudoplasticidade

A viscosidade é a resistência de um líquido ao fluxo causado por atrito interno entre as moléculas. Além de ser uma medida direta da qualidade do fluido em serviço, a viscosidade pode fornecer importantes informações sobre mudanças fundamentais em sua estrutura durante determinado processo (NAVARRO, 1997). A viscosidade de fluido Newtoniano, como, por exemplo, a água ou o óleo, depende somente da temperatura (e para alguns a pressão), enquanto fluidos não-Newtonianos mostram um comportamento dependente do tempo e/ou taxa de deformação. As soluções de goma xantana são não-Newtonianos e altamente pseudoplásticos ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação do fluido. A viscosidade das soluções praticamente não se altera com a temperatura entre 4 e 93°C, com pH entre 1 e 13 e com forças iônicas equivalentes a concentrações de cloreto de sódio entre 0,05 e 1% (MAUGERI FILHO, 2001; BUENO e GARCIA-CRUZ, 2001; KATZBAUER, 1998).

Essa pseudoplasticidade acentua as qualidades sensoriais, realçando o sabor e diminuindo a sensação de gomosidade percebida na boca (flavour, “mouth feel”). Além disso, em taxas de cisalhamento entre 50 e 200s⁻¹, taxa da mastigação, a xantana exibe baixa viscosidade, fazendo com que o produto pareça menos viscoso ao paladar e o sabor seja mais bem percebido (KATZBAUER, 1998; CHALLEN, 1994).

A sua estrutura ramificada e o alto peso molecular conferem à xantana uma alta viscosidade, mesmo em baixas concentrações. A rede tridimensional formada por associações de cadeias de goma xantana tem eficiente estabilidade para suspensões e emulsões (KATZBAUER, 1998). Muitas das propriedades reológicas da xantana derivam de sua conformação dupla-hélice adotada em solução. A cadeia lateral trissacarídica alinha-se com a cadeia celulósica principal, estabilizando a conformação por interações não-covalentes (SUTHERLAND, 1998).

As propriedades reológicas da solução de xantana mudam com a natureza do polímero. O que se sabe é que elas são dependentes do: peso molecular médio e do conteúdo de acetato (TAKO e NAKAMURA, 1984) e piruvato (PETERS et al., 1993). Os níveis de ácido pirúvico e substituições de acetal na molécula podem variar com as

condições do crescimento (CADMUS et al., 1978), as condições operacionais (PETERS et al., 1993) e também a *Xanthomonas* sp usada (KENNEDY e BRADSHAW, 1984).

A goma xantana é freqüentemente usada em combinação com outros hidrocolóides a fim de se obter o comportamento desejado para o fluido. O sinergismo entre hidrocolóides é de especial interesse comercial, por possibilitarem uma nova funcionalidade, além de possibilitar reduzir as quantidades utilizadas, reduzindo custos (KATZBAUER, 1998).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL SALAM, M. H.; FADEL, M. A.; MURAD, H. A. Bioconversion of sugarcane molasse into xanthan gum. *Journal Biotechnology*, v. 33, p. 103-106, 1994.

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S. ; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *X. campestris* pv. *pruni*. *Ciência e Engenharia*, v. 9, n. 1, p. 83-87, 2000.

AZEVEDO, S. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Epidemiologia comparativa da Podridão Negra e da Alternariose do repolho na agreste de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, v. 27, n. 1, jan. – fev., 2002.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, I. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 50, p. 145-152, 1998.

BOROWSKI, J. M.; REDIES, C. R.; MICHELS, R.; BORGES, C. D. VENDRUSCOLO, C. T. Xantana sintetizada por cepas de *X. campestris* pv. *pruni* em diferentes meios de produção. CIC – Congresso Iniciação Científica. UFPEL, Pelotas, P. 4, 2006.

BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* culture. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1201-1209, 2004.

BRADBURY, J. F. Genus II: *Xanthomonas*. In: KRIEG N. R. HOLT, C. G., editores. *Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, M. D.: Williams & Wilkins, p. 199-210, 1984.

BRANDFORD, P.A. BAIRD, J. The Polysaccharides. In: Aspinall GO, EDITOR, New York: Academic Press, v. 2, p. 411-490, 1983.

BUENO, S. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. *Journal of Food Engineering*, v. 50, p. 41-46, 2001.

CACIK, F.; DONDO, R. G.; MARQUÉS, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. *Computers and Chemistry Engineering*, v. 25, p. 409-418, 2001.

CADMUS, M. C.; KNUTSON, K. A.; LAGOTA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotechnology Bioengineering*, v. 20, p. 1003-1014, 1978.

CASAS, J. A.; GARCÍA-OCHOA, F. Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixture. *Journal Science Food Agriculture*, v.79, p. 25-31, 1999.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 282-291, 2000.

CHALLEN, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: NISHINARI, K.; DOI, E. *Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Functions*. New York: Plenum Press, p. 135-140, 1994.

CHI, Z. e ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 206-211, 2003.

DEA, I. C. M.; CLARCK, A. H.; Mc Cleary, B. V.; Effect of galactose substitution patterns on the between xanthan and locust bean gum in aqueous media. *Agriculture Biology Chemical*, v.12, p. 2995-3000, 1986.

De VUYST, L.; VAN LOO, J.; VANDAMME, E. J. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Journal Chemical Biotechnology*, v. 39, p. 263-273, 1987.

ESGALHADO, M.E.; CALDEIRA, A.T.; ROSEIRO, J.C.; EMERY, A.N. Polysaccharide synthesis as a carbon dissipation mechanism in metabolically uncoupled *X. campestris* cells. *Journal of Biotechnology*, v. 89, p. 55-63, 2001.

ESGALHADO, M.E.; CALDEIRA, A.T.; ROSEIRO, J.C.; EMERY, A.N. Sublethal acid stress and uncoupling effects on cell growth and product formation in *X. campestris* cultures. *Biochemical Engineering Journal*, v. 12, p. 181-192, 2002.

FAO-Food and Agriculture Organization. Production Yearbook, 1990.

FLORES CANDIA, J. L.; DECKWER, W. D. Xanthan gum. In: Flickinger M. C.; Drew, S. W., editors. Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation, v. 5. New York: Wiley, p. 2695-2711, 1999.

FONTANIELLA, B.; RODRÍGUES, C.W.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.-E. Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. Journal of Chromatography B, v.770, p. 275-81, 2002.

FORESTI, A. P. Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas* em meios modificados. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPEL, 2003.

FUNAHASHI, H.; TOSHIOMI, Y.; TAGUCHI, H. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *X. campestris*. Journal of Fermentation Technology, v. 65, n. 5, p. 603 – 606, 1987.

GALINDO, E.; SALCEDO, G. Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *X. campestris*. Enzyme and Microbial Technology, v. 19, August, p. 145-149, 1996.

GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M. A. Preservation of *X. campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. Microbiology Biotechnology, v. 40, p. 634-637, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; FRITSCH, A. P. Nutricional study of *X. campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. Enzyme Microbiology Technology, v. 14, p. 991-996, 1992.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J. A.; MOHEDANO, A. F. Precipitation of xanthan gum. Sep Science Technology, v. 28, p. 1303-1313, 1993.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J. A. Apparent yield stress in xanthan gum solution at low concentration. Chemical Engineering Journal, v.53, p. 41-46, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnology Advances, v. 18, p. 549-579, 2000.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. Gellan gum . Critical Reviews Biotechnology, v. 20, n. 3, p. 177-211, 2000.

GUPTE, M .D.; KAMAT, M. Y. Isolation of wild *Xanthomonas* strains from agricultural produce, their characterization and potential related to polysaccharide production. *Folia Microbiology*, v. 42, n. 6, p. 621-628, 1997.

HORTON, D. H. O.; WALASZAK, Z. WERNAU, W. C. Structural and biosynthetic studies on xanthan by ¹³ C-N.M.R. spectroscopy. *Carbohydr Res*, v.141, p. 340-346, 1985.

HSU, C.-H.; LO, Y.M. Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. *Process Biochemistry*, p. 1-9 (article in press), 2003.

IELPI, L.; COUSO, R.O.; DANKERT, M. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *X. campestris*. *Journal of Bacteriology*, v. 175, p. 2490-2500, 1993.

JANA, A. K.; GHOSH, P. Stimulation of xanthan production by *Xanthomonas campestris* using citric acid. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 13, p. 261-264, 1997.

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. *Food Technology*, v. 28, n. 5, p. 34-38, 1974.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDES, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *X. campestris* grown in molasses. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 249-256, 2003.

KANG, K. S.; PETTITT, D. J. Gum Xanthan. In: WHISTLER, R. I; BEMILLER, J. N. ou. *Industrial Gums – Polysaccharides and their derivatives*. 3^a ed. San Diego : Academic Press, 1993. p. 343-344.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, p. 81 – 84, 1998.

KATZEN, F.; BECKER, A.; ZORREGUIETA, A.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Promoter análisis of the *X. campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *Journal of Bacteriology*, v. 178, n. 14, p. 4313-4318, 1996.

KENNEDY, J. F.; BRADSHAW, I. J. Production, properties and aplications of xantana. *Progress Ind. Microbiology*, n. 19, p. 319-371, 1984.

KENNEDY, J. F.; JONES, P.; BAKER, A. Factors affecting microbial growth and polysaccharides production during the fermentation of *Xantomonas campestris* cultures. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 4, n. 1, p. 39-43, 1982.

KIOSSEOGLOU, A.; PAPALAMPROU, E.; MAKRI, E.; DOXASTAKIS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by *X. campestris* ATCC1395 in batch culture. *Food Research International*, v. 36, p. 425-430, 2003.

KOVACS, P. Useful incompatibility of xanthan gum with galactomannans. *Food Technology*, v. 27, p. 26-30, 1973.

LETISSE, F.; CHEVALLEREAU, P.; SIMON, J.-L.; LINDLEY, N. The influence of metabolic network structures and energy requirements on xanthan gum yields. *Journal of Biotechnology*, v. 99, p. 307-317, 2002.

LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; TZANAKAKIS, E. S.; KIPARISSIDIS, C.; EKATERIANIADOU, L. V.; KYRIAKIDIS, D. A. Kinetics of xanthan gum production from whey by constructed strain of *X. campestris* in batch fermentations. *Chemical Engineering Technology*, v. 20, p. 354-360, 1997.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*, v. 3, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., p. 125-154, 2001.

LO, Y. M.; YANG, S. T.; MIN, D.B. Ultrafiltration broth: process and economic analyses. *Journal Food Engineering*, v. 31, p. 219-236, 1997.

MAIER, M.; ANDERSON, M.; KARL, C.; MAGNUSON, K. Guar, locust bean, tara, and fenugreek gums. In: WHISTLER, R. L. BEMILLER, J. N. editors. *Industrial gums*. New York: Academic Press, p. 205-213, 1993.

MAUGERI FILHO, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnology Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. v. 3, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., p. 125-153, 2001.

MEYER, E.L.; FULLER, G.G.; CLARK, R.C.; KULICKE, W.M. Investigation of xanthan gum solution behavior under shear-flow using rheoptical techniques. *Macromolecules*, v. 26, n. 3, p. 504-511, 1993.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. *Secex - Secretaria de Comércio Exterior*, 2002.

MORAINE, R.A.; ROGOVIN, P. Kinetics of the xanthan fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 15, p. 225-237, 1973.

MOREIRA, A. N. Estudo da viabilidade de produção do biopolímero da bactéria *Beijeirinckia* sp. 7070 via enzimática. Dissertação (mestrado), CEBIOT, UFPEL, p. 81, 2001.

MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C.T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijeirinckia* sp 7070. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 2, p. 300-305, 2003.

MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. *Gums and stabilizers for the food industry*. Oxford: Pergamon Press, p.57-78, 1984.

MORRIS, E. R. Molecular origino f xanthan solution properties. *Extracellular microbial polysaccharides*. ACS Symp Ser 45 (Washington, DC), p. 81-89, 1997.

NAVARRO, R. F. *Fundamentos de reologia de polímeros*, Editora da Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 1^a ed., 1997, p. 265.

NAVARRETE, R.C.; SEHEULT, J.M.; COFFEY, M.D. New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II. *International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982*, Houston, TX, 1-15, 2001 (a).

NAVARRETE, R.C. New Biopolymer for coiled tubing applications. *International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 68487*, Houston, TX, 1-10, 2001 (b).

NAVARRETE, R.C.; SEHEULT, J.M.; COFFEY, M.D. New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer fluids and coiled tubing applications. *International Symposium on Oilfield Chemistry IADC/SPE 62790*, Houston, TX, 1-17, 2000.

NCPPB. National Collection of Plant Pathogenic Bactéria, www.ncppb.com, 2006.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *X. campestris*. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 11, p. 502-504, 1995.

PAGE, G. W.; RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. *Adv Biochem Eng*, v. 15, p. 41-70, 1981.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *X. campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 1, p. 73-80, 2001.

PETER, H. U.; HERBST, H.; HESSELINK, P. G. M.; LÜNSDORF, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. D. The influence of agitation rate on xanthan production by *X. campestris*. *Biotechnology Bioengineering*, v. 34, p. 1393-1397, 1989.

PETERS H. U.; SUH I. S.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. D. The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. *Biotechnology Letter*, v. 15, p. 565-566, 1993.

PETTITT, D. J. Xanthan gum. In: *Food Hydrocolloids*. GLICKSMAN, M. Boca Raton: ed. CRC Press, 1982. p. 127-149. v. 1.

PONS A.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Modelling *X. campestris* batch fermentation in a bubble column. *Biotechnology Bioengineering*, v. 33, p. 394-405, 1989.

PONS A.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Xanthan batch fermentations: compared performance of a bubble column and a stirred tank fermentor. *Bioprocess Engineering*, v. 5, p. 107-114, 1990.

RAMÍREZ, M. E.; FUCIKOVSKY, L.; GARCÍA-JIMENEZ, F.; QUINTERO, R.; GALINDO, E. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *X. campestris*. *Appl Microbiology Biotechnology*, v. 29, p. 5-10, 1988.

RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 121-146, 1993.

SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: . S. O. Aspinall. *The polysaccharide*, New York: Academic Press, p. 412-490, v. 2., 1983.

SANTOS, Producción de xantano. PhD thesis. Madrid, Spain: Universidad Complutense, 1993.

SCAMPARINI, A.R.P.; DRUZIAN, J.I.; MALDONADE, I.; MARIUZZO, D. New biopolymers produced by nitrogen fixing microorganisms for use in foods. In: *Hydrocolloids. Part 1: Physical Chemistry and Industrial Application of Gels, Polysaccharides and Proteins*. Osaka: ed. K. Nishinari, Elsevier Science B.V., p. 169-178, 2000.

SEAG. Cana-de-açúcar. Disponível em
<http://www.seag.es.gov.br/cana_caracterização.htm> Acesso em: 30 mar. 2005.

SERRA, A. C. S. A influência de aditivos de lama de perfuração sobre as propriedades geoquímicas de óleos. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, 2003.

SHU, Ch-H., YANG, Sh-T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. *Biotechnology Bioengineering*, v. 35, p. 454-468, 1990.

SMITH, J. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. *Journal Chemical Technology Biotechnology*, v. 32, p. 119-129, 1982.

SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Nutricional studies on xanthan production by *X. campestris* NRRL B-1459. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, 1979.

SOUZA, A S.; VENDRUSCULO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv *pruni* CEPAS 24 e 28. *Ciência e Engenharia*, v. 8, n.2, p. 115-123, 1999.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L.; BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 11-16, 1999.

SUTHERLAND, I. W.; TAIT, M. I. Biopolymers. *Encyclopedia of Microbiology*, v. 1, p. 339-349, 1992.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 363-388, 1993.

SUTHERLAND, I.W.; KENNEDY, L. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. *Microbiology (UK)*, v. 142, p. 867-872, 1996.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Yibtech*, v. 16, p. 41-46, 1998.

SWINGS, J. G.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 121-146, 1993.

SYMES, K. C. The relationship between the covalent structure of the Xanthomonas polysaccharide (xanthan) and its function as a thickening, suspending and gelling agent. Food Chemistry, v. 6, p. 63-76, 1980.

URLACHER, B.; DALBE, B. Xanthan gum, in Thickening and Gelling Agents for foods (ed. A. Imeson), Blackie A. e P., Glasgow, p. 206-226, 1992.

VÉLEZ, G.; FERNÁNDEZ, M. A.; MUÑOZ, J.; WILLIAMS, P. A.; ENGLISH, R. J. Role of hydrocolloids in the creaming of oil in water emulsions. Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 265-269, 2003.

VENDRUSCOLO, C. T.; FORESTI, A. P.; MOREIRA, A. S. Utilização de fibra de soja para redução de custo no processo de obtenção de xantana. XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre, p. 1074-1077, 2002.

VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB, M. A. Z.; MOREIRA, A. S. The pH control as a tool for obtaining of different xanthan by *X. campestris* pv. *pruni*. 7th International Conference Hydrocolloids. Melbourn, Australian, 2004.

VOJNOV, A.A.; ZORREGUIETA, A.; DOW, J.M.; DANIELS, M.J.; DANKERT, M.A. Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan from its pentasaccharide repeating unit by *X. campestris*. Microbiology, v. 144, p. 1487-1493, 1998.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. Agricultural Biology Chemical, v. 48, p. 2987-2993, 1984.

TAKO, M.; ASATO, A.; NAKAMURA, S. Rheological aspects of the intermolecular interaction properties of galactomannans. Carbohydrate Res, v. 147, p. 275-294, 1984.

YOO, S.D.; HARCUM, S.W. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. Bioresource Technology, v. 70, 105-109, 1999.

WHISTLER; J. N.; BEMILLER, R. L. Xathan, gellan, wellan, e rhamnan. In: Industrial gums – Polysaccharides and their derivatives. (Ed.), London, p. 342-371, 1993.

CAPÍTULO II

*Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de
goma xantana*

2 CAPÍTULO II - Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana

Resumo

Pesquisas para a descoberta de novas cepas produtoras do biopolímero vêm despertando o interesse de inúmeros pesquisadores, que procuram por microrganismos com capacidade de produção de goma e qualidade superiores as existentes. O estudo em questão selecionou os patovares *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, *X. campestris* pv. *begoniae* 1138-95 e *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* 1429-00, como os de melhor desempenho, com uma produção de goma xantana de 10,8 g/L, 9,0 g/L e 8,5 g/L respectivamente. Sendo a linhagem 280-95, a de melhor desempenho em produção e qualidade. O “stress” alcalino aplicado no processo de produção da goma xantana aumentou em 40,76% a produção da goma, merecendo um estudo mais profundo a fim de determinar as melhores condições para a aplicação desse processo.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris*, seleção, produção de xantana, “stress” alcalino, otimização.

Selection among strains of *Xanthomonas campestris* for xanthan gum production

Abstract

Researches for investigation of new strains biopolymers have been raising many researchers' interest, who seek microorganisms with capacity of gum production and a higher quality than the existent ones. The present study selected the patovares *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, *X. campestris* pv. *begoniae* 1138-95 and *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* 1429-00, as better acting, with a production of xanthan gum of 10,8 g.L⁻¹, 9,0 g.L⁻¹ and 8,5 g.L⁻¹ respectively. Being the strain 280-95, better acting in production and quality. The alkaline "stress" applied in the process of production of the xanthan gum production increased in 40,76% the production of the gum, deserving a deeper study in order to determine the best conditions for the application of that process.

Keywords: *Xanthomonas campestris*, selection, xantana production, alkaline stress, viscosity, optimization.

1 INTRODUÇÃO

Xanthomonas é um gênero da família da Pseudomonaceae. Todos os microrganismos desse gênero são fitopatogênicos, com exceção do *Xanthomonas maltophilia* (SUTHERLAND, 1993; SWINGS et al., 1993). A *Xanthomonas* infecta uma extensa variedade de plantas incluindo alguns de interesse comercial como a alcachofra, o algodão, a ameixa, a berinjela, o brócolis, a couve, a couve-flor, a couve de Bruxelas, o maracujá, a mostarda, a nectarina, a pimenta, o pimentão, o rabanete, o repolho, o tomate, a alfafa, o pêssego e outras (NCPPB, 2006).

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* podem produzir goma xantana, um polissacarídeo de enorme interesse para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de petróleo. A goma apresenta capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhe fornece propriedades reológicas únicas.

A maioria dos estudos informa uma dependência clara entre linhagens usadas, rendimento e propriedades da goma xantana. Assim, a seleção da linhagem deveria ser o primeiro passo para um processo específico de produção (LÓPEZ et al., 2001; HASSLER e DOHERTY, 1990).

Atualmente toda a goma xantana consumida no Brasil, provém de importações, porém o Brasil tem um grande potencial para a fabricação deste polímero em escala industrial, já que temos matéria-prima básica para sua produção: açúcar, extrato de levedura e álcool do setor sucro-alcooleiro.

Esse estudo teve como objetivos selecionar linhagens de *X. campestris* em processo de fermentação normal, e testar o efeito do processo de “stress” alcalino ao final do processo fermentativo, avaliando produção e qualidade dos biopolímeros obtidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram utilizadas culturas liofilizadas das bactérias *X. campestris* pv. *begoniae* 1138-95, *X. campestris* pv. *malvacearum* 1779-02, *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* 1429-00, *X. campestris* pv. *campestris* 729-89, *X. campestris* pv. *vesicatoria* 1460-99, *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 e *X. campestris* pv. *campestris* CA110 (NRRL B-1459) pertencentes à Coleção de Cultura da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico de Campinas/SP-Brasil.

2.2 Meios de cultura

Foram utilizados os meios YM padrão (Yeast-Malt) sólido e líquido descritos por HAYNES et al., 1955), o meio I segundo SOUW e DEMAÏN (1979) e o meio nutriente conforme (PELCZAR, 1981).

O meio YM padrão (Yeast-Malt) é constituído por (p/v): extrato de Levedura 0,3%, extrato de Malte 0,3%, Peptona 0,5%, Glicose 1,0% e Ágar (para o meio sólido) 2,5%.

O meio de fermentação (Meio MP-I), previamente testado é constituído por (p/v): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, KH_2PO_4 0,5%, H_3BO_3 0,0006%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2%, $FeCl_3$ 0,00024%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,0002%, $ZnSO_4$ 0,0002%, ácido cítrico 0,20% e sacarose 5%.

O pH do Meio I foi ajustado para 7,0 com HCl 0,1 N e NaOH 0,1 N.

Os meios foram esterilizados a 121°C por 20 min. A sacarose foi esterilizada separadamente.

O meio nutriente constituído por (p/v): extrato de carne 0,3% (p/v), peptona 0,5% (p/v) e NaCl 0,8% (p/v).

2.3 Procedimento de re-hidratação das culturas liofilizadas

As culturas estavam acondicionadas em ampolas de vidro, as quais foram quebradas em condições estéreis e colocadas no interior de tubos de ensaio estéreis com tampa rosqueável. Com pipeta de Pasteur foram adicionadas 6-8 gotas de meio nutriente às ampolas. Agitadas e incubadas a 28°C por 60 min. Transcorridos 60 min,

as suspensões foram transferidas para placas contendo meio YM padrão sólido e incubadas a 28°C por 48 h (IBSBF, 2003).

As placas onde cresceram as bactérias oriundas das culturas liofilizadas foram chamadas de placa mãe. A partir desta placa foi colhido material de uma colônia isolada e esse material foi repassado para outra placa contendo meio YM padrão sólido. Esse procedimento foi repetido três vezes em duplicata (placa chamada de placa para produção) antes de utilizarmos cada um dos microrganismos para a produção do biopolímero.

2.4 Preservação e manutenção dos microrganismos

Para evitar possíveis perdas na viabilidade celular e ter maior segurança na manutenção das características das bactérias, estas foram estocadas a 4°C em tubos de ensaio contendo meio YM ágar inclinado e cobertas por óleo mineral. Quando necessário foram reativadas, transferidas para placas de Petri contendo meio YM e repassadas três vezes antes de serem utilizadas para nova produção de polímero.

Segundo Cadmus et al. (1978) é de grande importância o controle da formação de colônias variantes, que são pequenas e não gomosas e acarretam diminuição na produção de goma.

2.5 Produção do biopolímero

2.5.1 Preparação do pré-inóculo e contagem de células viáveis

Em tubos de ensaio estéreis contendo 3 mL de meio YM padrão líquido estéril foi inoculado 9 alçadas padrão (alça de platina com 3,0 mm de diâmetro) da cultura bacteriana, crescida em placa de Petri (placa de produção) contendo meio YM padrão sólido, sendo o material foi agitado e foram adicionados mais 3 mL de meio YM padrão líquido estéril. Esse procedimento foi padronizado a fim de se obter um pré-inóculo contendo no mínimo $2,6 \times 10^9$ UFC/mL (PAN et al., 2000).

As amostras de cada pré-inóculo foram submetidas a diluições decimais em série, transferindo-se 1 μ L de inóculo para 9 μ L de água sucessivamente até as diluições de 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} , transferindo-se 100 μ L de amostra diluída para a

superfície de placas contendo meio YM-sólido. As colônias foram contadas após 48 h de incubação a 28°C. Todos os testes de contagem foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em Unidade Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) (SILVA e JUNQUEIRA, 1995). Imediatamente após o preparo do pré-inóculo foi feito o inóculo.

2.5.2 Inóculo

Foram preparados cinco erlenmeyers de 125 mL (N° 4980, stopper n° 05, Pyrex, USA), contendo 7 mL cada de meio YM padrão onde foi colocado 1 mL do pré-inóculo. Esse procedimento foi realizado para cada uma das culturas.

Os erlenmeyers foram colocados em um Shaker Incubador (marca New Brunswick Scientific Co, modelo G27) e mantidos a uma temperatura de 28°C sob agitação de 180 rpm por 24 horas.

2.5.3 Fermentação

Após 24h esse material foi transferido sob condições estéreis para um erlenmeyer de 250 mL (N° 4980, stopper n° 06, Pyrex, USA) contendo 43 mL de meio de fermentação (Meio MP-I), previamente testado. Os erlemeyers foram colocados em um Shaker Incubador e mantidos a uma temperatura de 28°C sob agitação de 200 rpm por 72 horas (SOUZA e VENDRUSCOLO, 1999).

2.5.4 “Stress” alcalino

Após as 72 horas de fermentação os erlenmeyers foram levados para uma capela de fluxo laminar da marca Tecnal, modelo 115. Adicionou-se aos erlenmeyers hidróxido de sódio 2,0 N até atingir-se o pH 11. O controle desse pH foi realizado através de pHmetro digital. Após o ajuste do pH os frascos foram retornados ao Shaker Incubador e foram mantidos por 1 hora. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5.5 Separação do biopolímero

O caldo fermentado foi centrifugado a 22.300 x g em centrífuga, a 20°C por 15 min, para a separação da biomassa. Ao sobrenadante adicionou-se, etanol (92,8°GL) na proporção de 4:1, a para precipitação dos biopolímeros. A suspensão foi agitada por 5 min, a goma recolhida com bastão de vidro e tela metálica. A goma obtida foi congelada e liofilizada. O material foi triturado e pesado.

2.6 Métodos analíticos

2.6.1 Quantidade de goma xantana produzida

A goma liofilizada foi colocada em dessecador e pesada em balança analítica. A produção da goma xantana foi expressa em peso de goma (g) por volume de caldo precipitado (L).

2.6.2 Qualidade da goma através de viscosidade aparente

A qualidade da goma foi determinada através da viscosidade aparente. O comportamento reológico das amostras obtidas foi avaliado através de um reômetro rotativo da marca Haaker, modelo RS 150, sendo utilizado o sensor tipo copo, modelo DG 41. A determinação da viscosidade das amostras foi realizada a temperatura de 25°C. As soluções aquosas foram preparadas na concentração de 1,0 % (p/v) em água destilada, solubilizadas por agitação durante duas horas, seguido de aquecimento a 60°C por 20 min (DIAZ, 2002; ZHANG XUEWU et al., 1996). Os parâmetros das análises reológicas foram: taxa de deformação aplicada entre 0,01 s⁻¹ e 60 s⁻¹, com fenda 5100 mm e tempo de 300 seg. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.6.3 Composição química

Utilizou-se o método comparativo de cromatografia de camada delgada (CCD) desenvolvido por Moreira et al. (1998), onde as amostras foram hidrolisadas a 80°C por 16h através da adição de HCl 2 N, na proporção de 3:100 (p/v).

O produto da hidrólise foi analisado por cromatografia em camada delgada e co-cromatografia, em placas de gel de sílica F₂₅₄ (Merck), em cuba pré-equilibrada durante 10 minutos. Empregou-se eluente composto por clorofórmio-metanol-ácido acético-água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v) (MOREIRA et al., 1998). As amostras foram aplicadas com capilares padronizados. Para a revelação dos cromatogramas utilizou-se o reagente de detecção anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C durante 5 min, seguindo-se visualização sob luz ultravioleta a 366 nm (WAGNER et al., 1984). A caracterização dos constituintes foi feita comparando-se com padrões de glicose, manose, fucose, ramnose e ácido glucurônico.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Número de células no inóculo

Segundo Pan et al. (2000) o número de células iniciais no inóculo tem influência sobre a produção e a qualidade da goma produzida por *X. campestris* pv. *pruni* 06. O estudo mostra que a produção de goma xantana assim como a viscosidade da solução obtida são maiores nos ensaios onde o número inicial de células está entre $2,6 \times 10^9$ UFC/mL e $2,6 \times 10^{10}$ UFC/mL. Entretanto Pan et al. (2000) testaram concentrações iniciais de inóculo de no máximo $2,6 \times 10^{10}$ UFC/mL. Nesse estudo foi verificado que os tratamentos com menores concentrações iniciais de células ($2,6 \times 10^8$ – $1,3 \times 10^9$) apresentaram menor produção e viscosidade aparente para os biopolímeros obtidos, além de grandes flutuações na curva de crescimento celular no intervalo de 96 horas de fermentação. Segundo Pan et al. (2000) e Baiocco (1997) partindo-se de um menor número de células, verifica-se uma maior multiplicação celular, porém, uma menor produção de goma xantana.

Já os tratamentos com maiores concentrações iniciais de células ($2,6 \times 10^9$ – $2,6 \times 10^{10}$) apresentaram maior produção, viscosidade aparente e estabilidade celular durante a fermentação (não havendo diferença significativa $p < 0,05$ para os resultados de produção neste intervalo de concentrações de células iniciais).

Tabela 1-II
Concentração do inóculo para cada um dos patovares testados

Identificação da Bactéria	UFC/mL no Inóculo
1429-99	1×10^{11} (est.)
729-00	5×10^{10}
1138-95	$1,8 \times 10^9$
CA110	$2,5 \times 10^9$
1779-02	$3,3 \times 10^{11}$
1460-99	$5,4 \times 10^{10}$
280-95	$4,0 \times 10^{10}$

Os resultados da Tabela 1-I mostram que as concentrações iniciais dos inóculos obtidos para os diferentes patovares estão entre $1,8 \times 10^9$ e $3,3 \times 10^{11}$ UFC/mL.

Pan et al. (2000), Antunes (2000) e Souza (1999) sugerem para o número de células iniciais no inóculo concentrações acima de 10^9 UFC/mL.

3.2 Produção de goma xantana

Observou-se na Figura 1-II que para as condições utilizadas nesse estudo os patovares ou subespécies que apresentaram o melhor desempenho com relação à concentração de goma xantana obtida foram: *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, *X. campestris* pv. *begoniae* 1138-95 e *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* 1429-00, com uma produção de goma xantana de $10,8 \text{ g.L}^{-1}$, $9,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $8,5 \text{ g.L}^{-1}$ respectivamente.

Apartir destes resultados escolheu-se a linhagem 280-95 para testar o efeito do “stress” alcalino.

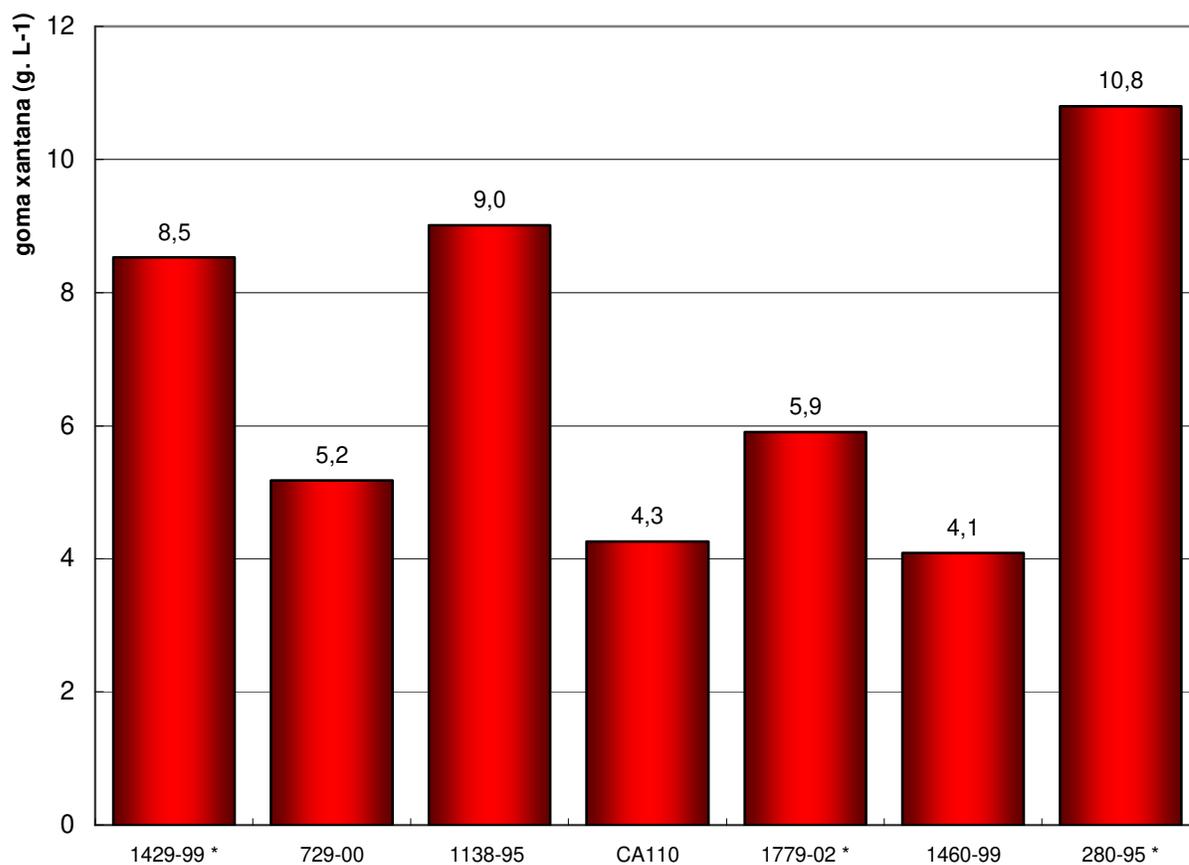


Figura 1-II: Produção de goma xantana (g.L⁻¹) para as linhagens utilizadas na seleção. Nota: As amostras com * são as que apresentaram maiores valores de viscosidade aparente.

É bastante difícil comparar os resultados de produções de goma encontradas por outros autores, pois os resultados variam em função da bactéria utilizada, até mesmo entre linhagens de um mesmo gênero, espécie e subespécie e também em função da composição dos meios utilizados, e das condições de processo. Os autores Foresti (2003), Borges (2003), Moreira et al. (2001), Antunes et al. (2000), Nitschke e Thomas (1995), Galindo et al. (1994) utilizaram condições muito semelhantes às condições utilizadas neste estudo.

Antunes et al. (2000) apresentaram resultados de produção de goma variando de 11,7 g.L⁻¹ e 26,4 g.L⁻¹, utilizando a linhagens 06 de *X. campestris* pv. *pruni*.

O estudo realizado por Moreira et al. (2001) apresenta condições muito semelhantes às utilizadas neste trabalho com exceção do meio de produção de goma, onde utilizaram o meio II. Moreira et al. (2001), realizaram uma seleção entre 18 diferentes linhagens de *X. campestris* pv *pruni*, onde a quantidade de goma xantana encontrada após 72 horas de fermentação mostrou uma grande variação, variando de 2,3 g.L⁻¹ a 8,4 g.L⁻¹.

Galindo et al. (1994) obtiveram rendimentos de 9,3 e 11,2 g.L⁻¹ com as linhagens B – 1459 e E2 (uma variante da 1459) de *X. campestris* pv. *campestris* respectivamente. Nitschke e Thomas (1995), utilizando linhagens selvagens de *X. campestris* pv. *campestris*, obtiveram produções de 10,6 g.L⁻¹ e 14,5 g.L⁻¹ para as linhagens C5 e Cv2C8 respectivamente.

Borges (2003) verificou a produção, a viscosidade e a composição química das gomas xantana obtidas de 30 diferentes linhagens de *X. campestris* pv *pruni*, utilizando o meio II como meio de produção. Observou produções que variaram de 0 a 9,2 g.L⁻¹ para a linhagem 83.

Foresti (2003) determinou a produção de xantana (6,4 g.L⁻¹) pela cepa padrão NRRL B-1459 de *X. campestris* pv. *campestris*, em condições idênticas a Borges (2003).

3.3 Efeito do “stress” alcalino na produção de goma xantana

As Figuras 1-II e 3-II mostram que a linhagem 280-95 apresentou o melhor desempenho em quantidade e qualidade, por esse motivo essa bactéria foi selecionada para testar o efeito do “stress” alcalino sob a produção do biopolímero.

A concentração de goma xantana obtida com a utilização do *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 após o processo de “stress” alcalino foi de 15,2 g.L⁻¹. Esse processo aumentou em 40,76% a produção da goma (Figura 2-II).

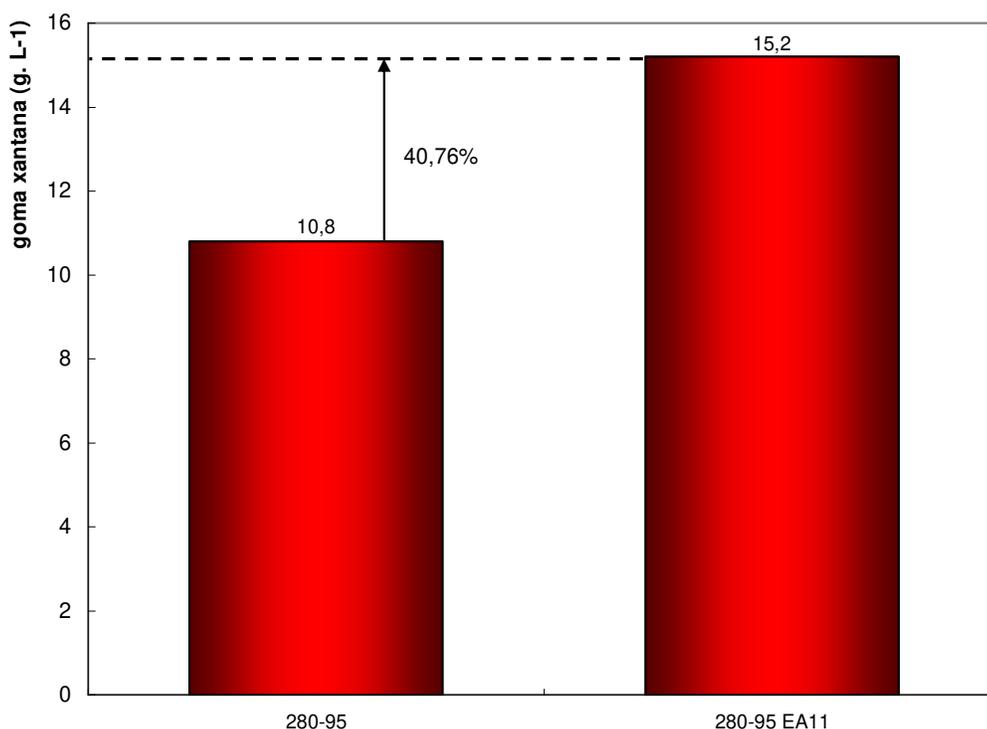


Figura 2-II: Produção de goma xantana (g.L⁻¹) para a linhagem 280-95 sem o processo de “stress” alcalino ($4,0 \times 10^{10}$ UFC/mL) e com o processo de “stress” alcalino em pH 11 ($5,5 \times 10^{11}$ UFC/mL) por 1 hora utilizando o NaOH.

3.4 Viscosidade aparente das gomas produzidas

Estudos mostram que as soluções de goma xantana são não-Newtonianas, apresentam um comportamento dependente do tempo e/ou da taxa de deformação e são fluidos altamente pseudoplásticos (PADILHA, 2003; CACIK et al., 2001; BUENO e GARCIA-CRUZ, 2001; KATZBAUER, 1998). Uma pequena quantidade de xantana (< 1,0%) aumentará sua viscosidade por um fator de 100.000 em baixas taxas de deformação, e para um fator de 10 em altas taxas de deformação. Esta notável pseudoplasticidade pode ser comparada a poucos biopolímeros (WHITCOMB, 1978).

Os dados obtidos nas avaliações de viscosidade aparente podem ser observados nas Figuras 3-II e 4-II. Todas as soluções aquosas a 1% de goma xantana obtidas de fermentações com as bactérias testadas, apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico, como era esperado para as soluções aquosas de goma xantana. Estes

resultados estão de acordo com os mostrados na literatura por Padilha (2003), Cacik et al. (2001), Bueno e Garcia-cruz (2001), Katzbauer (1998), Nitschke et al. (1997), e Sandford e Baird (1983).

Na Figura 3-II observamos que a solução obtida a partir da goma xantana da linhagem 280-95 apresentou maior viscosidade em taxas de deformação entre 0–60 s^{-1} , com valor de viscosidade para taxa de deformação de 10,5 s^{-1} de 510 mPa.s. Além da goma produzida pela bactéria 280-95 as gomas produzidas pelas bactérias 1429-99, 1779-02 e 289-95 também apresentaram bom desempenho no momento de taxa de deformação zero. Em taxas de deformação entre 0 – 60 s^{-1} as amostras 280-95, 1429-99, 1779-02 e 280-95 EA são as de maior viscosidade (Figura 3-II).

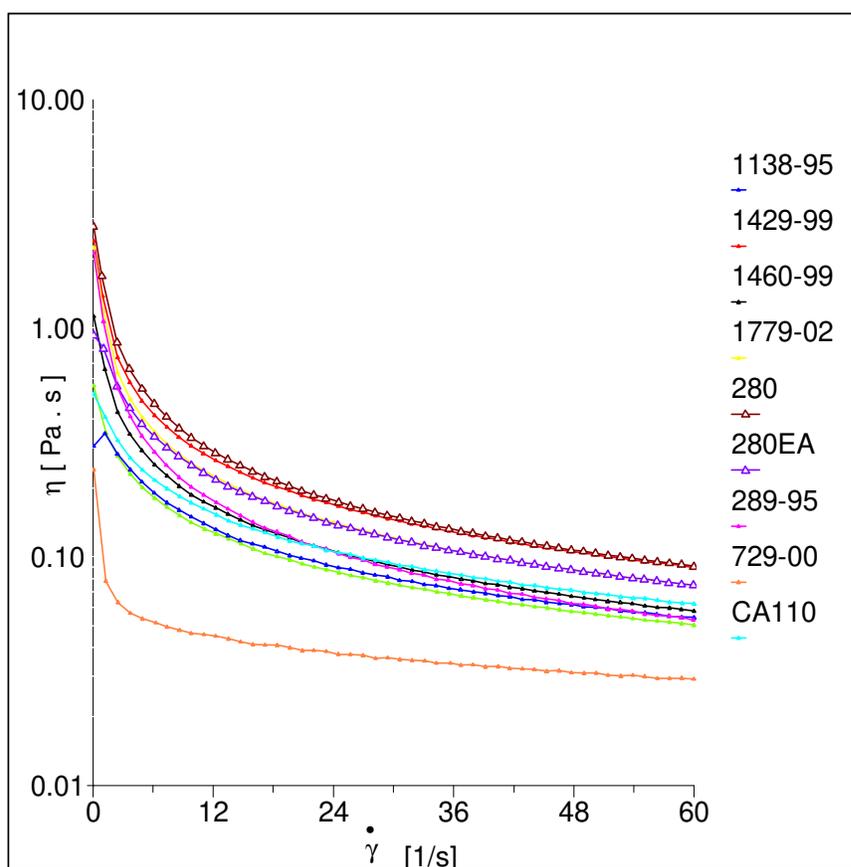


Figura 3-II: Viscosidade aparente (Pa.s) vs Taxa de deformação (s^{-1}), a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), produzidas pelas diferentes linhagens.

Observamos na Figura 4-II que a solução obtida a partir da goma xantana da linhagem 280-95 sem “stress alcalino” apresentou 510 mPa.s de viscosidade aparente, a mesma linhagem após “stress alcalino” apresentou 400 mPa.s para uma taxa de deformação de $10,5 \text{ s}^{-1}$. O “stress” alcalino diminuiu a qualidade da goma obtida pela linhagem 280-95, entretanto observou-se uma goma com característica mais elástica do que viscosa, sugerindo um estudo de viscoelasticidade.

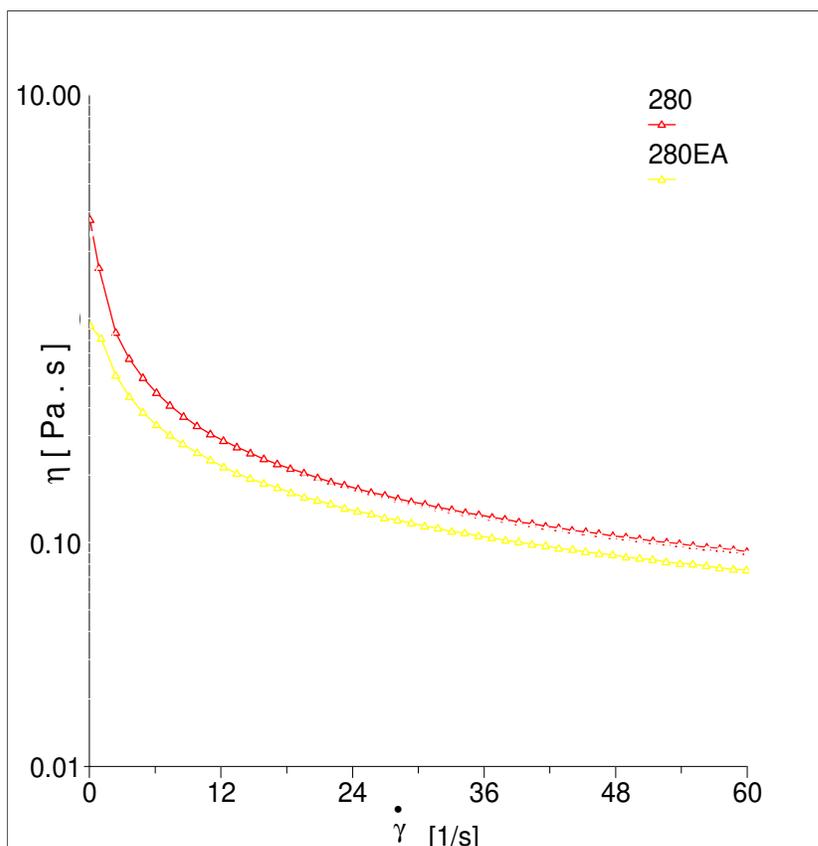


Figura 4-II: Viscosidade aparente (Pa.s) vs Taxa de deformação (s^{-1}), a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), amostras: 280-95 e 280-95 EA11.

No estudo realizado por Rottava (2005), o valor de viscosidade aparente encontrado para as gomas obtidas a partir do *X. campestris* pv. *manihotis* 1182, *X. campestris* pv. *campestris* 607, *X. campestris* pv. *campestris* 1078, *X. campestris* pv. *campestris* 254, *X. campestris* pv. *arracaciae* 1198 e *X. campestris* pv. *campestris* 729

foram respectivamente 360 mPa.s, 220 mPa.s, 230 mPa.s, 66 mPa.s, 37 mPa.s e 161 mPa.s, para taxa de deformação de $10,5 \text{ s}^{-1}$. As condições da análise reológica foram diferentes, sendo utilizada nesse estudo uma solução aquosa três vezes mais concentrada do que a utilizada em nosso estudo, viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, spindle 18 a 25°C .

Borges (2003) apresentou em seu estudo a caracterização de 30 cepas de *X. campestris* pv *pruni*, utilizando condições para a avaliação da viscosidade semelhantes às utilizadas nesse estudo, com exceção da concentração das soluções, que foi de 3% (p/p) e apesar de utilizar o mesmo modelo de reômetro (HAAKE, RS150) utilizou o sistema placa-placa com sensor PP35Ti. Encontrou para uma taxa de deformação de 10 s^{-1} valores de viscosidade entre 12.700 mPa.s e 1.370 mPa.s. Para uma amostra de xantana comercial testada encontrou 3.400 mPa.s.

Foresti (2003) analisou a viscosidade aparente da solução de aquosa a 3% (p/p) da xantana sintetizada pela cepa padrão NRRL B-1459 de *X. campestris* pv. *campestris*, atingindo 2.700 mPa.s numa taxa de deformação de 10 s^{-1} .

Nitschke e Thomas (1995), numa taxa de deformação de $12,5 \text{ s}^{-1}$, relataram que as soluções aquosas a 0,5% (p/p) dos polímeros sintetizados por cepas selvagens de *X. campestris*, variaram de 200 mPa.s para a cepa Cv2C8, até 641 mPa.s para a cepa C7.

Souza e Vendruscolo (1999) ao determinar a viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% de xantana produzidas por *X. campestris* pv. *pruni* cepas 24 e 58, analisadas em reômetro HAAKE CV 20, apresentaram aproximadamente 5.000 mPa.s e 300 mPa.s respectivamente, numa taxa de deformação de 10 s^{-1} .

A goma xantana produzida pelo *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 apresentou as maiores viscosidades na faixa de taxa de deformação testada ($0 - 60 \text{ s}^{-1}$), atingindo viscosidade de 510 mPa.s para taxa de deformação de $10,5 \text{ s}^{-1}$; valor abaixo do esperado para xantana comercial, porém devemos ressaltar que as amostras em questão não foram purificadas, o que prejudica seu desempenho reológico.

Na literatura não foi encontrado estudo exatamente com as mesmas condições de processo e de análise reológica em que a goma xantana foi testada. Porém os

relatos fornecem uma orientação quanto à grandeza esperada para goma xantana de boa qualidade e um produto comercial.

Industrialmente existem muitos tipos de xantana com propriedades adequadas para cada tipo de aplicação. Geralmente a xantana tipicamente utilizada em alimentos apresenta uma viscosidade de 1400 mPa.s (solução de 1%, com adição de 1% de KCl, 60 rpm, 25°C, viscosímetro Brookfield LVF, spindle 3), já a xantana utilizada para outros fins industriais apresenta viscosidade de 850 mPa.s (60 rpm em 11 s⁻¹) (CPKELCO, 2001 e BRAUN e ROSEN, 2000).

3.5 Análise de composição química

Os biopolímeros obtidos foram analisados por CCDC para a identificação dos seus monossacarídeos e ácidos constituintes. As amostras de gomas analisadas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes (Figura 5-II). Na sua composição foram identificados os ácidos glucurônico com R_f de 0,30, e os monossacarídeos glicose, manose e ramnose com valores de R_f de 0,54, 0,56 e 0,70 respectivamente (OLIVEIRA et al., 2000; SOUZA, 1999). Segundo Moreira (2002) o ácido galacturônico apresenta R_f de 0,27, para a técnica cromatográfica utilizada nesse estudo, provavelmente as manchas que aparecem abaixo das manchas de ácido glucurônico serem de ácido galacturônico.

A presença da ramnose pode ser uma característica desejável, pois em geral, os polímeros nos quais ele está presente possuem capacidade de formar géis verdadeiros, quando em suspensão aquosa (KANG e MCNEELY, 1977). A xantana comercial, em solução aquosa, não tem capacidade de formação de gel, mesmo em altas concentrações. Por isso a importância de ramnose quando se deseja encontrar biopolímeros que possam ser usados como estruturantes ou gelificantes. No entanto, os biopolímeros que formam géis em altas concentrações mudam seu comportamento reológico quando em baixas concentrações, não formando géis. Isso pode ser considerado como um aspecto positivo, pois amplia a utilização destes, podendo ser utilizado como gelificante, espessante ou estabilizante (SANDERSON, 1990; SOUW e DEMAÏN, 1979).

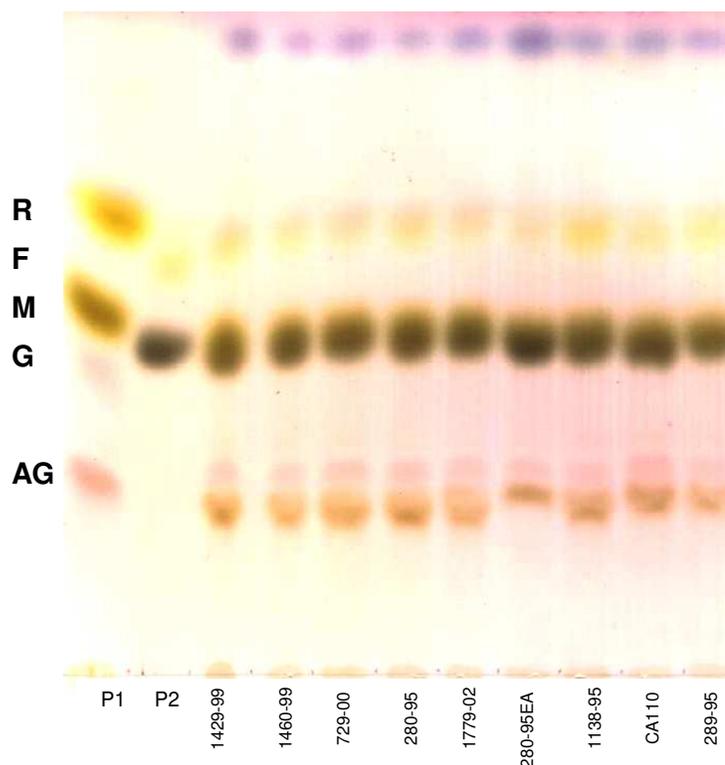


Figura 5-II: Cromatografia de camada delgada. Padrões: (P_1) Ácido Glucurônico (AG, Rf 0,30), Manose (M, Rf 0,56) e Ramnose (R, Rf 0,70); (P_2) Glicose (G, Rf 0,54) e Fucose (F, Rf 0,65). Eluido com clorofórmio-Metanol-Ácido Acético-Água (40:40:10:10 v/v/v/v).

Diferenças na estrutura dos biopolímeros tendem ser principalmente devido a mudanças nas concentrações de piruvato e acetato, mas variações na composição de carboidratos também podem ocorrer. Em muitos casos a proporção entre monossacarídeos é mantida (1:1), mas pequenas variações podem ocorrer entre diferentes espécies (SUTHERLAND, 1981) e em mutantes. HEYRAND et al. (1998) obtiveram um polímero de *X. campestris* pv. *campestris* 8396, desprovido de ácido glucurônico, onde glicose e manose estão em um razão molar de 2:1. A presença de outros monossacarídeos tais como galactose e ramnose também têm sido relatada.

4 CONCLUSÃO

Para as condições utilizadas nesse estudo as linhagens que apresentaram o melhor desempenho com relação à produção e qualidade de goma xantana obtida foram: *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, *X. campestris* pv. *begoniae* 1138-95 e *X. campestris* pv. *dieffenbachiae* 1429-00, com uma produção de goma xantana de 10,8 g.L⁻¹, 9,0 g.L⁻¹ e 8,5 g.L⁻¹ respectivamente.

A goma xantana produzida por *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 foi a que apresentou maior produção (g.L⁻¹) e também a maior viscosidade na faixa de taxa de deformação testada (0 – 60 s⁻¹).

O rendimento fermentativo com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 após o processo de “stress” alcalino aumentou em 40,76%, merecendo um estudo mais profundo sobre o efeito do “stress” alcalino sob a produção do biopolímero e quais as melhores condições para esse processo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A. E. C. Produção, viscosidade e composição de xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* em meios convencionais e alternativos. Dissertação (mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 63, 2000.

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. Ciência e Engenharia, v. 9, n. 1, p. 83-87, 2000.

ANTUNES, A. E. C. Produção, viscosidade e composição de xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* em meios convencionais e alternativos. Dissertação (mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 63, 2000.

BAIOCCO, L. M. Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis*. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, p. 148, 1997.

BORGES, C. D. Caracterização da goma xantana em função das cepas de *X. campestris* pv. *pruni* e das condições operacionais. Dissertação (mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 98, 2003.

BRAUN, D. B.; ROSEN, M. R. Rheology Modifiers Handbook Practical Use and Application. Norwich:New York, p. 505, 2000.

BUENO, S. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. Journal of Food Engineering, v. 50, p. 41-46, 2001.

CACIK, F.; DONDO, R. G.; MARQUÉS, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. Computers and Chemical Engineering, v. 25, p. 409-418, 2001.

CADMUS, M. C.; KNUTSON, K. A.; LAGOTA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. Biotechnology Bioengineering, v. 20, p. 1003-1014, 1978.

CPKELCO Global leader in hydrocolloids. Xanthan gum book, CPKelco Asp: 8^a th edition, 28 p, 2001.

DIAZ, P. S. Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana. Dissertação (mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 65, 2002.

FORESTI, A. P. Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas* em meios modificados. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPEL, 2003.

GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M. A. Preservation of *X. campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. Microbiology. Biotechnology, v. 40, p. 634-637, 1994.

HASSLER, R. A.; DOHERTY, D. H. Biotechnology Process, v. 6, p. 182-187, 1990.

HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J.; HESSELTINE, C. W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. *Applied Microbiology*, v. 3, n. 6, p. 361-368, 1955.

HEYRAUD, A.; SAYAH, B.; VOJNOV, A.; COLIN-MOREL, G. C.; GEREMIA, R. A.; DANKAERT, M. A. Structure of an extracellular mannosylated cellulose produced by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Cellular and Molecular Biology*, v. 44, n. 3, p. 447-454, 1998.

IBSBF – Coleção de Cultura da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico de Campinas/SP-Brasil.

KANG, K. S.; McNEELY, W. PS-7. A new bacterial heteropolysaccharide. In: SANDFORD, P. A.; LASKIN, A. ed. *Extracellular Microbial Polysaccharide*. Washington, D. C. American Chemical Society, p. 220-230, 1977.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability*, v. 59, p. 81 – 84, 1998.

LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. *X. campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. *Elsevier Science Ltd. Wat. Res.*, v. 35, n. 7, p. 1828-1830, 2001.

MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C.T. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: Metodologia. *Revista Brasileira de Agrociência*, n. 4, v. 3, p. 222-224, 1998.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TURNES, C.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening among 18 novel strains of *X. campestris* pv. *pruni*. *Food Hydrocolloids*, v. 15, p. 469-474, 2001.

MOREIRA, A. N. Estudo da viabilidade de produção do biopolímero da bactéria *Beijeirinckia* sp. 7070 via enzimática. Dissertação (mestrado), CEBIOT, UFPEL, p. 81, 2002.

NCPPB. National Collection of Plant Pathogenic Bactéria, www.ncppb.com, 2006.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *X. campestris*. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 11, p. 502-504, 1995.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. KNAUSS, C. Xanthan production by *X. campestris* in a whey-based medium. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p. 148-151, 1997.

OLIVEIRA, L. H. S.; DIAS, F. G.; DUARTE, I. C. S.; OLIVA-NETO, P.; CRUZ, R.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de goma xantana. *Revista Científica Plural*, v. 1, p. 115-120, 2000.

PADILHA, F. F. Produção de biopolímeros sintetizados por microorganismos. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, p. 210, 2003.

PAN, A.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *X. campestris* pv. *pruni* CEPA 06. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 6, n. 3, p. 273-277, 2000.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*, v. 2, São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1981, p. 1031.

ROTTAVA, I. Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana. Dissertação (mestrado), Departamento de Ciências Agrárias, URI, p. 79, 2005.

SANDERSON, G. R. Gellan gum. *Applied Science*, v. 479, p. 201-232, 1990.

SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: . S. O. Aspinall. *The polysaccharide*, New York: Academic Press, p. 412-490, v. 2., 1983.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Contagem Total de microrganismo aeróbicos mesófilos/psicrotróficos e de bolores leveduras em placas. In: *Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. Manual Técnico N°14. Campinas: ed. ITAL, p. 21-29, 1995.

SOUW, P.; DEMAINE, A. L. Nutricional studies on xanthan production by *X. campestris* NRRL B-1459. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, 1979.

SOUZA, A. S. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv. *pruni* cepas 24 e 58. Dissertação (Mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 36, 1999.

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. UFPEL, p. 36, 1999.

SOUZA, A S.; VENDRUSCULO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv *pruni* CEPAS 24 e 28. Ciência e Engenharia, v. 8, n.2, p. 115-123, 1999.

SUTHERLAND, I. W. *Xanthomonas* polysaccharides improved methods for their comparison. Carbohydrates and Polymer, v. 1, p. 107-115, 1981.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 363-388, 1993.

SWINGS, J. G.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 121-146, 1993.

WHITCOMB, P. J. Rheology of xanthan gum. Journal of Rheology, v. 22, n. 5, p. 493-505, 1978.

WAGNER, H.; BIADT, S. ZGAINSKI, G. M. Plant drug analysis. New York: Springer-Verlag, 1984.

ZHANG XUEWU; LIU XIN; GU DEXIANG; ZHOU WEI; XIE TONG; MO YONGHONG. Rheological models for xanthan gum. Journal of Food Engineering, v. 27, p. 203-209, 1996.

CAPÍTULO III

*Efeito do “stress” alcalino na produção de goma xantana por Xanthomonas
campestris pv. manihotis 280-95*

3 CAPÍTULO III - Efeito do “stress” alcalino na produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 280-95

Resumo

O estudo em questão utilizou *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 para a produção de goma xantana a fim de testar diferentes condições para o “stress” alcalino ao final do processo fermentativo, realizado em frasco. Para isso foram testados diferentes tipos de álcalis (NaOH e KOH), diferentes pH (pH 8,0, pH 9,0, pH 10,0, pH 11,0 e pH 12,0) e diferentes tempos de “stress” alcalino (1h, 2h, 3h e 4h), avaliando a produção e a qualidade do biopolímero obtido. O maior valor de produção de xantana foi atingido em “stress” alcalino com pH 12 (EA12), seguido do “stress” alcalino em pH 11 (EA11) e “stress” alcalino em pH 8 (EA08). A qualidade da goma obtida após o processo de EA12 é menor comparada à goma obtida sem o processo de “stress” alcalino. O hidróxido de sódio (NaOH) apresentou melhor desempenho para o processo de “stress” alcalino. A produção de goma xantana (g.L^{-1}) e as viscosidades aparentes das gomas não foram afetadas nos diferentes tempos de “stress” alcalino (EA12) testados nesse estudo (1h, 2h, 3h e 4h), na faixa de taxa de deformação testada ($0 - 60 \text{ s}^{-1}$).

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris*, produção de xantana, “stress” alcalino, viscosidade, otimização.

Effect of the alkaline stress in the xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 280-95

Abstract

The present study used *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 for the xanthan gum production, in order to test different conditions for the alkaline "stress" at the end of the fermentative process, accomplished in flask. To do so, different types of alkalis were tested (NaOH and KOH), at different pH (pH 8,0, pH 9,0, pH 10,0, pH 11,0 and pH 12,0) and at different times of alkaline "stress" (1:00, 2:00, 3:00 and 4:00), evaluating the production and the quality of the biopolymer obtained. The highest value of xantana production was reached at alkaline "stress" with pH 12 (EA12), followed by the alkaline "stress" in pH 11 (EA11) and

alkaline "stress" of pH 8 (EA08). the quality of the gum obtained after the process of EA12 was smaller than that gum obtained without alkaline "stress." The hydroxide of sodium (NaOH) presented better result for the process of alkaline "stress." The production of gum xantana (g.L^{-1}) and apparent viscosities of the gums were not affected at the different times of alkaline "stress" (EA12) tested in that study (1:00, 2:00, 3:00 and 4:00), at the shear rate range tested ($0 - 60 \text{ s}^{-1}$).

keyword: *Xanthomonas campestris*, xantana production, alkaline stress, viscosity, optimization.

1 INTRODUÇÃO

A espécie *X. campestris* pv. *manihotis* infecta a mandioca e algumas euforbiáceas botanicamente afins. Uma de suas conseqüências é a murcha bacteriana da mandioca. Esta doença foi descrita pela primeira vez no Brasil por Bondar (1915), no estado do Pará, e atualmente ela é encontrada em todas as regiões onde a mandioca é cultivada. Apesar dos malefícios causados à agricultura e plantas em geral, não existem registros de patogenicidade ao homem ou a animais (ROMEIRO, 2000).

As bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas* podem produzir goma xantana, o mais importante hidrocolóide microbiano comercializado atualmente, um polissacarídeo de enorme interesse para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de petróleo. O interesse se dá em função de sua capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis.

Atualmente, toda a goma xantana consumida no Brasil provém de importações, porém o Brasil tem grande potencial para a fabricação deste polímero em escala industrial, já que temos matéria-prima básica para sua produção: açúcar, extrato de levedura e álcool do setor sucro-alcooleiro.

Devido ao grande interesse de produção de goma xantana no País, viu-se o interesse em desenvolver pesquisas que otimizem o processo de produção, da goma xantana, visando aumentar a sua produção e qualidade.

Esse estudo teve como objetivos testar diferentes condições para o “stress” alcalino ao final do processo fermentativo de produção de goma xantana por *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95. Para isso foram testados diferentes tipos de álcalis, diferentes pHs e diferentes tempos de “stress” alcalino, avaliando a produção e a qualidade do biopolímeros obtidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foi utilizada a cultura liofilizada da bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 pertencentes à Coleção de Cultura da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico de Campinas/SP-Brasil.

2.2 Meios de cultura

Foram utilizados os meios YM padrão (Yeast-Malt) sólido e líquido descritos por HAYNES et al., 1955), o meio I por SOUW e DEMAIN (1979) e o meio nutriente (PELCZAR, 1981).

O meio YM padrão (Yeast-Malt) foi constituído por (p/v): extrato de Levedura 0,3%, extrato de Malte 0,3%, Peptona 0,5%, Glicose 1,0% e Agar (para o meio sólido) 2,5%.

O meio de fermentação (Meio MP-I), previamente testado foi constituído por (p/v): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, KH_2PO_4 0,5%, H_3BO_3 0,0006%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2%, $FeCl_3$ 0,00024%, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,0002%, $ZnSO_4$ 0,0002%, ácido cítrico 0,20% e sacarose 5%. O pH do Meio I foi ajustado para 7,0 com HCl 0,1 N e NaOH 0,1 N. Os meios foram esterilizados em autoclave vertical, a 121°C por 20 min. A sacarose foi esterilizada separadamente. O meio nutriente constituído por: extrato de carne 0,3% (p/v), peptona 0,5% (p/v), e NaCl 0,8% (p/v).

2.3 Procedimento de re-hidratação das culturas liofilizadas

As culturas estavam acondicionadas em ampolas de vidro, as quais foram quebradas em condições estéreis e colocadas no interior de tubos de ensaio estéreis com tampa rosqueável. Com pipeta de Pasteur foram adicionadas 6-8 gotas de meio nutriente às ampolas. Agitadas e incubadas a 28°C por 60 min. Transcorridos 60 min, as suspensões foram transferidas para placas contendo meio YM padrão sólido e incubadas a 28°C por 48 h (IBSBF, 2003).

As placas onde cresceram as bactérias oriundas da cultura liofilizada foram chamadas de placa mãe. A partir desta placa foi colhido material de uma colônia isolada e esse material foi repassado para outra placa contendo meio YM padrão sólido. Esse procedimento foi repetido três vezes em duplicata (placa chamada de placa para produção) antes de utilizarmos cada um dos microrganismos para a produção do biopolímero.

2.4 Preservação e manutenção dos microrganismos

Para evitar possíveis perdas na viabilidade celular e ter maior segurança na manutenção das características das bactérias, essas foram estocadas a 4°C em tubos de ensaio contendo meio YM ágar inclinado e cobertas por óleo mineral. Quando necessário foram reativadas, transferidas para placas de Petri contendo meio YM e repassadas 3 vezes antes de serem utilizadas para nova produção de polímero. Segundo Cadmus et al. (1978) é de grande importância o controle da formação de colônias variantes, que são pequenas e não gomosas e acarretam diminuição na produção de goma.

2.5 Produção do biopolímero

2.5.1 Preparação e contagem das células viáveis do pré-inóculo

Em tubos de ensaio estéreis contendo 3 mL de meio YM padrão líquido estéril foram inoculados com 9 alçadas padrão (alça de platina com 3,0 mm de diâmetro) da cultura bacteriana, crescida em placa de Petri (placa de produção) contendo meio YM padrão sólido. O material foi agitado e foram adicionados mais 3 mL de meio YM

padrão líquido estéril. Esse procedimento foi padronizado a fim de se obter um pré-inóculo contendo no mínimo $2,6 \times 10^9$ UFC/mL (PAN et al., 2000).

As amostras de cada pré-inóculo foram submetidas a diluições decimais em série, transferindo-se $1\mu\text{L}$ de inóculo para $9\mu\text{L}$ de água sucessivamente até as diluições de 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} , transferindo-se $100\mu\text{L}$ de amostra diluída para a superfície de placas contendo meio YM-sólido. As colônias foram contadas após 48 h de incubação a 28°C . Todos os testes de contagem foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em Unidade Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) (SILVA e JUNQUEIRA, 1995). Imediatamente após o preparo do pré-inóculo foi feito o inoculo.

2.5.2 Inóculo

Foram preparados cinco erlenmeyers de 125 mL (N° 4980, stopper n° 05, Pyrex, USA), contendo 7 mL cada de meio YM padrão onde foi colocado 1 mL do pré-inóculo. Esse procedimento foi realizado para cada uma das culturas. Os erlenmeyers foram colocados em um Shaker Incubador e mantidos a uma temperatura de 28°C sob agitação de 180 rpm por 24 horas.

2.5.3 Fermentação

Após 24h esse material foi transferido em condições estéreis para um erlenmeyer de 250 mL (N° 4980, stopper n° 06, Pyrex, USA) contendo 43 mL de meio de fermentação (Meio MP-I), previamente testado. Os erlemeyers foram colocados em um Shaker Incubador e mantidos a uma temperatura de 28°C sob agitação de 200 rpm por 72 horas (SOUZA e VENDRUSCOLO, 1999).

2.5.4 “Stress” alcalino

Após as 72 horas de fermentação os erlenmeyers foram levados para uma capela de fluxo laminar. Adicionou-se aos erlenmeyers hidróxido de sódio 2,0 N até atingir-se o pH desejado, o controle desse ajuste foi realizado através de um pHmetro

digital. Os frascos foram retornados ao Shaker Incubador e mantidos sob “stress” alcalino por diferentes tempos (1h, 2h, 3h e 4h). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.5.5 Separação do biopolímero

O caldo fermentado foi centrifugado a 22.300 x g em centrífuga, a 20°C por 15 min, para a separação da biomassa. Ao sobrenadante adicionou-se, etanol (92,8°GL) na proporção de 4:1, a para precipitação dos biopolímeros. A suspensão foi agitada por 5 min, a goma recolhida com bastão de vidro e tela metálica. A goma obtida foi congelada e liofilizada. O material foi triturado e pesado.

2.6 Avaliação do pH, do tipo de álcali e do tempo de “stress” alcalino (EA)

Após 72 horas de fermentação foi adicionado ao caldo fermentado o álcali (NaOH 2,0 N ou KOH). A quantidade de alcali adicionado foi controlada com a ajuda de um pHmetro a fim de obter o pH para “stress” alcalino (8,0, 9,0, 10,0, 11,0 e 12,0). No pH de melhor desempenho em produção de goma xantana, foram testados os tempos de “stress” alcalino de 1h, 2h, 3h e 4h. Esses testes foram realizados com cinco erlenmeyers simultaneamente.

2.7 Métodos analíticos

2.7.1 Quantidade de goma xantana produzida

A goma liofilizada foi colocada em dessecador e pesada em balança analítica. A produção da goma xantana foi expressa em peso de goma (g) por volume de caldo precipitado (L).

2.7.2 Qualidade da goma através de viscosidade aparente

O comportamento reológico das amostras obtidas foi avaliado através de um reômetro rotativo da marca Haaker, modelo RS 150, sendo utilizado o sensor tipo copo,

modelo DG 41. A determinação da viscosidade das amostras foi realizada a temperatura de 25°C. As soluções aquosas foram preparadas na concentração de 1,0 % (p/v) em água destilada, solubilizadas por agitação durante duas horas, seguido de aquecimento a 60°C por 20 min (DIAZ, 2002; ZHANG XUEWU et al., 1996). Os parâmetros das análises reológicas foram: taxa de deformação aplicada entre 0,01 s⁻¹ e 60 s⁻¹, com fenda 5100 mm e tempo de 300 seg. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise das colônias de *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95

Quando cultivada em meio YM ágar, *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 apresentou colônias convexas, circulares, com bordos inteiros, sem reentrâncias, possuindo superfície lisa, com aspecto mucóide e brilhante. Esta linhagem não apresenta pigmentação, característica esta que a diferencia da maioria das espécies conhecidas pertencentes ao gênero *Xanthomonas* (BAIOCCO, 1997).

Segundo García-Ochoa (2000) e Bradbury (1984) as colônias de *Xanthomonas* sp são normalmente amarelas, lisas e viscosas. Entretanto, pode-se observar que algumas linhagens possuem pigmentação menos intensa ou ausência de pigmentação.

As colônias do *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 são visíveis após 48 horas de incubação (Figura 1-III). No decorrer deste trabalho não foi observado o aparecimento de sub-linhagens mutantes. Nenhuma variação das características das colônias formadas foi observada.



Figura 1-III: Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95.

Amanullah et al. (1996) relataram o problema de reprodutibilidade nas fermentações de xantana, que ocorre principalmente devido a inconsistência no desenvolvimento do inóculo e da instabilidade da linhagem utilizada.

3.2 Avaliação do pH, do tipo de alcali e do tempo de “stress” alcalino na produção e qualidade da goma

Como podemos observar na Figura 2-III o maior valor de produção de xantana foi atingido em “stress” alcalino com pH 12 (EA12), seguido do EA 11 e EA 08. Em pH 10 encontram-se os menores valores.

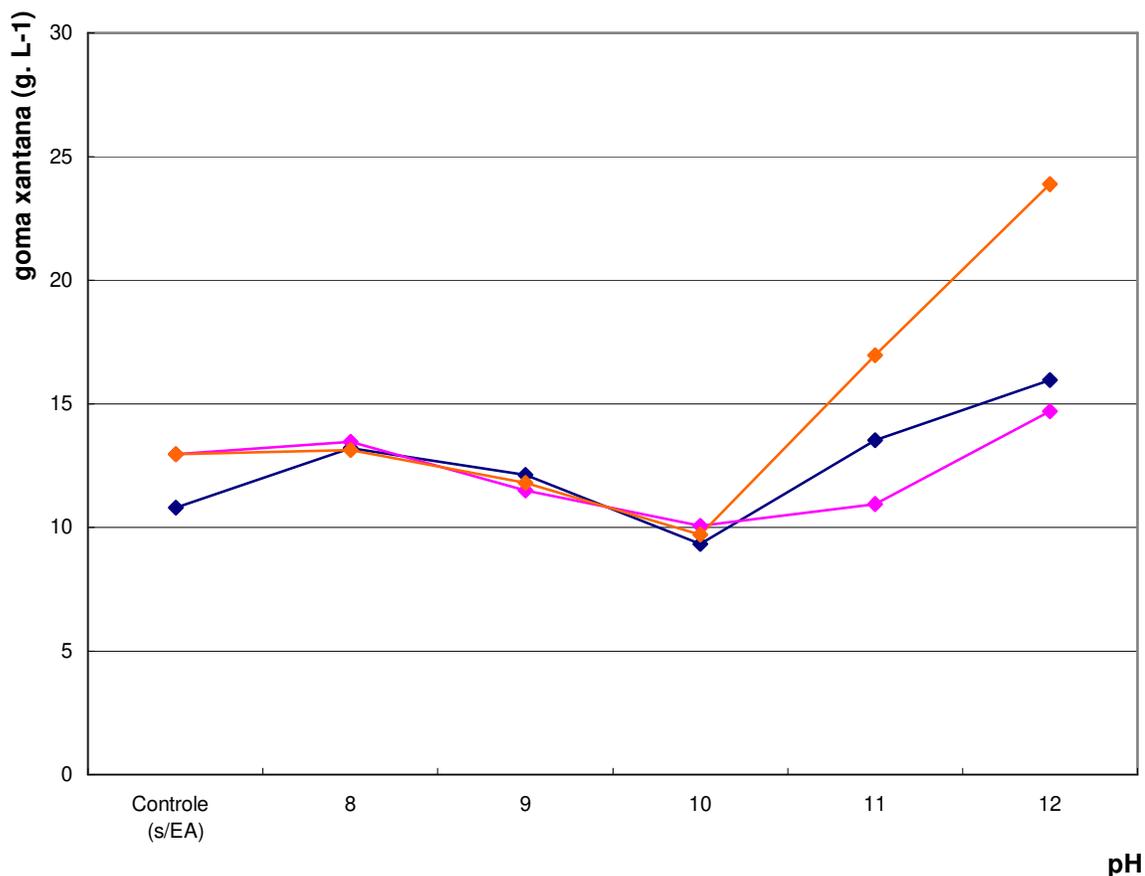


Figura 2-III: Produção de goma xantana para três fermentações nas mesmas condições de processo utilizando o *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 pelo processo convencional (controle-s/EA) e com “stress” alcalino em diferentes pH. Cada experimento foi realizado em triplicata.

Esse resultado é de suma importância, pois nos remete a não acreditarmos que o aumento de produção da goma foi devido à presença do álcali utilizado para alcançarmos o “stress” alcalino.

Estudos mostram que as soluções de goma xantana são não-Newtonianas, apresentam comportamento dependente do tempo e/ou da taxa de deformação e são fluidos altamente pseudoplásticos (PADILHA, 2003; CACIK et al., 2001; BUENO e GARCIA-CRUZ, 2001; KATZBAUER, 1998). Podemos verificar que após o processo de “stress” alcalino a goma obtida continua tendo comportamento pseudoplástico.

Comparando-se os diferentes tratamentos de “stress” alcalino podemos observar (Figura 3-III) que EA12 apresentou a maior produção de goma e menores viscosidades. Observou-se também, no EA10 a menor produção de goma e as maiores viscosidades para as taxas de deformação testadas.

Para a amostra 280-95 não submetida ao “stress” alcalino o valor de viscosidade encontrado para taxa de deformação de $10,5 \text{ s}^{-1}$ foi de $562,5 \text{ mPa.s}$, enquanto a amostra com o EA12, na mesma taxa de deformação apresenta viscosidade de 150 mPa.s . Podemos observar que a qualidade da goma obtida após o processo de EA12 é menor comparada à goma obtida sem o processo de “stress” alcalino.

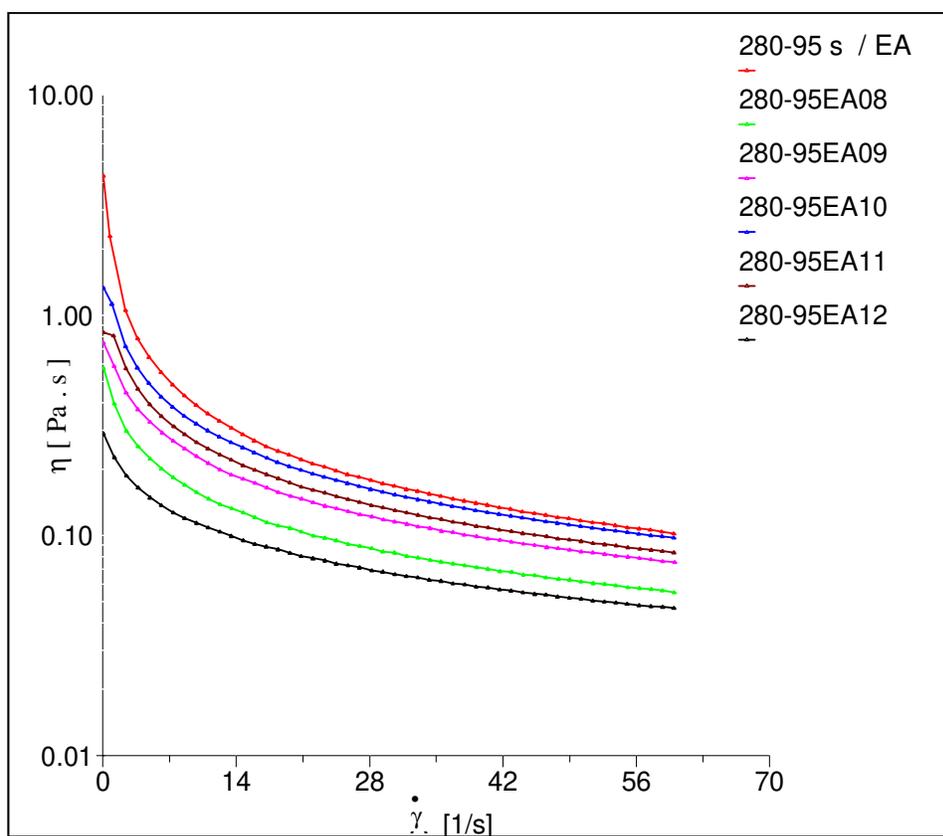


Figura 3-III: Viscosidade aparente (Pa.s) vs Taxa de deformação (s^{-1}), a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), obtidas pela linhagem 280-95, em diferentes pH de “stress” alcalino.

No estudo realizado por Rottava (2005), o valor de viscosidade aparente encontrado para a goma obtida a partir de *X. campestris* pv. *manihotis* 1182, foi de proximadamente 360 mPa.s, para taxa de deformação de $10,5 \text{ s}^{-1}$. As condições da análise reológica foram diferentes, sendo utilizada nesse estudo solução aquosa três vezes mais concentrada do que a utilizada em nosso estudo.

Borges (2003) realizou a caracterização de 30 cepas de *X. campestris* pv. *pruni*, utilizando condições para a avaliação da viscosidade semelhantes às utilizadas nesse estudo, com exceção da concentração das soluções, que foi de 3% (p/p) e apesar de utilizar o mesmo modelo de reômetro (HAAKE, RS150) utilizou o sistema placa-placa com sensor PP35Ti. Encontrou para taxa de deformação de 10 s^{-1} valores de viscosidade entre 12.700 mPa.s e 1.370 mPa.s. Para amostra de xantana comercial testada encontrou 3.400 mPa.s.

Foresti (2003) analisou a viscosidade aparente da solução aquosa a 3% (p/p) da xantana sintetizada pela cepa padrão NRRL B-1459 de *X. campestris* pv. *campestris*, atingindo 2.700 mPa.s numa taxa de deformação de 10 s^{-1} .

Nitschke e Thomas (1995), numa taxa de deformação de $12,5 \text{ s}^{-1}$, relataram que as soluções aquosas a 0,5% (p/p) dos polímeros sintetizados por cepas selvagens de *X. campestris*, variaram de 200 mPa.s para a cepa Cv2C8, até 641 mPa.s para a cepa C7.

Souza e Vendruscolo (1999), ao determinar a viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% de xantana produzidas por *X. campestris* pv. *pruni* cepas 24 e 58, analisadas em reômetro HAAKE CV 20, obtiveram aproximadamente 5.000 mPa.s e 300 mPa.s respectivamente numa taxa de deformação de 10 s^{-1} .

A goma xantana produzida por *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 apresentou as maiores viscosidades na faixa de taxa de deformação testada ($0 - 60 \text{ s}^{-1}$), atingindo viscosidade de 510 mPa . s para taxa de deformação de $10,5 \text{ s}^{-1}$, valor que ficou abaixo do que esperavamos para xantana comercial, porém devemos ressaltar que as amostras em questão não foram purificadas, o que prejudicou seu desempenho reológico.

Industrialmente existem muitos tipos de xantana com propriedade próprias para cada tipo de aplicação. Geralmente a xantana tipicamente utilizada em alimentos

apresenta viscosidade de 1400 mPa.s (solução de 1%, com adição de 1% de KCl, 60 rpm, 25°C, viscosímetro Brookfield LVF, spindle 3), já a xantana utilizada para outros fins industriais apresenta viscosidade de 850 mPa.s (60 rpm em 11 s^{-1}) (BRAUN e ROSEN, 2000; CPKELCO, 2001).

Na avaliação do tipo de álcali utilizado no “stress” alcalino, podemos observar através da Figura 4-III que o valor de viscosidade aparente encontrado para taxa de deformação de $10,5 \text{ s}^{-1}$ foi de 250,0 mPa.s para NaOH e 220,0 mPa.s para KOH. Apesar da produção de goma ser ligeiramente menor (ver Figura 5-III) comparado ao tratamento com KOH o tratamento com NaOH origina uma goma com viscosidade um pouco maior em baixas taxas de deformação.

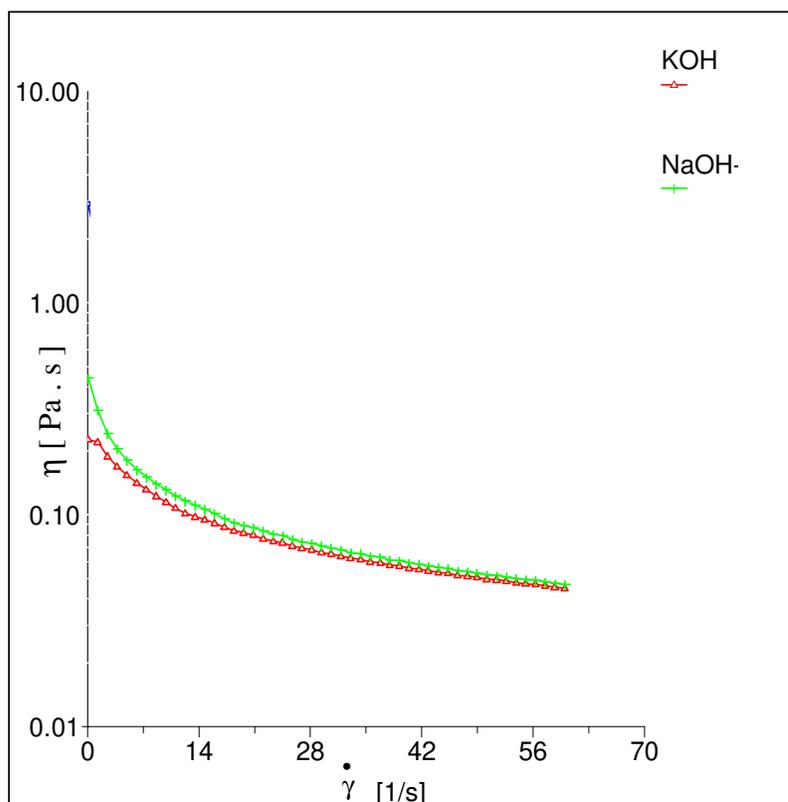


Figura 4-III: Viscosidade aparente (Pa.s) vs Taxa de deformação (s^{-1}), a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), obtidas pela linhagem 280-95 com EA12 utilizando KOH 2 N e utilizando NaOH 2N.

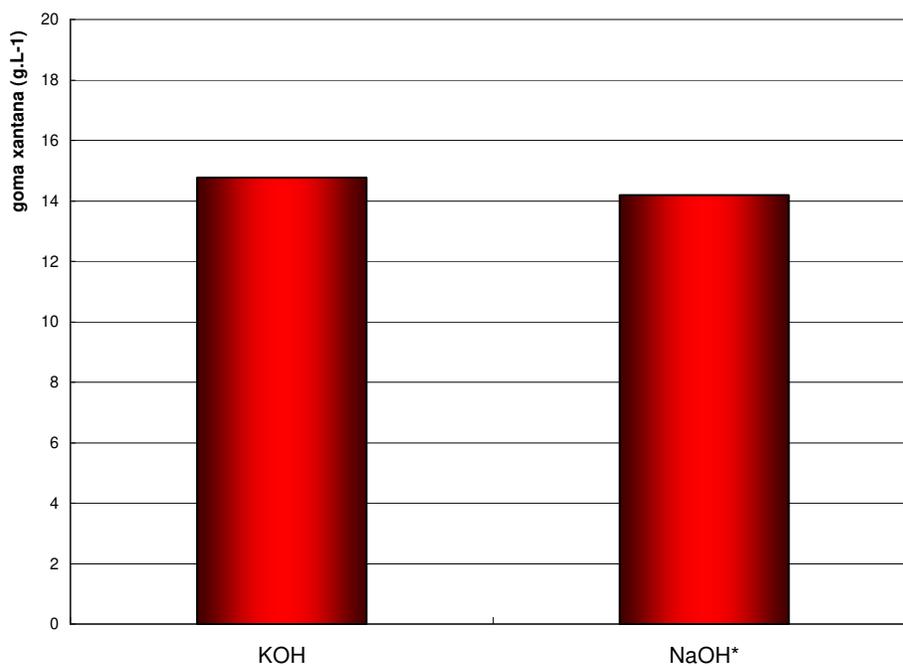


Figura 5-III: Produção de goma xantana (g.L⁻¹) para a avaliação do tipo de álcali utilizado no “stress” Alcalino. Nota: A amostra com * apresentou o melhor desempenho reológico.

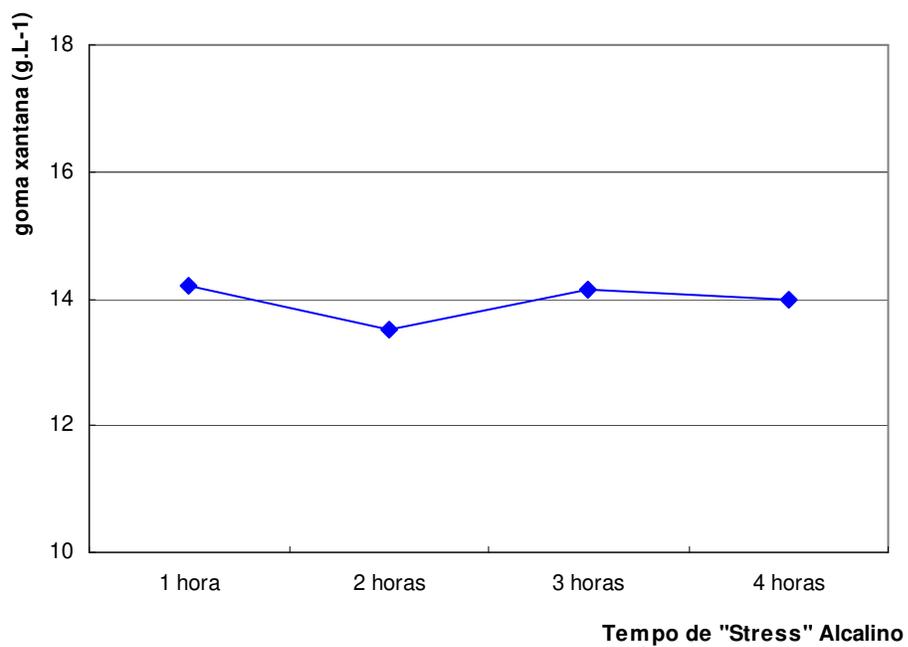


Figura 6-III: Produção de goma xantana (g.L⁻¹) para a avaliação do tempo de “stress” Alcalino.

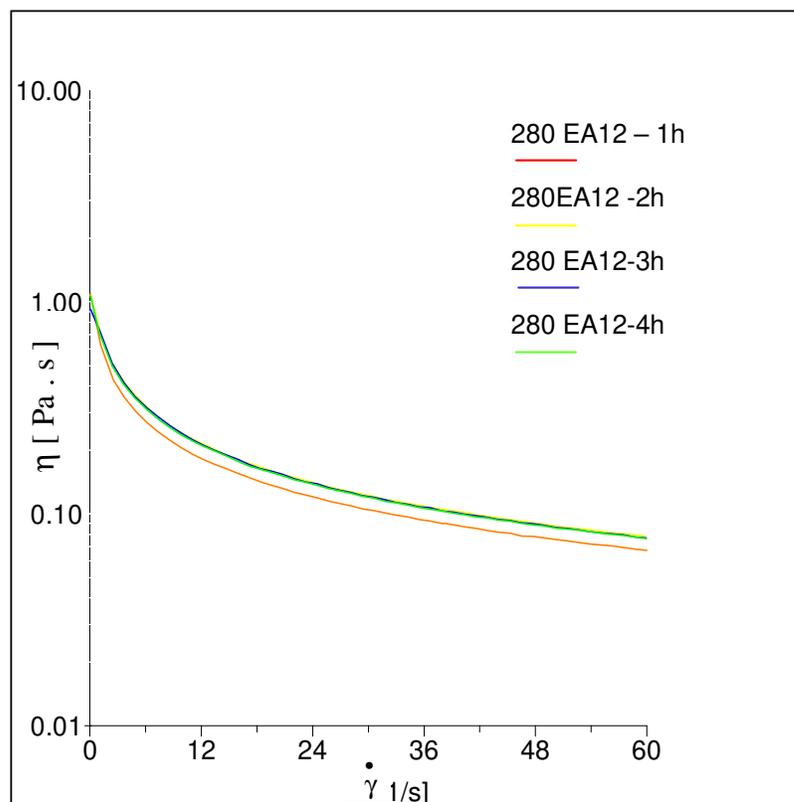


Figura 7-III: Viscosidade aparente (Pa.s) vs Taxa de deformação (s^{-1}), a $25^{\circ}C$ das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), obtidas pela linhagem 280-95 submetida a diferentes tempos de “stress” alcalino.

Observou-se através da Figura 6-III que a produção de goma xantana ($g.L^{-1}$) foi praticamente a mesma para 1 hora, 2 horas, 3 horas e 4 horas de “stress” alcalino.

Avaliando o comportamento reológico das gomas produzidas nos diferentes tempos de EA (Figura 7-III), podemos verificar que os valores de viscosidade, para taxa de deformação de $10,5 s^{-1}$, foi de 500,0 mPa.s para 2h, 3h e 4 h de EA e 420 mPa.s para 1h de EA, com diferença muito pequena de viscosidade na faixa de taxa de deformação testada ($0 - 60 s^{-1}$).

4 CONCLUSÃO

O “stress” alcalino aumentou em 40,76% a concentração de xantana obtida em relação ao processo convencional sem o “stress” alcalino.

O maior valor de produção de xantana foi atingido em “stress” alcalino com pH 12 (EA12), seguido do EA 11 e EA 08, utilizando NaOH.

A qualidade da goma obtida após o processo de EA12 é menor comparada à goma obtida sem o processo de “stress” alcalino.

Apesar da produção de goma ser ligeiramente menor utilizando NaOH esse álcali origina uma goma de melhor qualidade do que KOH.

A produção de goma xantana (g.L^{-1}) e as viscosidades aparentes das gomas, não foram afetadas nos diferentes tempos de “stress” alcalino (EA12) testados nesse estudo (1h, 2h, 3h e 4h).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANULLAH, A.; SERRANO, L.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnology. Progress*, v. 12, p. 466-473, 1996.

BAIOCCO, L. M. Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis*. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, p. 148, 1997.

BORGES, C. D. Caracterização da goma xantana em função das cepas de *X. campestris* pv. *pruni* e das condições operacionais. Dissertação (mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 98, 2003.

BRADBURY, J. F. Genus II: *Xanthomonas*. In: KRIEG N. R. HOLT, C. G., editores. *Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, M. D.: Williams & Wilkins, p. 199-210, 1984.

BRAUN, D. B.; ROSEN, M. R. Rheology Modifiers Handbook Practical Use and Application. Norwich:New York, p. 505, 2000.

BUENO, S. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. Journal of Food Engineering, v. 50, p. 41-46, 2001.

CACIK, F.; DONDO, R. G.; MARQUÉS, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. Computers and Chemical Engineering, v. 25, p. 409-418, 2001.

CADMUS, M. C.; KNUTSON, K. A.; LAGOTA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. Biotechnology Bioengineering, v. 20, p. 1003-1014, 1978.

CPKELCO Global leader in hydrocolloids. Xanthan gum book, CPKelco Asp: 8^a th edition, p. 28, 2001.

DIAZ, P. S. Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana. Dissertação (mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 65, 2002.

FORESTI, A. P. Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas* em meios modificados. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPEL, 2003.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnology Advances, v. 18, p. 549-579, 2000.

HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J.; HESSELTINE, C. W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. Applied Microbiology, v. 3, n. 6, p. 361-368, 1955.

IBSBF – Coleção de Cultura da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico de Campinas/SP-Brasil.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. Polymer Degradation and Stability, v. 59, p. 81 – 84, 1998.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *X. campestris*. World Journal of Microbiology e Biotechnology, v. 11, p. 502-504, 1995.

PADILHA, F. F. Produção de biopolímeros sintetizados por microorganismos. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, P. 210, 2003.

PAN, A.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *X. campestris* pv. *pruni* CEPA 06. Revista Brasileira de Agrociência, v. 6, n. 3, p. 273-277, 2000.

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia, v. 2, São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, p. 1031, 1981.

ROMEIRO, R. S. Bactérias Fitopatogênicas. Viçosa: UFV, p. 283, 2000.

ROTTAVA, I. Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana. Dissertação (mestrado), Departamento de Ciências Agrárias, URI, p. 79, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Contagem Total de microrganismo aeróbicos mesófilos/psicrotróficos e de bolores leveduras em placas. In: Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. Manual Técnico Nº14. Campinas: ed. ITAL, p. 21-29, 1995.

SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Nutricional studies on xanthan production by *X. campestris* NRRL B-1459. Applied and Environmental Microbiology, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, 1979.

SOUZA, A S.; VENDRUSCULO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv *pruni* CEPAS 24 e 28. Ciência e Engenharia, v. 8, n.2, p. 115-123, 1999.

ZHANG XUEWU; LIU XIN; GU DEXIANG; ZHOU WEI; XIE TONG; MO YONGHONG. Rheological models for xanthan gum. Journal of Food Engineering, v. 27, p. 203-209, 1996.

CAPÍTULO IV

Estudo da estrutura da goma xantana através de microscopia eletrônica de varredura e das ultraestruturas celulares em diferentes etapas da produção da goma e em diferentes tempos de “stress” alcalino através de microscopia eletrônica de transmissão

CAPÍTULO IV - Estudo da estrutura da goma xantana através de microscopia eletrônica de varredura e das ultraestruturas celulares em diferentes etapas da produção da goma e em diferentes tempos de “stress” alcalino através de microscopia eletrônica de transmissão

Resumo

A produção de goma xantana obtida da fermentação realizada em bioreator de 2 L utilizando o *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 280-95 foi maior após o processo de “stress” alcalino por 24 horas (EA24h). Obteve-se, ao final de 72 horas de fermentação, 9,43 g.L⁻¹ de goma xantana, e, após 24 horas de “stress” alcalino, a produção foi 74,8% maior (16,48 g.L⁻¹), porém a viscosidade aparente da amostra submetida ao EA12, independente do tempo de “stress” alcalino utilizado, foi menor comparada à da goma sem “stress” alcalino. No estudo das ultraestruturas foi possível visualizar cada passo dos processos e verificar que mesmo no inóculo puro observou-se também pequena produção de goma xantana próximo de algumas células. No final da fermentação (FF), observou-se o início de mudanças estruturais nas bactérias, como a vacuolização citoplasmática e a descontinuidade da membrana, o que pode sugerir um início no processo de lise bacteriana. Após o “stress” alcalino (EA12-1h), foram observadas acentuadas diferenças estruturais nas células bacterianas. O conteúdo citoplasmático das bactérias tornou-se mais vacuolizado e verificou-se descontinuidade nas membranas das células bacterianas, indicando o processo de lise bacteriana. A goma xantana que se apresentou agrupada em grumos adquiriu conformação organizada em círculos concêntricos.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris*, produção de xantana, “stress” alcalino, microscopia de transmissão, microscopia de varredura.

Study of xanthan gum structure through scanning electron microscopy (SEM) and ultrastructures at different stages of the production and at different times of alkaline stress through transmission electron microscopy (TEM)

Abstract

The xanthan gum obtained xantana of the fermentation accomplished in bioreactor of 2 L using *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* 280-95 was higher than the process of alkaline "stress" for 24 hours (EA24h). At the end of 72 hours of fermentation obtained 9,43 g.L⁻¹ of xanthan gum, and, after 24 hours of alkaline "stress", the production was 74,8% higher (16,48 g.L⁻¹). However, the apparent viscosity of the sample submitted to EA12, independent of the time of used alkaline "stress", was smaller than the one of the gum without alkaline "stress." Studying the ultrastructures it was possible to observe each step of the process and to verify that even in the pure inoculum, it also can be observed small production of xanthan gum close to some cells. At the end of the fermentation (FF), the beginning on structural changes was observed in the bacteria, such as the vacuum cytoplasm and the discontinuity of the membrane, which can suggest a beginning in the process of bacterial lysis. After the alkaline "stress" (EA12-1h), sharp (Márcia accentuated está errado mas o que colocar?) structural differences were observed in the bacterial cells. The content cytoplasm of the bacteria became more vacuumingand discontinuity was verified in the membranes of the bacterial cells, indicating the process of bacterial lysis. The xanthan gum presented in clots acquired organized conformation in concentric circles.

keyword: *Xanthomonas campestris*, xantana production, alkaline stress, transmission microscopia, sweeping microscopia.

1 INTRODUÇÃO

Vários patovares de *X. campestris*, particularmente, e outras espécies de *Xanthomonas*, produzem goma xantana. Por serem bactérias essencialmente fitopatogênicas, a produção de goma está relacionada com sua sobrevivência enquanto na superfície do vegetal hospedeiro, pois este é um ambiente inóspito à bactéria (RUDOLPH, 1993).

A goma xantana atualmente é o único polissacarídeo microbiano que vem sendo comercializado em grande escala (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND e KENNEDY, 1996; MEYER et al., 1993).

A goma xantana é um polissacarídeo de elevado interesse industrial, principalmente para as indústrias de alimentos, farmacêuticas e de petróleo. O interesse deve-se às suas propriedades físico-químicas, que superam todas as dos outros polissacarídeos disponíveis no mercado. Dentre estas propriedades, destacam-se a sua elevada viscosidade em baixas concentrações, bem como sua estabilidade em ampla faixa de temperatura e de pH, mesmo na presença de sais (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUTHERLAND & KENNEDY, 1996; MEYER et al., 1993).

O crescimento dos microrganismos e a produção de xantana são influenciados por fatores, tais como o tipo de bioreator usado, o modo de operação (batelada ou contínuo), a composição do meio, as condições da cultura (temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido) (CHI e ZHAO, 2003; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; NUSSINOVITCH, 1997).

Devido à grande aplicação da goma xantana e ao seu amplo mercado mundial, várias pesquisas vêm sendo feitas para otimizar a produção através da seleção de novas linhagens, de condições ótimas de crescimento celular, produção, recuperação e purificação desse polissacarídeo (ROTTAVA, 2005; BOZA, 2004; FUNAHASHI et al., 1987; KENNEDY et al., 1982).

Nas pesquisas relacionadas à produção desse polissacarídeo não são encontrados estudos sobre as mudanças na ultraestrutura das células, assim como a

disposição da goma em diferentes etapas da produção. Estudos dessa natureza são relevantes e podem levar a maior compreensão desse complexo processo.

O presente estudo teve como objetivos: avaliar o “stress” alcalino ao final do processo fermentativo de produção de goma xantana por *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, em bioreator de 2 L; verificar a concentração de açúcar residual, o crescimento celular, o rendimento de produção do biopolímero e a qualidade do biopolímero no processo de fermentação normal; investigar as mudanças na estrutura da goma xantana causadas pelo “stress” alcalino e as mudanças na ultraestrutura das células, assim como a disposição da goma em diferentes etapas da produção em diferentes tempos de “stress” alcalino.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foi utilizada a cultura liofilizada da bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 pertencentes à Coleção de Cultura da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico de Campinas/SP-Brasil.

2.2 Meios de cultura

Foram utilizados os meios YM padrão (Yeast-Malt) sólido e líquido descritos por HAYNES et al. (1955), o meio I (SOUW e DEMAIN, 1979) e o meio nutriente (PELCZAR, 1981).

O meio YM padrão (Yeast-Malt) foi constituído por (p/v): extrato de Levedura 0,3%, extrato de Malte 0,3%, Peptona 0,5%, Glicose 1,0% e Ágar (para o meio sólido) 2,5%.

O meio de fermentação (Meio MP-I), previamente testado, foi constituído por (p/v): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%, KH_2PO_4 0,5%, H_3BO_3 0,0006%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2%, $FeCl_3$

0,00024%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0002%, ZnSO_4 0,0002%, ácido cítrico 0,20% e sacarose 5%. O pH do Meio I foi ajustado para 7,0 com HCl 0,1 N e NaOH 0,1 N.

Os meios foram esterilizados em autoclave vertical marca Phoenix , modelo AV-75, a 121°C por 20 min. A sacarose foi esterilizada separadamente.

O meio nutriente foi constituído por (p/v): extrato de carne 0,3%, peptona 0,5% e NaCl 0,8%.

2.3 Procedimento de re-hidratação das culturas liofilizadas

As culturas estavam acondicionadas em ampolas de vidro, as quais foram quebradas em condições estéreis e colocadas no interior de tubos de ensaio estéreis com tampa rosqueável. Com pipeta de Pasteur foram adicionadas 6-8 gotas de meio nutriente às ampolas. Agitadas e incubadas a 28°C por 60 min. Transcorridos 60 min, as suspensões foram transferidas para placas contendo meio YM padrão sólido e incubadas a 28°C por 48 h (IBSBF, 2003).

As placas onde cresceram as bactérias oriundas da culturas liofilizada foram chamadas de placa mãe. A partir desta placa foi colhido material de uma colônia isolada e esse material foi repassado para outra placa contendo meio YM padrão sólido. Esse procedimento foi repetido três vezes em duplicata (placa chamada de placa para produção) antes de utilizamos cada um dos microrganismos para a produção do biopolímero.

2.4 Preservação e manutenção dos microrganismos

Para evitar possíveis perdas na viabilidade celular e ter maior segurança na manutenção das características das bactérias, estas foram estocadas a 4°C em tubos de ensaio contendo meio YM ágar inclinado, e cobertas por óleo mineral. Quando necessário, foram reativadas, transferidas para placas de Petri contendo meio YM e repassadas 3 vezes antes de serem utilizadas para nova produção de polímero. Segundo Cadmus et al. (1978), é de grande importância o controle da formação de

colônias variantes, que são pequenas e não gomosas e acarretam diminuição na produção de goma.

2.5 Inóculo

Foram preparados três erlemeyers de 250 mL (N° 4980, stopper n° 06, Pyrex, USA) com sistema de respiro, contendo cada um 50 mL de meio YM padrão, foi colocado em cada erlemeyer 10 alçadas padrão (alça de platina com 3,0 mm de diâmetro) da cultura bacteriana, crescida em placa de Petri contendo meio YM padrão sólido, após 48 horas à 28°C (placa de produção). Os erlenmeyers foram colocados em um Shaker Incubador (marca New Brunswick Scientific Co, modelo G27) e mantidos a uma temperatura de 28°C sob agitação de 250 rpm por 24 horas. Como inóculo para a fermentação foram utilizadas suspensões celulares com pelo menos $2,6 \times 10^9$ UFC/mL (PAN et al., 2000).

2.5.1 Contagem das células viáveis do inóculo

As amostras de cada inóculo foram submetidas a diluições decimais em série, transferindo-se 1 µL de inóculo para 9 µL de água sucessivamente até as diluições de 10^{-8} , 10^{-9} e 10^{-10} , transferindo-se 100 µL de amostra diluída para a superfície de placas contendo meio YM-sólido; as colônias foram contadas após 48 h a 28°C. Todos os testes de contagem foram feitos em duplicata. Os resultados foram expressos em Unidade Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) (SILVA e JUNQUEIRA, 1995).

2.6 Produção do biopolímero

Após 24h, esse material foi levado até uma capela de fluxo laminar da marca Tecnal modelo 115, onde foi transferido em condições estéreis para o copo do reator de 2L estéril contendo 1350 mL de meio de fermentação (Meio MP-I) e 3 gotas de Tween puro. O fermentador utilizado foi o MULTIGEN da marca New Brunswick de 2,0 L

regulado para fornecer uma taxa de fluxo de ar de $1,5 \text{ L ar.L}^{-1}$ de caldo.min (*bubble column*), mantido a uma temperatura de $28,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sob agitação de 500 rpm por 72 horas.

2.7 “Stress” alcalino

Após as 72 horas de fermentação, o copo do reator foi levado para uma capela de fluxo laminar, onde foi adicionado ao caldo fermentado hidróxido de sódio 10,0 N até atingir-se o pH 12,0. O controle foi feito com pHmetro à temperatura de 28°C . Foram retiradas amostras do caldo fermentado após 1 hora, 24 horas e 48 horas de “stress” alcalino. O processo (crescimento do inóculo, fermentação e “stress” alcalino) foi replicado duas vezes.

2.8 Amostragem

Para o controle da fermentação, foram retiradas amostras em intervalos de 8 horas. De cada um dos tempos de fermentação e “stress” alcalino foram realizadas análises de açúcares redutores totais, de contagem total, de pH, de produção de goma, de densidade óptica e de viscosidade aparente da solução aquosa da goma (1,0 % p/v).

2.9 Separação do biopolímero

O caldo fermentado foi centrifugado a $22.300 \times g$ em centrífuga, a 20°C por 15 min, para a separação da biomassa. Uma amostra do sobrenadante foi retirada para a análise de Açúcares Redutores Totais. Ao sobrenadante adicionou-se etanol (92,8°GL) na proporção de 4:1, para precipitação do biopolímero; a seguir o meio foi agitado por 5 min. Após esse tempo, a goma obtida foi recolhida em tela metálica, o material foi colocado em placa de Petri de vidro, congelado e liofilizado. O material foi pesado e triturado.

2.10 Métodos analíticos

2.10.1 Quantidade de goma xantana produzida

A goma liofilizada foi colocada em dessecador e pesada em balança analítica. A produção da goma xantana foi expressa em peso de goma (g) por volume de caldo precipitado (L).

2.10.2 Determinação do crescimento celular - Método indireto

O volume celular durante os ensaios de fermentação foi determinado através da leitura da absorbância a 565 nm em espectrofotômetro Beckman DU – 70.

As amostras retiradas durante as fermentações foram centrifugadas a 22.300 x g em centrífuga, a 5°C por 15 min. O sobrenadante foi armazenado a -15°C para posterior análise de açúcares redutores totais. As células foram ressuspensas três vezes em 5 mL de água milli-Q. A medida de absorbância a 565 nm em espectrofotômetro foi feita após a diluição de 1:10 desta suspensão celular com água milli-Q. Para a determinação da massa celular foi constituída uma curva padrão da absorbância em função da massa celular (AMANULLAH et al., 1996).

2.10.3 Determinação da concentração de açúcares redutores totais

Para a análise do teor de açúcares redutores totais foi empregado o método do DNS (MILLER, 1959). Como a sacarose usada no meio de cultura não é um açúcar redutor, foi feita a hidrólise ácida das amostras. Para a conversão do substrato em açúcares redutores, 1 mL de HCl 2,0 N foi adicionado a 1 mL do sobrenadante centrifugado, e levado para banho em ebulição por 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo (5 min), 1 mL de NaOH 2,0 N foi adicionado para neutralizar a amostra. Desta amostra hidrolisada, foi retirado 0,5 mL para análise de DNS.

A amostra então foi colocada em ebulição por 5 minutos e após resfriamento em banho de gelo; foram adicionados 8 mL de tartarato de sódio e potássio e realizada a leitura de absorvância 540 nm em espectrofotômetro.

O valor obtido da absorvância de cada amostra foi convertido em açúcares redutores totais, utilizando-se uma curva padrão de açúcares redutores O branco foi realizado substituindo-se a amostra hidrolisada por água destilada.

2.10.4 Qualidade da goma - Viscosidade aparente

O comportamento reológico das amostras obtidas foi avaliado através de um reômetro rotativo da marca Haaker, modelo RS 150, sendo utilizado o sensor tipo copo, modelo DG 41. A determinação da viscosidade das amostras foi realizada à temperatura de 25°C. As soluções aquosas foram preparadas na concentração de 1,0% (p/v) em água destilada, solubilizadas por agitação durante duas horas, seguido de aquecimento a 60°C por 20 min (DIAZ, 2002 e ZHANG XUEWU et al., 1996). Os parâmetros das análises reológicas foram: taxa de deformação aplicada entre 0,01 s⁻¹ e 60 s⁻¹, com fenda de 5100 mm e tempo de 300 seg. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.10.5 Preparação das amostras para CLAE

2.10.5.1 Purificação dos biopolímeros

As gomas foram dissolvidas em água destilada, e aquecida a 70 – 75°C por 15 min. Um volume de 50% (v/v) de TCA foi adicionado à solução aquecida, que foi então centrifugada a 13.000 x g por 5 minutos a 30°C. Ao sobrenadante foi adicionado acetona numa proporção de 4 mL de acetona para cada 1 mL de solução. Após, as gomas foram redissolvidas em água, precipitadas com acetona e secas a 50 – 55°C sob vácuo. A seguir, as amostras secas foram trituradas e novamente redissolvidas em água, e então dialisadas contra água destilada em membrana de diálise tubular Sigma

D – 9527 por 48 horas a 4°C sob agitação constante. As amostras foram congeladas e liofilizadas.

2.10.5.2 Hidrólise dos biopolímeros

As amostras (5 mg) foram hidrolisadas com ácido trifluoracético (TFA) 1M (500 µL) por 16 h a 100°C. Após a hidrólise, as amostras foram secas com nitrogênio e ressuspensas em 500 µL de água milli-Q, filtradas através de membranas millipore 0,45 µm e armazenada em vials a 4°C até a realização da análise (DRUZIAN, 2000 modificado).

2.10.5.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

As amostras das gomas purificadas foram analisadas quanto à sua composição química de ácidos por CLAE. Os padrões utilizados foram: ácido glucurônico, ácido pirúvico e ácido galacturônico (Sigma, USA).

As condições de análise para ácidos foram as seguintes: fase móvel – ácido perclórico pH 1,9; fluxo de 0,6 mL/min; temperatura do forno de 80°C; pressão de 72Kgf/cm²; detector Arranjo de diodos; coluna: Shim-pack SCR-101H polyestyrene-divinylbenzene (Shimadzu, Japão) (DRUZIAN, 2000).

2.10.6 Preparação das amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi realizado o estudo da estrutura da goma xantana em amostras de goma em pó sem “stress” alcalino (s/EA) e com “stress” alcalino a pH 12 por 1 hora.

As amostras de gomas foram primeiramente fixadas em uma solução contendo tampão cacodilato de sódio pH 7,4 0,1M, glutaraldeído a 25% e ácido tânico, o qual permaneceu “overnight”, e a seguir foram fixadas em tetróxido de ósmio, permanecendo em contato com o ósmio por 2 horas. Entre o primeiro e o segundo fixador e após o

segundo fixador, os “pellet”s foram lavados três vezes com tampão cacodilato de sódio pH 7,4. Após fixar as amostras, foi preciso desidratá-las com a adição de soluções de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e etanol puro, deixando o “pellet” aproximadamente 20 min em cada concentração. Utilizando-se o equipamento Balzers CPD 030, atingiu-se o ponto crítico, a partir do qual foi possível fixar as amostras aos “stubs” e levá-las para o banho de ouro em um Sputter Balzers 5 CD 050. A leitura foi feita a 15 kV em microscópio eletrônico de varredura JSM 5800 LV JEOL (SANTI-GADELHA et al., 2006; MERCER e BIRBECK, 1972).

2.10.7 Preparação das amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras coletadas para a realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão foram as seguintes:

- Inóculo puro (IP)
- Início da fermentação (IF)
- Final da fermentação (FF) (após as 72 horas de fermentação)
- “stress” alcalino por 1h, 24h e 48h - Após as 72 horas de fermentação, o copo do reator foi levado para uma capela de fluxo laminar, onde foi utilizado o hidróxido de sódio 10,0 N para obter um “stress” alcalino de pH 12,0 no meio. Foi retirado material após 1 hora (EA1h), 24 horas (EA24h) e 48 horas (EA48h).

As amostras foram retiradas nos seus devidos tempos em função do curso da fermentação e armazenadas a 4°C. A seguir as amostras foram centrifugadas a 12.200 x g por 5 minutos à temperatura ambiente, e ressuspendidas em água milli-Q, agitadas e novamente centrifugadas a 12.200 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. Esse procedimento foi repetido três vezes, originando o “pellet”. A seguir os “pellet”s foram fixados em uma solução contendo tampão cacodilato de sódio pH 7,4, 0,1 M, glutaraldeído a 25% e ácido tânico. Os “pellets” permaneceram nesta solução “overnight”, após foram transferidos para uma solução de tetróxido de ósmio, permanecendo em contato com o ósmio por 2 horas. Entre o primeiro e o segundo fixador e após o segundo fixador, os “pellet”s foram lavados três vezes com tampão

cacodilato de sódio. Após a fixação as amostras foram desidratadas com sucessivas lavagens em soluções de etanol, etanol puro, óxido de propileno e etanol puro na proporção de 1:1, e somente óxido de propileno. O “pellet” permaneceu aproximadamente 20 min em cada solução, com exceção do óxido de propileno. A resina ao óxido de propileno (1:1) foi deixada no rotor durante 2 h, o óxido foi retirado e colocado à resina pura, os tubos foram deixados “overnight” no rotor com o eppendorf tampado. Após inclusão, polimerizamos a 60°C durante 48h. O material foi cortado no ultramicrótomo LEICA ULTRA CUT e observado em Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906 Carl Zeiss, com magnificação entre 2.156 e 27.800 (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2006; JOHANNESSEN, 1978; MERCER e BIRBECK, 1972).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Processo fermentativo e de “stress” alcalino

A fermentação foi conduzida por 72 horas em bioreator de 2L e o “stress” alcalino (EA) foi efetuado sob pH 12,0 empregando-se NaOH como reagente alcalinizante em tempos de “stress” alcalino de 1 h, 24 h e 48 h de duração.

Como podemos verificar na Figura 1-IV, ao final de 72 horas de fermentação foram obtidas 9,4 g.L⁻¹ de goma xantana. Observamos que, após 1 hora de “stress” alcalino, foram obtidas 11,8 g.L⁻¹ de goma xantana; produção 25,7% maior do que o resultado obtido no final da fermentação. Após 24 horas de “stress” alcalino, a quantidade de biopolímero por litro de meio fermentado aumentou para 16,5 g.L⁻¹ caracterizando aumento de 74,8% na produção de goma xantana em relação ao processo convencional sem o “stress” alcalino, caindo para 14,2 g.L⁻¹ após 48 horas de “stress” alcalino.

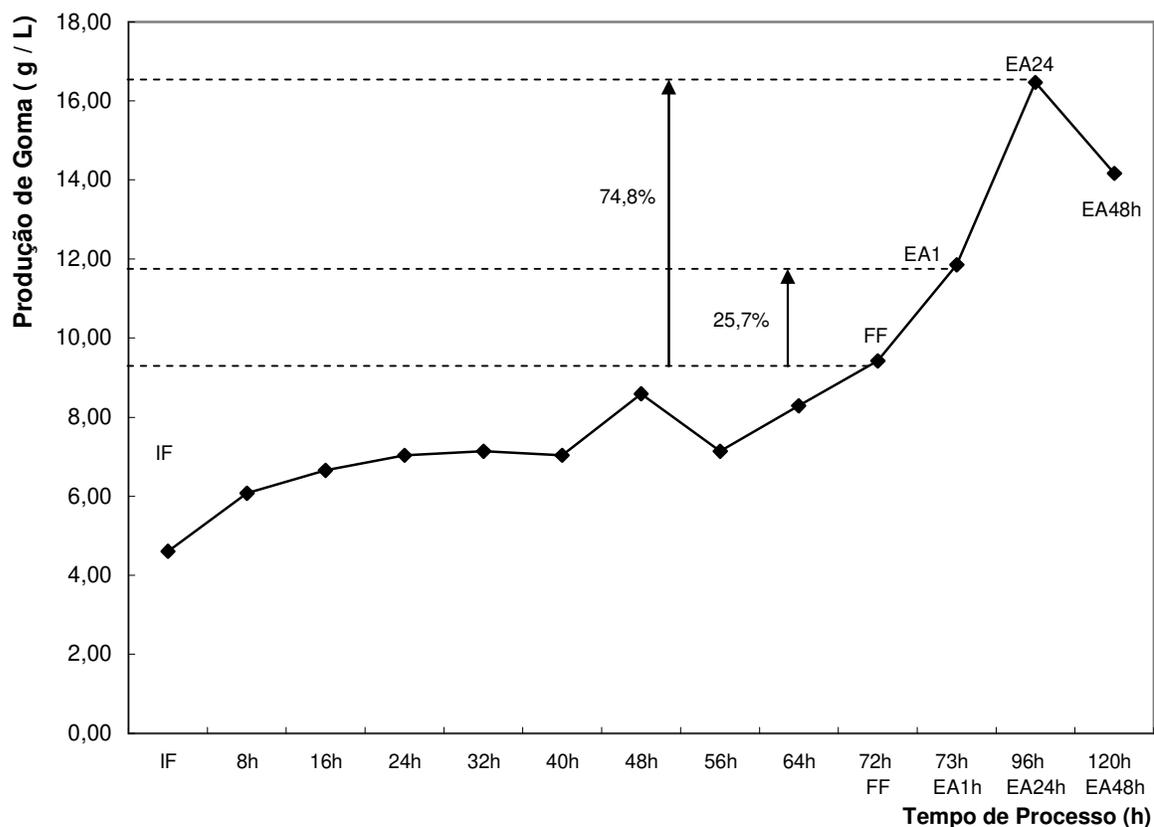


Figura 1-IV: Efeito do tempo de fermentação e do tempo de “stress” alcalino utilizando o *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 na produção de goma xantana (g.L^{-1}). Os valores apresentados são valores médios de duas fermentações.

Comparando os resultados encontrados nesse estudo com resultados de outros pesquisadores, observamos que o maior valor de produção de goma atingido, que foi $16,5 \text{ g.L}^{-1}$, não tem grande destaque, porém esse estudo deixa claro que o “stress” alcalino aumenta a quantidade do biopolímero obtido.

É bastante difícil comparar os resultados de produção de goma xantana entre autores, pois o resultado varia em função das linhagens utilizadas, da composição dos meios, das condições de processo e das condições em que foram testadas. Entretanto podemos ter idéia através do trabalho de revisão de García-Ochoa et al. (2000), onde encontramos uma revisão dos resultados de vários autores, mostrando os rendimentos de goma xantana. As concentrações de goma xantana e os tempos de fermentação em

diferentes tipos de bioreatores variou de 14,0 g.L⁻¹ a 30 g.L⁻¹, para 72 horas de fermentação utilizando um reator do tipo tanque agitado.

No trabalho de Gupte e Kamat (1997) utilizando *X. campestris* ICa-125, o melhor resultado para o rendimento foi 21,3 g.L⁻¹. É possível encontrar na literatura produção de quantidades maiores; cujos estudos têm em comum a utilização de melaço como fonte de carbono. No trabalho de Kalogiannis et al. (2003), em que o melaço foi utilizado como fonte de carbono em uma fermentação com o *X. campestris* ATCC 1395, o valor de produção de goma xantana está entre os maiores já relatados em meio industrial ou laboratorial. O resultado desse estudo foi uma produção de goma xantana de 53 g.L⁻¹. Entretanto, Abd El Salam et al. (1994) relatou produção de goma xantana mais alta (70 g.L⁻¹) usando melaço de cana de açúcar com concentração inicial de açúcar relativamente alta (25%). Abdel-Hadi (2002) obteve através de fermentação com *X. campestris* NRRL-B-1459 concentração de 40 g.L⁻¹ utilizando pré-tratamento com melaço de cana-de-açúcar e licor de milho.

Amanullah et al. (1996) obtiveram rendimentos de 30 g.L⁻¹ a 35 g.L⁻¹ para fermentações realizadas com *X. campestris* NRRL B-1459, em fermentadores de 14 L, 20 L e 150 L após 40 h, 80 h e 60 h, respectivamente.

No estudo realizado por Rottava (2005), *X. campestris* pv. *manihotis* 1182, *X. campestris* pv. *campestris* 1078 e 729, o autor obteve produções de goma de 7,97 g.L⁻¹.h⁻¹, 9,60 g.L⁻¹.h⁻¹ e 8,16 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, em fermentação realizada em frasco.

No estudo de Rottava (2005), para a incubação de *X. campestris* pv. *manihotis* 1182, foi utilizado o meio YM a 28°C ± 2°C. O autor encontrou, ao final do período de crescimento, 1,3 g.L⁻¹ de xantana. Para *X. campestris* pv. *campestris* linhagens N° 254 e 729 foram encontrados valores ainda maiores, 2,5 g.L⁻¹ e 2,1 g.L⁻¹, respectivamente.

Podemos verificar, através da Figura 2-IV, que no início da fermentação a concentração de goma era de 4,6 g.L⁻¹, indicando que houve produção de goma durante o período de crescimento (o número inicial de células no inóculo foi de 3,0 x

10^{10} UFC/mL). Segundo Pan et al. (2000), o número de células iniciais no inóculo tem influência sobre a produção e a qualidade da goma produzida por *X. campestris* pv. *pruni* linhagem 06 seu estudo mostra que a produção de goma xantana, assim como a viscosidade da solução obtida foram maiores nos ensaios onde o número inicial de células estava entre $2,6 \times 10^9$ UFC/mL e $2,6 \times 10^{10}$ UFC/mL.

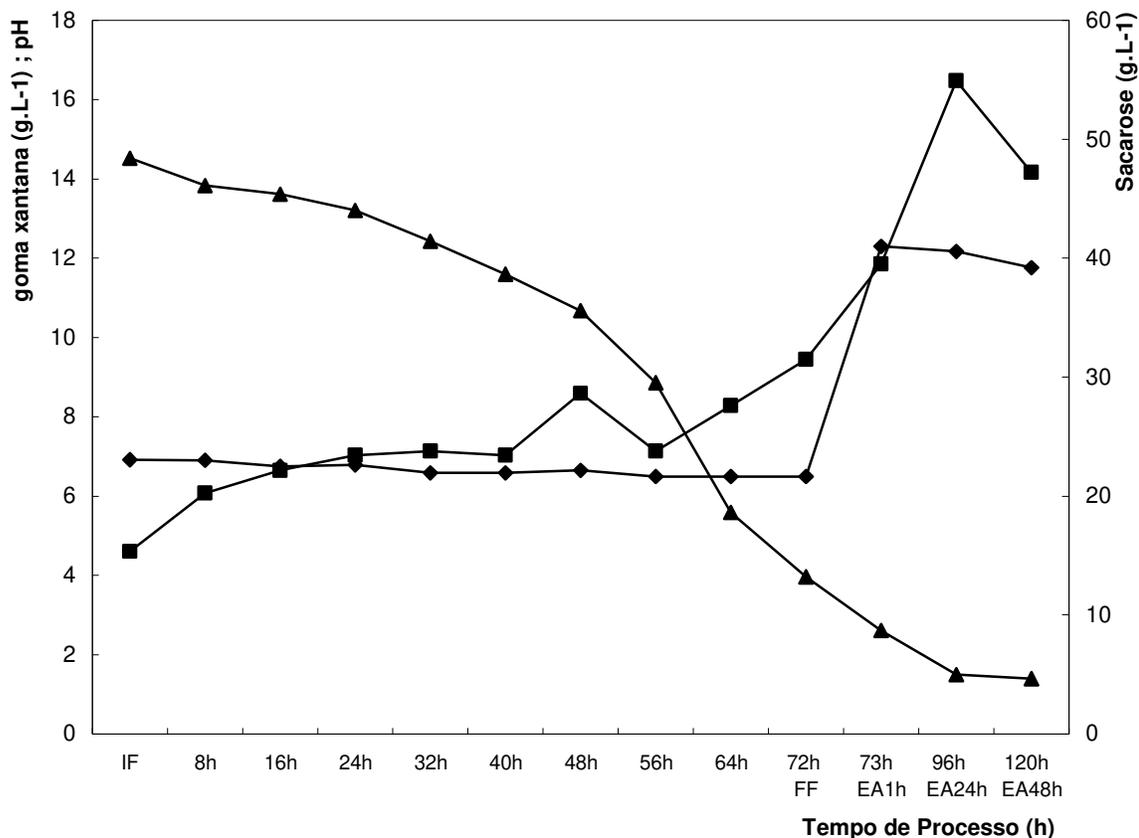


Figura 2-IV: Efeito do tempo de fermentação e do tempo de “stress” alcalino utilizando o *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 na produção de goma xantana (g.L⁻¹) ■; no pH ◆ e na concentração de sacarose (g.L⁻¹) ▲.

Ashtaputre e Shah (1995), estudando a produção de polissacarídeo a partir de *Sphingomonas paucimobilis* GS1, observaram que quase 75% do produto final foi obtido durante a fase de crescimento exponencial, sendo o restante acumulado durante a fase estacionária, mostrando que a produção de biopolímero produzida por *Sphingomonas paucimobilis* GS1 está relacionada a fase de crescimento.

Casas et al. (2000) observaram que para a goma xantana há produção parcialmente associada ao crescimento celular, sendo que a produção de xantana diminui quando o crescimento e a concentração de biomassa diminuem.

O comportamento do pH durante a produção de xantana por *X. campestris* depende sempre da cepa e da composição do meio. Muitos autores concordam com a afirmativa de que o pH neutro é o melhor valor para o crescimento do *X. campestris*.

Na Figura 2-IV podemos observar que o pH do experimento em estudo apresentou uma leve diminuição, caindo do pH 6,9 para o pH 6,5. Resultado semelhante ao encontrado por García-Ochoa et al. (1996). É esperado que, durante a fermentação, o pH do meio caia, em função da formação de metabólitos ácidos e da própria goma xantana, que possui grupos ácidos presentes em sua estrutura (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES et al., 1997; MORAINÉ E ROGOVIN, 1971).

No estudo de Torrestiana et al. (1990), os valores de pH dos caldos no final da fermentação variaram de 5,20 – 6,30 para seis diferentes linhagens de *X. campestris* testadas. Os autores acreditam ser possível que diferentes valores de pH dos caldos no final da fermentação sejam devidos a diferenças fisiológicas entre as cepas ou a distintas composições do polímero obtido.

O estudo de García-Ochoa et al. (1996), mostrou que o controle de pH acentua o crescimento celular, porém não tem efeito sob a produção de goma xantana. Quando o pH é controlado, a produção cessa uma vez que a fase estacionária de crescimento seja atingida e este efeito é independente do álcali usado para o controle do pH. Quando o pH não é controlado, a produção de goma continua durante a fase estacionária de crescimento celular.

Apesar da velocidade de agitação utilizada em nosso estudo ter sido de 500 rpm, não se verificou o mesmo resultado encontrado por Papagianni et al. (2001). Utilizando *X. campestris* ATCC 1395 em bioreator de 2L (volume de trabalho de 1L), os autores encontraram aumento do pH com o tempo de fermentação, de pH inicial 7,0

para valores ao redor de pH 9,0 quando a velocidade de agitação ficou entre 100 e 400 rpm, e pH 9,5 quando a velocidade de agitação foi igual a 600 rpm.

Na Figura 3-IV, observa-se aumento acentuado da densidade ótica (565 nm) até 32 horas de fermentação e valores relativamente constante até 56 horas de fermentação. O aumento da densidade ótica ocorreu em função do aumento do número total de células, células viáveis e não viáveis; porém observou-se que, após 56 horas, a curva de DO começou a cair; apesar de não ocorreu diminuição no total de células. No precipitado obtido para lavagem e posterior leitura da DO, não estavam todas as células da amostra que foi retirada do meio fermentado; apesar de a goma xantana presente no meio estar solúvel, ocorre aumento da viscosidade, o que pode ter impedido a total separação das células presentes. A utilidade dos dados fornecidos por esse método para determinação do crescimento celular não é muito clara, porém merece um estudo mais aprofundado; uma possibilidade seria poder determinar quando deve ser aumentada a velocidade de agitação do meio fermentado, o que pode impedir ou reduzir a queda no crescimento celular e produção do biopolímero, pela diminuição do fornecimento de oxigênio e nutrientes para as células.

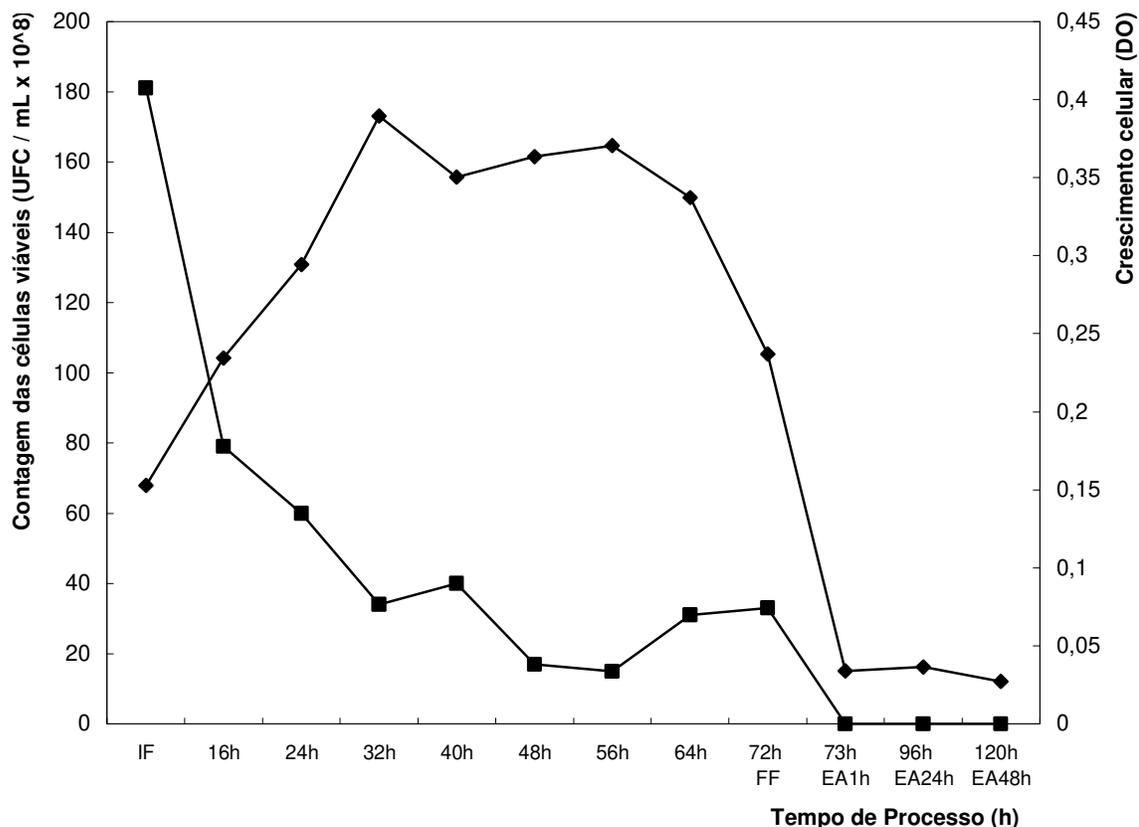


Figura 3-IV: Efeito do tempo de fermentação e do tempo de “stress” alcalino utilizando *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 na contagem de células viáveis (UFC/mL x 10⁹) ■ e no crescimento celular utilizando densidade ótica ◆.

No estudo realizado por Rottava (2005), no qual foram utilizadas 10 linhagens do gênero *Xanthomonas* sp, foi observado nas curvas de crescimento celular (DO) que, em sete diferentes linhagens de *X. campestris*, a fase log ocorreu entre 16 e 40 horas de crescimento.

Podemos observar através da Figura 3-IV que o valor de unidades formadoras de colônias de meio fermentado caiu abruptamente nas primeiras 16 horas de fermentação, e continuou caindo até o fim da fermentação (72 h), porém com uma inclinação menos acentuada.

Nitschke e Thomas (1995) também encontraram comportamento semelhante para a curva de contagem de células viáveis. Segundo os autores, um decréscimo inicial acentuado no número de células viáveis reflete a adaptação dos microrganismos ao meio de produção do biopolímero. O inóculo foi produzido em meio YM que tem alta concentração de nutrientes, enquanto o meio de produção tem baixa concentração de nutrientes e muitos sais, o que dificulta a sobrevivência das bactérias (SUTHERLAND, 1972).

Conforme podemos observar na Figura 4-IV as soluções aquosas a 1% preparadas a partir das gomas xantanas obtidas da fermentação convencional (sem “stress” alcalino) e com o processo de “stress” alcalino por 1 h, 24 h e 48 h apresentaram comportamento de fluido pseudoplástico, como era esperado para as soluções aquosas de goma xantana (ROTTAVA, 2005; PADILHA, 2003; CACIK et al., 2001; BUENO e GARCIA-CRUZ, 2001; KATZBAUER, 1998; NITSCHKE et al., 1997; SANDFORD e BAIRD, 1983).

Para a amostra não submetida ao “stress” alcalino, o valor de viscosidade encontrado para taxa de deformação de $10,5 \text{ s}^{-1}$ foi de 550 mPa.s, enquanto para as amostras submetidas ao EA12 por 1h, 2h, 3h e 4h, na mesma taxa de deformação, o valor de viscosidade foi de 200 mPa.s. Podemos observar que a qualidade da goma obtida após o processo de EA12 é menor comparada à da goma obtida sem o processo de “stress” alcalino. Observamos também que os tempos de EA testados não influenciaram na qualidade da goma obtida.

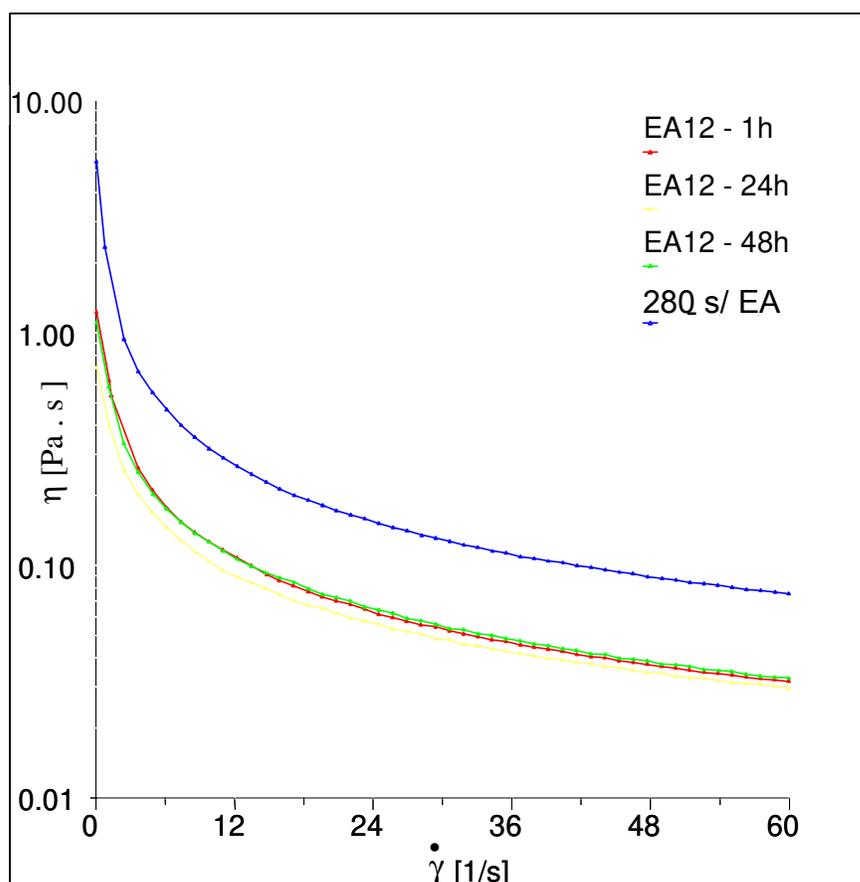


Figura 4-IV: Viscosidade aparente (Pa.s) vs Taxa de deformação (s^{-1}), a 25°C das soluções de goma xantana (1,0 % p/v), amostras: sem EA12, com EA12 por 1 h, com EA12 por 24 h e com EA12 por 48 h.

No estudo realizado por Rottava (2005), o valor de viscosidade aparente encontrado para a goma obtida a partir do *X. campestris* pv. *manihotis* 1182, para taxa de deformação de $10,5 s^{-1}$, foi de aproximadamente 360 mPa.s. As condições da análise reológica foram diferentes, sendo utilizada nesse estudo uma solução aquosa três vezes mais concentrada do que a utilizada em nosso estudo, viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, spindle 18 a 25°C.

Borges (2003) analisou a viscosidade aparente de 30 cepas de *X. campestris* pv. *pruni* em condições semelhantes às utilizadas neste estudo, com exceção da concentração das soluções, que foi de 3% (p/p) (HAAKE, RS150, sistema placa-placa

com sensor PP35Ti). O autor obteve para uma taxa de deformação de 10 s^{-1} valores de viscosidade entre 1.370 mPa.s. e 12.700 mPa.s.

Foresti (2003) analisou a viscosidade aparente da solução aquosa a 3% (p/p) de xantana sintetizada pela cepa padrão NRRL B-1459 de *X. campestris* pv. *campestris*, obtendo 2.700 mPa.s em taxa de deformação de 10 s^{-1} .

Nitschke e Thomas (1995) relataram que as soluções aquosas a 0,5% (p/p) dos polímeros sintetizados por cepas selvagens de *X. campestris*, para taxa de deformação de $12,5 \text{ s}^{-1}$, variaram de 200 mPa.s para a cepa Cv2C8, até 641 mPa.s para a cepa C7.

Souza e Vendrusculo (1999), ao determinar a viscosidade aparente das soluções de xantana produzidas por *X. campestris* pv. *pruni* cepas 24 e 58, obtiveram aproximadamente 5.000 mPa.s e 300 mPa.s, respectivamente, taxa de deformação de 10 s^{-1} .

Os valores de viscosidade aparente encontrados para as amostras testadas nesse estudo ficaram abaixo do valor esperado para amostra de goma xantana comercial, porém é preciso considerar a não purificação das gomas obtidas e também a não adição de sais para melhorar as propriedades reológicas das gomas comerciais.

3.2 Composição de ácidos

Observa-se nas Figuras 5-IV e 6-IV que ambas as amostras de goma xantana, sem e com o “stress” alcalino (EA12), apresentam em suas composições ácido glucurônico, ácido galacturônico e ácido pirúvico (ver Anexos 1 e 2). A goma xantana com “stress” alcalino apresentou maior concentração de todos os três ácidos utilizados, tendo destaque o ácido pirúvico, com concentração 2,75 vezes maior. O cromatograma ainda mostra claramente um outro pico com Rf em torno de 11,3 min, pode-se intuir em função da composição deste biopolímero que o pico com Rf 11,3 seja o pico referente ao ácido acético.

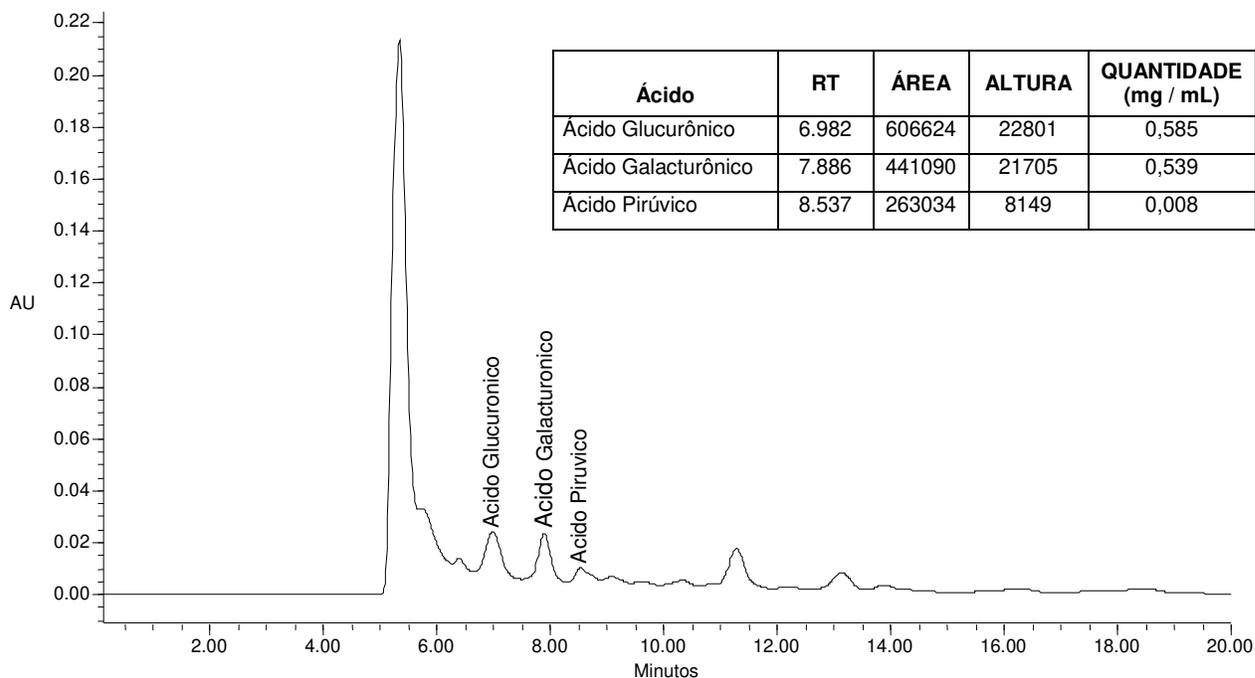


Figura 5-IV: Cromatograma da análise de composição de ácidos da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 sem “stress” alcalino.

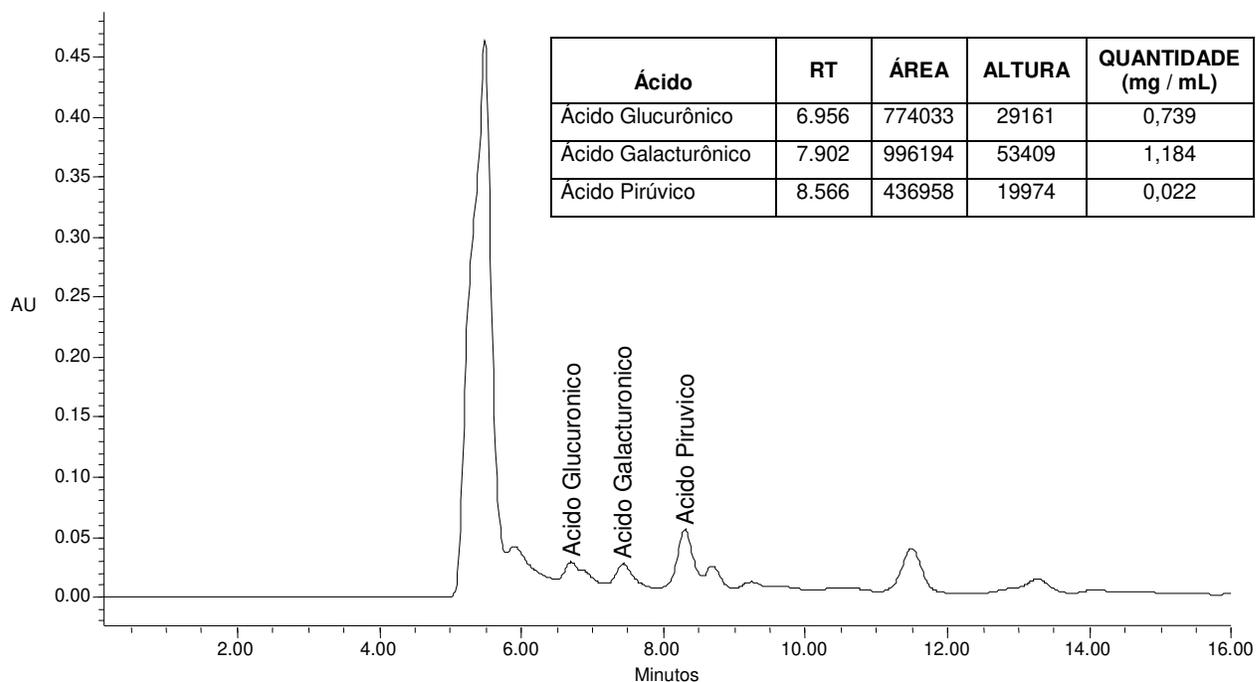


Figura 6-IV: Cromatograma da análise de composição de ácidos da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 com “stress” alcalino.

Diferenças na estrutura da xantana tendem a ocorrer principalmente devido a mudanças nas concentrações de piruvato e acetato (MORRIS, 1984; SUTHERLAND, 1981).

Segundo Callet et al. (1987) e Casas et al. (2000), o nível de substituição de ácido pirúvico e acético na molécula podem variar com as condições de crescimento da bactéria, condições operacionais, procedimentos pós-fermentação e também com a espécie de *Xanthomonas* utilizada.

Os resíduos de ácido pirúvico representam aproximadamente 60% da molécula e atribuem à goma muitas de suas propriedades singulares, como sua extraordinária resistência à hidrólise (MELTON et al., 1976; KOVAC e KANG, 1977 *apud* NUSSINOVITCH, 1997).

A goma xantana com um alto nível de acetilação e, especialmente, grau de piruvatação, aumenta a viscosidade das soluções aquosas porque associações intermoleculares são favorecidas (TAKO e NAKAMURA, 1984). Entretanto, a xantana livre de piruvato é mais adequada para a preparação de soluções de controle de mobilidade, usadas em processos de recuperação de óleo (KANG e PETTIT, 1993).

Autores como Cadmus et al. (1978), Tako e Nakamura (1984) sugerem que o conteúdo de ácido pirúvico possa ser usado como um índice de qualidade da goma xantana. Torrestiana et al. (1990), por sua vez, encontraram uma correlação muito baixa ($r^2 < 0,5$) entre o conteúdo de ácido pirúvico e a viscosidade. No estudo realizado por De Vuyst e Vermiere (1994), a adição de citrato causou aumento no conteúdo de piruvato na goma xantana, com decréscimos concomitantes na viscosidade.

3.3 Análise da estrutura das gomas com e sem “stress alcalino”

Observou-se através das Figuras 7-IV e 8-IV que as estruturas físicas dessas gomas são comprovadamente diferentes. A goma sem “stress” alcalino apresenta estrutura poligonal enquanto a goma com “stress” alcalino apresenta estrutura em forma de estrela.

O processo de “stress” alcalino alterou completamente a estrutura da goma xantana obtida, que não mais apresentou as formas poligonais antes observadas.

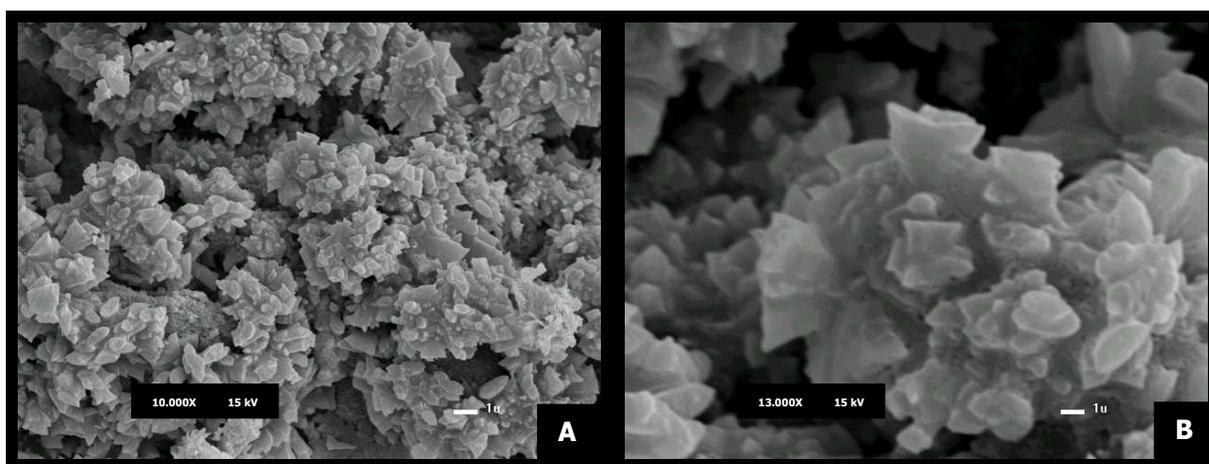


Figura 7-IV: Microscopia eletrônica de varredura da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 sem “stress” alcalino, utilizando uma tensão de 15 kv. A) com aumento de 10.000X e B) com aumento de 13.000X.

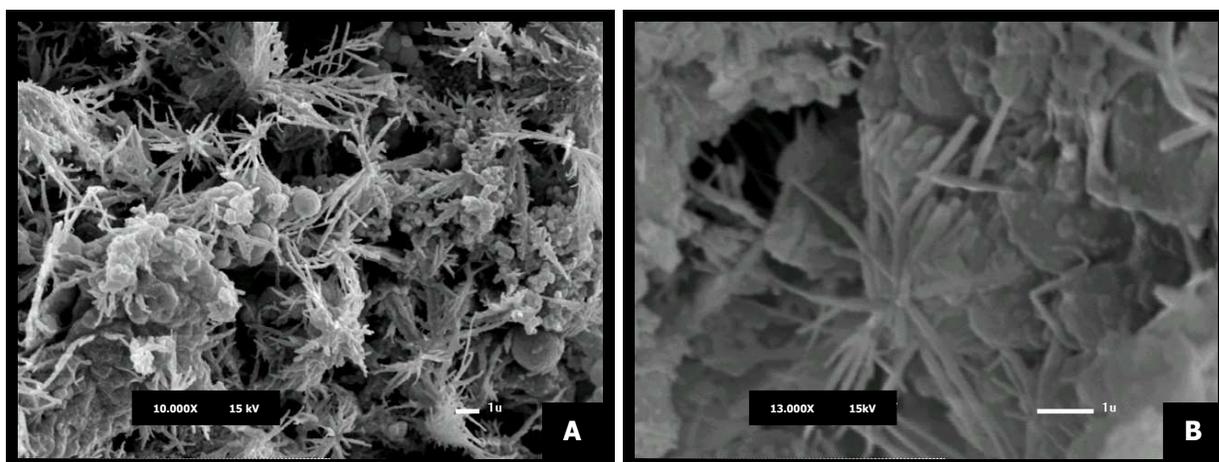


Figura 8-IV: Microscopia eletrônica de varredura da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 com 1 hora de “stress” alcalino, utilizando uma tensão de 15 kv. A) com aumento de 10.000X e B) com aumento de 13.000X.

3.4 Análise das ultraestruturas

Era esperado não se detectar goma xantana nas fotos de microscopia eletrônica de transmissão, porém estudos relatam que, durante a separação da biomassa, parte da goma xantana presente é co-precipitada junto com a biomassa, devido à presença de cátions divalentes e polivalentes, especialmente cálcio, que é abundante em alguns tipos de meios, como os contendo melaço de cana de açúcar. Cátions polivalentes tais como o cálcio, o alumínio e os sais de amônio quaternário são especialmente efetivos na precipitação da goma xantana devido à ligação iônica do grupo ionizado do cátion com o polissacarídeo polianiónico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Comparado aos outros polissacarídeos usados como aditivos alimentícios, a goma xantana tem mostrado ser o que mais fortemente se liga ao cálcio (DEBON e TESTER, 2001). Por esse motivo pesquisadores sugerem suplementações com solução

de KCl, usado na precipitação da biomassa com EDTA, que resulta em melhor solubilidade da goma xantana (KALOGIANNIS et al., 2003).

As células observadas na Figura 9-IV apresentam características de células do *Xanthomonas*. As células do *Xanthomonas* ocorrem como bastonetes, porém nos ultracortes histológicos realizados no ultramicrotomo, a bactéria pode aparecer em corte longitudinal, corte sagital e corte transversal. As células da *Xanthomonas* apresentam de 0,4 – 0,7 µm de largura e de 0,7 – 1,8 µm de comprimento (BRADBURY, 1984).

3.4.1 Resultado do inóculo puro (IP)

Verifica-se através da Figura 9-IV que a membrana externa e as estruturas citoplasmáticas das células bacterianas encontram-se íntegras. Não foi observada lise bacteriana, indicando viabilidade das células presentes no inóculo puro. Podemos ver células em plena divisão celular, através de uma bifurcação seguida de alongamento no meio da célula.

Observou-se também pequena produção de goma xantana próximo de algumas células. Durante o período de inoculação ocorre o aumento da concentração celular, e pouca quantidade de goma é produzida. A goma ao redor da célula impede o transporte de nutrientes e estende a fase lag de crescimento (PONS et al., 1990; PONS et al., 1989; DE VUYST et al., 1987; CADMUS et al., 1978).

Segundo Baiocco (1997), a bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* 280, cultivada em meio YM líquido a 30°C e 200 rpm, teve fase lag curta, passando rapidamente para a fase de crescimento exponencial, com seu ápice em 24 h de cultivo.

Aumentar a velocidade de agitação durante o período de crescimento pode ser uma alternativa para evitar que a goma formada fique ao redor da célula.

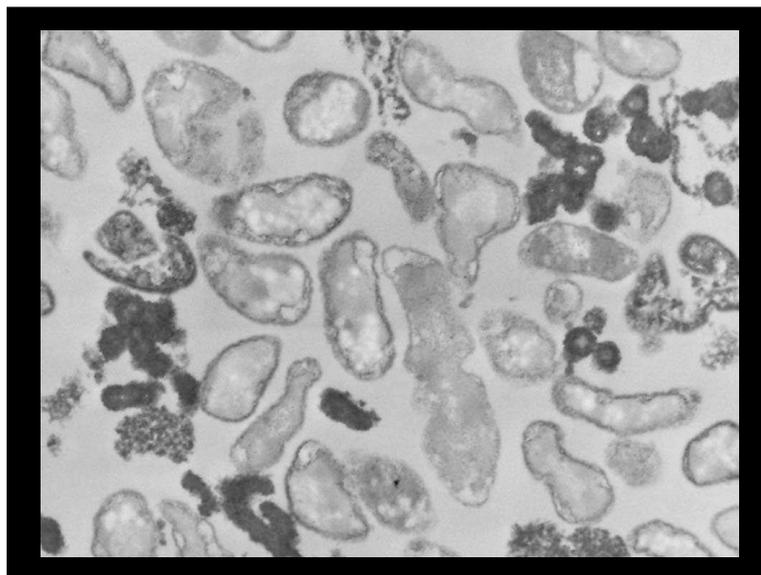


Figura 9-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do inóculo puro, utilizando magnificação de 12930 e tensão de U 60 — 0,93 μm .

A agitação e aeração têm por objetivo fornecer oxigênio aos microrganismos, para que possam exercer suas atividades metabólicas e também para mantê-los em suspensão. Além disso, a agitação não apenas é importante na produção de células, mas também tem influência na formação do produto, sendo por isso essencial o controle da agitação (PAPAGIANNI et al., 2001).

Papagianni et al. (2001) observaram que o aumento do nível de agitação resulta em maior produção de goma xantana. No estudo em questão, a produção de xantana quase dobrou quando a velocidade de agitação foi aumentada de 100 para 600 rpm, com efeito similar no crescimento celular.

Ao elevar a velocidade de agitação, maior parece ser o esforço da bactéria em proteger-se e por esse motivo produz maior quantidade de goma.

3.4.2 Resultado do início da fermentação (IF)

No início da fermentação observou-se que as células bacterianas estavam íntegras (Figura 10A-IV), indicando que o início do processo fermentativo de produção da goma xantana está como o esperado.

Na Figura 10A-IV pudemos observar nitidamente grande quantidade de goma formando-se ao redor das células bacterianas.

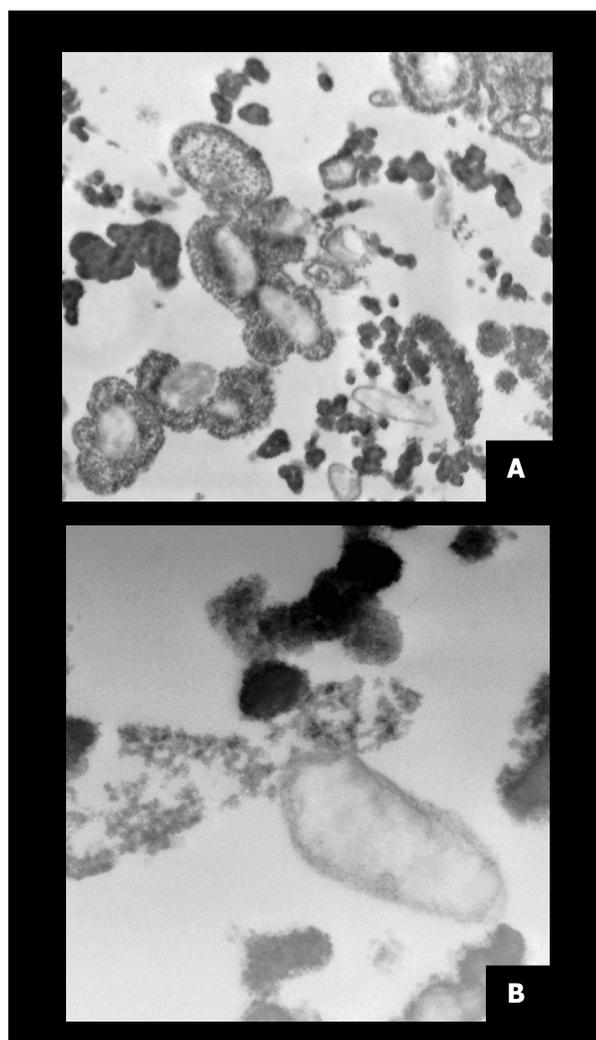


Figura 10-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do início da fermentação, utilizando: A) magnificação de 6000 e tensão de U 60, — 2,01 μm , e B) magnificação de 12930 e tensão de U 60, — 0,93 μm .

Como a composição do meio fermentativo (Meio I) contém muitos sais; acredita-se que por esse motivo a goma xantana que se apresentava ao redor das bactérias comece a distanciar-se ao longo do tempo de fermentação (ver Figura 10A-IV e 10B), provavelmente devido à mudança na osmolaridade.

Os polissacarídeos extracelulares podem ser classificados em dois tipos, dependendo de sua organização com relação à célula microbiana: (I) polímeros fisicamente anexos à célula microbiana em forma de cápsulas; (II) polímeros excretados pela célula microbiana como lama solta no meio. Segundo Kennedy e Bradshaw (1984), a goma xantana é do segundo tipo de polissacarídeo extracelular. Os resultados desse trabalho nos levam a rever essa classificação, com constatação de que, dependendo das condições do meio onde a bactéria se encontra, a goma xantana poderia ser classificada como do tipo (I) ou do tipo (II).

3.4.3 Resultado do final da fermentação (FF)

Observa-se através da Figura 11-IV o início de mudanças estruturais nas bactérias, como a vacuolização citoplasmática e a descontinuidade da membrana, podendo sugerir o início no processo de lise bacteriana.

Nessa etapa, devido ao prolongado tempo de fermentação de 72 horas, com osmolaridade diferente daquela que seria a osmolaridade ideal ao crescimento bacteriano, o comportamento da goma é diferente, apresentando-se em grumos e não mais ao redor das bactérias.

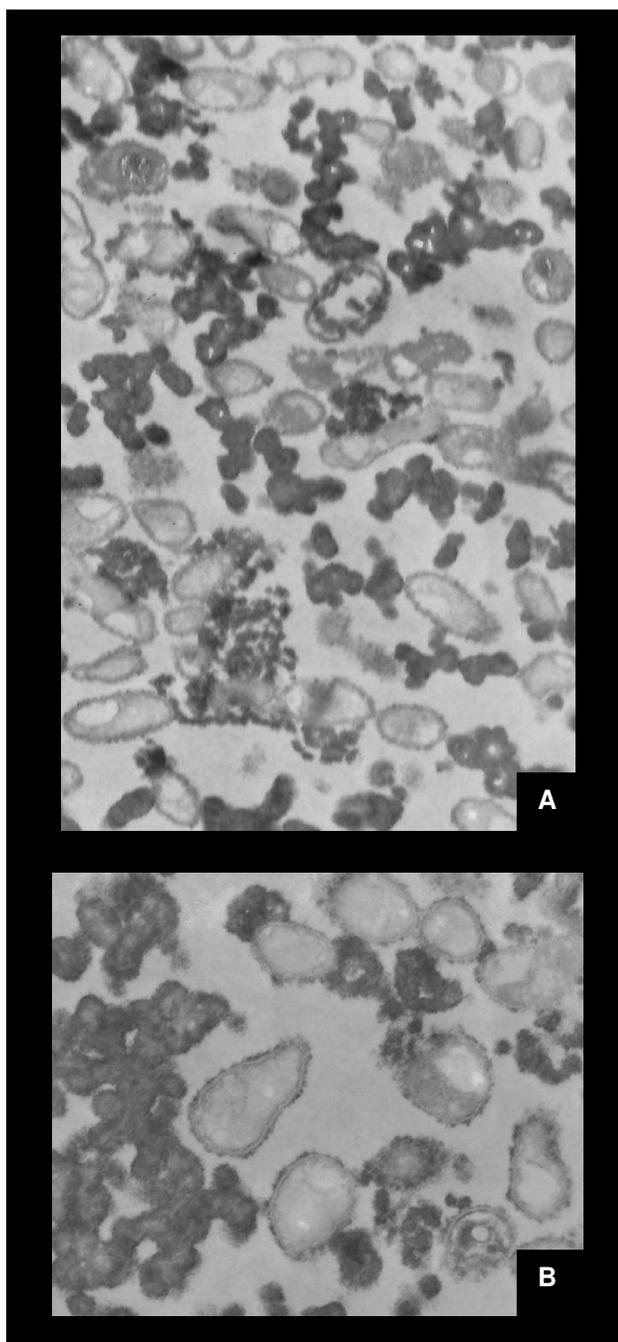


Figura 11-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do final da fermentação, utilizando: A) magnificação de 7750 e tensão de U 60 — 1,56 μm , e B) magnificação de 16700 e tensão de U 60 — 0,72 μm .

3.4.4 Resultado do “stress” alcalino após 1 h (EA 1h)

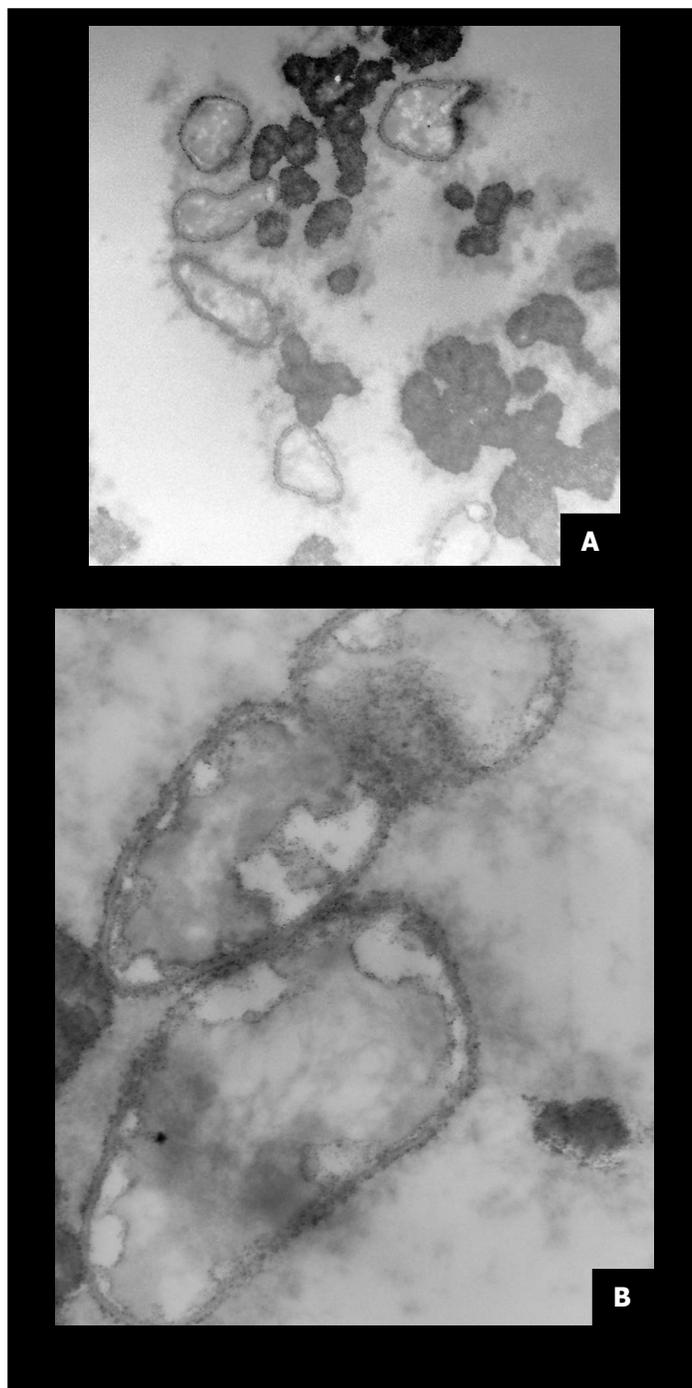


Figura 12-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 1 hora, utilizando: A) magnificação de 12930 e U 60 — 0,93 μm , B) magnificação de 27800 e tensão de U 60 — 435 nm.

O processo de “stress” alcalino consiste na elevação do pH para 12,0 (EA12). Após 1 hora de EA12, observamos acentuadas diferenças estruturais nas células bacterianas. Observa-se através da Figura 12-IV que o conteúdo citoplasmático das bactérias está mais vacuolizado e também que existe descontinuidade nas membranas das células bacterianas, indicando o processo de lise bacteriana.

Através de imagem mais distante (Figura 13-IV) podemos verificar a presença de algumas células bacterianas, porém com diminuição considerável na quantidade de células. Na Figura 3-IV podemos verificar que as células presentes não são viáveis.

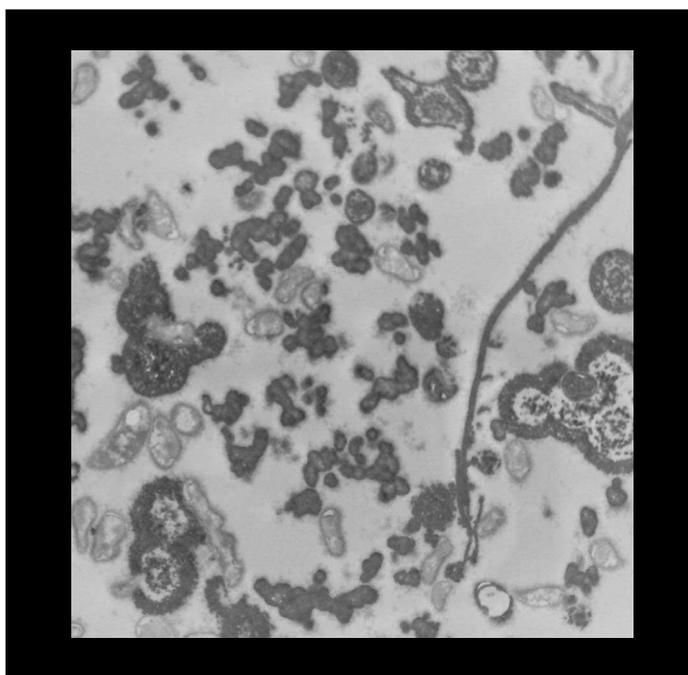


Figura 13-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 1 hora, utilizando magnificação de 6000 e U 60 — 2,01 μm .

A goma xantana que antes se apresentava agrupada em grumos, agora adquire conformação organizada, lembrando interações do tipo hidrofóbicas (Figura 14-IV). Em nenhuma das etapas anteriores observou-se essas linhas de goma que se organizam em círculos concêntricos.

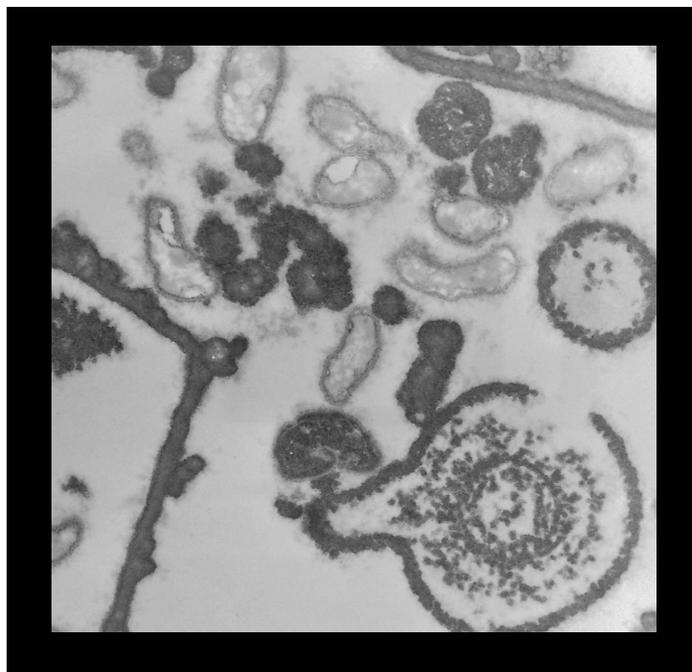


Figura 14-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 1 hora, utilizando magnificação de 12930 e U 60 — 0,93 μm .

3.4.5 Resultado do “stress” alcalino após 24h (EA24h)

Na Figura 15-IV não foi observado células da bactéria *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95, evidenciando a total desintegração das membranas bacterianas (ver Figura 3-IV).

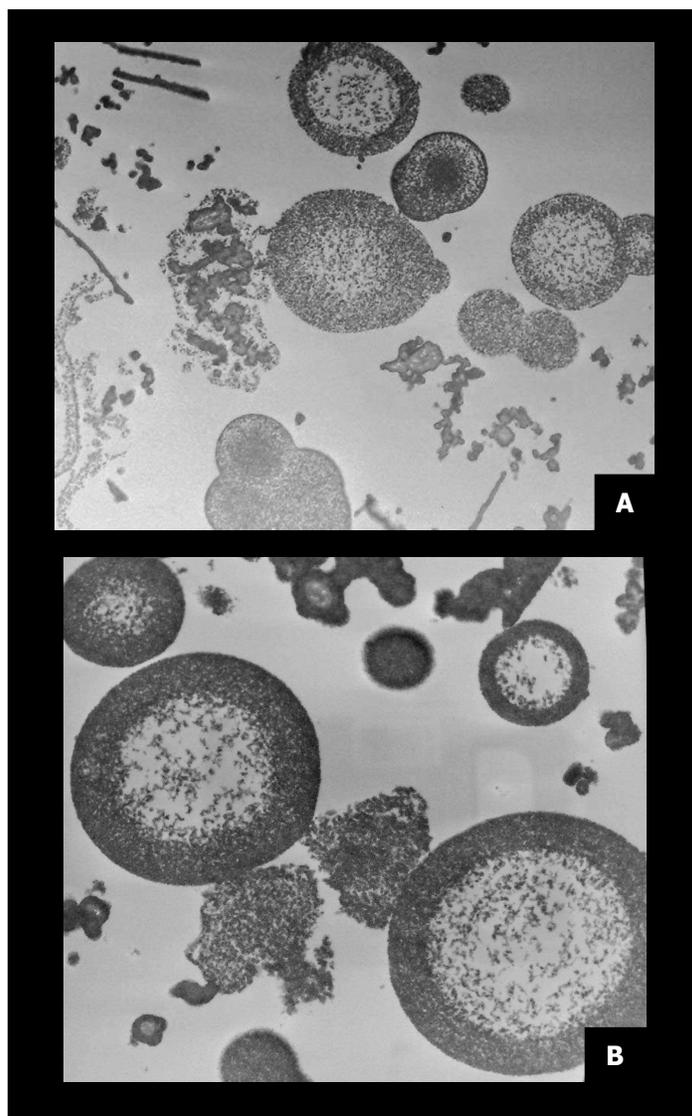


Figura 15-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 24 horas obtidas através da técnica de MET, utilizando: A) magnificação de 4646 e tensão de U 60 — 2,60 μm, B) magnificação de 10000 e tensão de U 60, — 1,21 μm.

A goma após 24 horas de “stress” alcalino apresentou-se em uma conformação mais organizada do que após 1 hora de EA; da mesma forma apresenta-se em círculos concêntricos, lembrando interações do tipo hidrofóbicas (Figura 15-IV).

A presença de ácidos acético e pirúvico na molécula de xantana produz um tipo de polissacarídeo aniônico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; NUSSINOVITCH, 1997; WHISTLER e BeMILLER, 1993; KENNEDY e BRADSHAW, 1984; SANDFORD e BAIRD, 1983). Acredita-se que, quando esse biopolímero é colocado em meio de alta alcalinidade, primeiro ocorra a neutralização de suas cargas, abrindo as estruturas, e a seguir iniciando um processo de repulsão eletrostático devido à presença de muitos grupos de mesma carga, semelhante às repulsões que geram as interações do tipo hidrofóbicas.

3.4.6 Resultado do “stress” alcalino após 48h (EA48h)

Após 48 horas de “stress” alcalino, verificou-se um estado praticamente igual ao obtido após 24 horas de EA (Figura 16-IV).

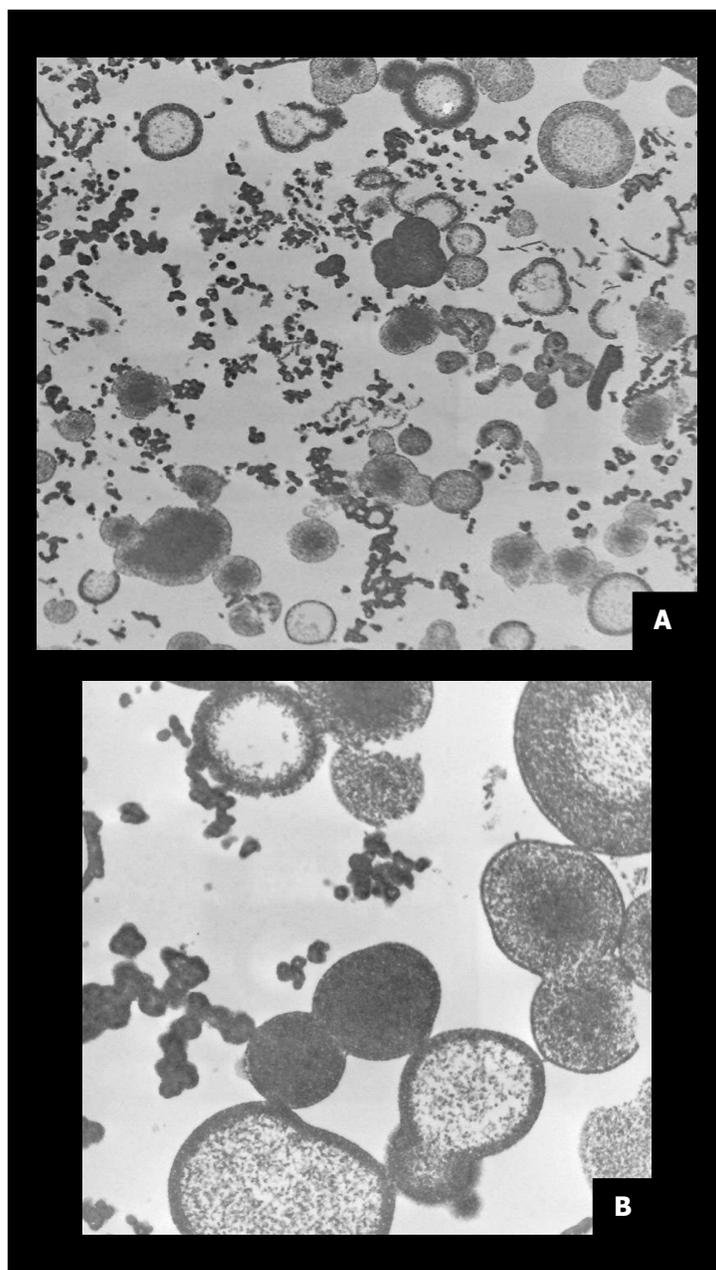


Figura 16-IV: Microscopia eletrônica de transmissão do “stress” alcalino com duração de 24 hora obtidas através da técnica de MET, utilizando: A) magnificação de 2156 e tensão de U 60 — 5,6 μm , B) magnificação de 7750 e tensão de U 60 — 1,56 μm .

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a produção de goma xantana obtida da fermentação realizada em bioreator de 2 L utilizando o *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 é maior após o processo de “stress” alcalino por 24 horas. Obteve-se ao final de 72 horas de fermentação 9,43 g.L⁻¹ de goma xantana, após 1 hora de “stress” alcalino a produção aumentou 25,7% (11,85 g.L⁻¹); após 24 horas de “stress” alcalino a produção foi 74,8% maior (16,48 g.L⁻¹) apresentando leve queda após 48 horas de “stress” alcalino (14,16 g.L⁻¹).

A viscosidade aparente da amostra não submetida ao “stress” alcalino foi de 550 mPa.s; para as submetidas ao EA12, independente do tempo de “stress” alcalino utilizado, a viscosidade encontrada foi de 200 mPa.s, para uma taxa de deformação de 10,5 s⁻¹. Concluímos que a qualidade da goma obtida por processo de “stress” alcalino (pH 12) é menor.

As estruturas físicas das gomas sem EA12 e com EA12 são comprovadamente diferentes. A goma sem “stress” alcalino apresenta estrutura poligonal, enquanto a goma com “stress” alcalino apresenta estrutura em forma de estrela.

Durante a separação e lavagem da biomassa, para a obtenção do “pellet”, por centrifugação a 12.200 x g por 5 minutos à temperatura ambiente, parte da goma xantana presente foi co-precipitada junto com a biomassa.

No Inóculo puro (IP), não foi observada lise bacteriana, indicando viabilidade das células presentes. Observou-se também uma pequena produção de goma xantana próximo de algumas células.

No início da fermentação (IF), observou-se que as células bacterianas estavam íntegras, e pôde-se observar nitidamente grande quantidade de goma se formando ao redor das células bacterianas.

No final da fermentação (FF), observou-se o início de mudanças estruturais nas bactérias, como a vacuolização citoplasmática e a descontinuidade da membrana, podendo sugerir um início no processo de lise bacteriana.

Após 1 hora de “stress” alcalino (EA12-1h), observamos acentuadas diferenças estruturais nas células bacterianas. O conteúdo citoplasmático das bactérias tornou-se mais vacuolizado e ocorreu descontinuidade nas membranas das células bacterianas, indicando o processo de lise bacteriana.

Através da análise de Contagem Total, foi verificado que as células presentes após o “stress” alcalino, seja de 1, 24 ou 48 horas, não são mais viáveis.

Após 1 hora de “stress” alcalino (EA1h), a goma xantana que antes se apresentava agrupada em grumos, adquiriu uma conformação organizada em círculos concêntricos.

Após 24h e 48 h de “stress” alcalino observou-se a total desintegração das estruturas celulares e organização do material em círculos concêntricos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HADI, M. A. Bioconversion of pretreated molasses into Xanthan gum. *Egyptian-Journal of Microbiology*, v. 37, n. 1, p. 89-99, 2002.

ABD EL SALAM, M. H.; FADEL, M. A.; MURAD, H. A. Bioconversion of sugarcane molasse into xanthan gum. *Journal Biotechnology*, v. 33, p. 103-106, 1994.

AMANULLAH, A.; SERRANO, L.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnology Progress.*, v. 12, p. 466-473, 1996.

ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Shingomonas paucimobilis* GS1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 3, p. 1159-1162, 1995.

BAIOCCO, L. M. Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *X. campestris* pv. *manihotis*. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, p. 148, 1997.

BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* culture. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1201-1209, 2004.

BORGES, C. D. Caracterização da goma xantana em função das cepas de *X. campestris* pv. *pruni* e das condições operacionais. Dissertação (mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 98, 2003.

BRADBURY, J. F. Genus II: Xanthomonas. In: KRIEG N. R. HOLT, C. G., editores. *Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, M. D.: Williams & Wilkins, p. 199-210, 1984.

BUENO, S. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. *Journal of Food Engineering*, v. 50, p. 41-46, 2001.

CACIK, F.; DONDO, R. G.; MARQUÉS, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. *Computers and Chemical Engineering*, v. 25, p. 409-418, 2001.

CADMUS, M. C.; KNUTSON, K. A.; LAGOTA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. *Biotechnology Bioengineering*, v. 20, p. 1003-1014, 1978.

CALLET, F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Influence of acetyl and piruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution. *International Journal Biological Macromolecular*, v. 9, October, 1987.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 282-291, 2000.

CHI, Z. e ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 206-211, 2003.

DEBON, S. J. J. e TESTER, R. F. In vitro binding of calcium/íon and zinc by non-starch polysaccharides. *Food Chemistry.*, v. 73, p. 401-410, 2001.

De VUYST, L.; VAN LOO, J.; VANDAMME, E. J. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Journal Chemical Biotechnology*, v. 39, p. 263-273, 1987.

De VUYST, L.; VERMIERE, A. Use of industrial medium components for xanthan production by *X. campestris*. *Applied Microbiology. Biotechnology.* v. 42, n. 2/3, p. 187-191, 1994.

DIAZ, P. S. Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana. Dissertação (mestrado), Ciências e Tecnologia Agroindustrial, UFPEL, p. 65, 2002.

DRUZIAN, J.I. Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.), Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000. 179p.

FORESTI, A. P. Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas* em meios modificados. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPEL, 2003.

FUNAHASHI, H.; TOSHIOMI, Y.; TAGUCHI, H. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *X. campestris*. Journal of Fermentation Technology, v. 65, n. 5, p. 603 – 606, 1987.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. Simulation of xanthan gum production by a chemically structured kinetic model. Mathematical Computers Simulation, v. 42, p. 187-195, 1996.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. Biotechnology Advances, v. 18, p. 549-579, 2000.

HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J.; HESSELTINE, C. W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. Applied Microbiology, v. 3, n. 6, p. 361-368, 1955.

GUPTE, M .D.; KAMAT, M. Y. Isolation of wild *Xanthomonas* strains from agricultural produce, their characterization and potential related to polysaccharide production. Folia Microbiology, v. 42, n. 6, p. 621-628, 1997.

IBSBF – Coleção de Cultura da Seção de Bacteriologia Fitopatológica do Instituto Biológico de Campinas/SP-Brasil.

JOHANNESSEN, J. V. Electron microscopy in human medicine, instrumentation and techniques, v. 1. Great Britain : McGraw Hill International Book Company, 1978; p. 99-185.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDES, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *X. campestris* grown in molasses. Process Biochemistry, v. 39, p. 249-256, 2003.

KANG, K. S.; PETTIT, D. J. Gum Xanthan. In: WHISTLER, R. I; BEMILLER, J. N. ou. Industrial Gums – Polysaccharides and their derivatives. 3^a ed. San Diego : Academic Press, 1993. p. 343-344.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. Polymer Degradation and Stability, v. 59, p. 81 – 84, 1998.

KENNEDY, J. F.; BRADSHAW, I. J. Production, properties and applications of xantana. Progress Ind. Microbiology, n. 19, p. 319-371, 1984.

KENNEDY, J. F.; JONES, P.; BAKER, A. Factors affecting microbial growth and polysaccharides production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. *Enzyme Microbiology and Technology.*, v. 4, n. 1, p. 39-43, 1982.

KOVACS, P.; KANG, K. S. Xanthan gum, in *Food Colloids* (ed. H.P. Graham), AVI Publishing, Westport, CT, p. 500-521, 1977.

LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; TZANAKAKIS, E. S.; KIPARISSIDIS, C.; EKATERIANIADOU, L. V.; KYRIAKIDIS, D. A. Kinetics of xanthan gum production from whey by constructed strain of *X. campestris* in batch fermentations. *Chemical Engineering Technology*, v. 20, p. 354-360, 1997.

MELTON, L. D.; MINDT, L.; REES, D. A. et al. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. *Carbohydrates Res.* v 46, p. 245, 1976.

MERCER, E. H.; BIRBECK, M. S. C. Fijacion, lavado y deshidratacion. In: *Manual de microscopia eletrônica para biólogos*. Madrid: ed. Blume, p. 4-19, 1972.

MEYER, E.L.; FULLER, G.G.; CLARK, R.C.; KULICKE, W.M. Investigation of xanthan gum solution behavior under shear-flow using rheoptical techniques. *Macromolecules*, v. 26, n. 3, p. 504-511, 1993.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MORAINE, R.A.; ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 13, p. 381-391, 1971.

MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. *Gums and stabilizers for the food industry*. Oxford: Pergamon Press, , p.57-78, 1984.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *X. campestris*. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, v. 11, p. 502-504, 1995.

NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. KNAUSS, C. Xanthan production by *X. campestris* in a whey-based médium. *Revista de Microbiologia*, v. 28, p. 148-151, 1997.

NUSSINOVITCH, A. Hydrocolloid application – Gum technology in the food and other industries. Blackie Academic e Professional, London, p. 155-169, 1997.

PADILHA, F. F. Produção de biopolímeros sintetizados por microorganismos. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, p. 210, 2003.

PAN, A.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *X. campestris* pv. *pruni* CEPA 06. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 6, n. 3, p. 273-277, 2000.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. *Process Biochemistry*, v. 37, n. 1, p. 73-80, 2001.

PELGZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*, v. 2, São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1981, p. 1031.

PONS A.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Modelling *X. campestris* batch fermentation in a bubble column. *Biotechnol Bioengineering*, v. 33, p. 394-405, 1989.

PONS A.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Xanthan batch fermentations: compared performance of a bubble column and a stirred tank fermentor. *Bioprocess Engineering*, v. 5, p. 107-114, 1990.

RÁDIS-BAPTISTA et al. Crotacetin a novel snake venom of c-type lectin, is homolog convulxin. *Cell Biochemical Biophysical*, v. 44, n. 3, p. 412-423, 2006.

ROTTAVA, I. Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana. Dissertação (mestrado), Departamento de Ciências Agrárias, URI, p. 79, 2005.

RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 121-146, 1993.

SANDFORD, P. A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: . S. O. Aspinall. The polysaccharide, New York: Academic Press, p. 412-490, v. 2., 1983.

SANTI-GADELHA, T. et al. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research*, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Contagem Total de microrganismo aeróbicos mesófilos/psicrotróficos e de bolores leveduras em placas. In: Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. Manual Técnico N°14. Campinas: ed. ITAL, p. 21-29, 1995.

SOUW, P.; DEMAIN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *X. campestris* NRRL B-1459. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, 1979.

SOUZA, A S.; VENDRUSCULO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv *pruni* CEPAS 24 e 28. *Ciência e Engenharia*, v. 8, n.2, p. 115-123, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, v. 8, p. 143-213, 1972.

SUTHERLAND, I. W. *Xanthomonas* polysaccharides improved methods for their comparison. *Carbohydrates and Polymer*, v. 1, p. 107-115, 1981.

SUTHERLAND, I.W.; KENNEDY, L. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* sp. *Microbiology (UK)*, v. 142, p. 867-872, 1996.

TAKO, M. NAKAMURA, S. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. *Agricultural Biology Chemical.*, v. 48, n. 12, p. 2987-2993, 1984.

Agricultural and Food Chemistry

TORRESTIANA, B.; FUCIKOVSKY, L.; GALINDO, E. Xathan production by some *Xanthomonas* isolates. *Letters in Applied Microbiology*, v. 10, p. 81 – 83, 1990.

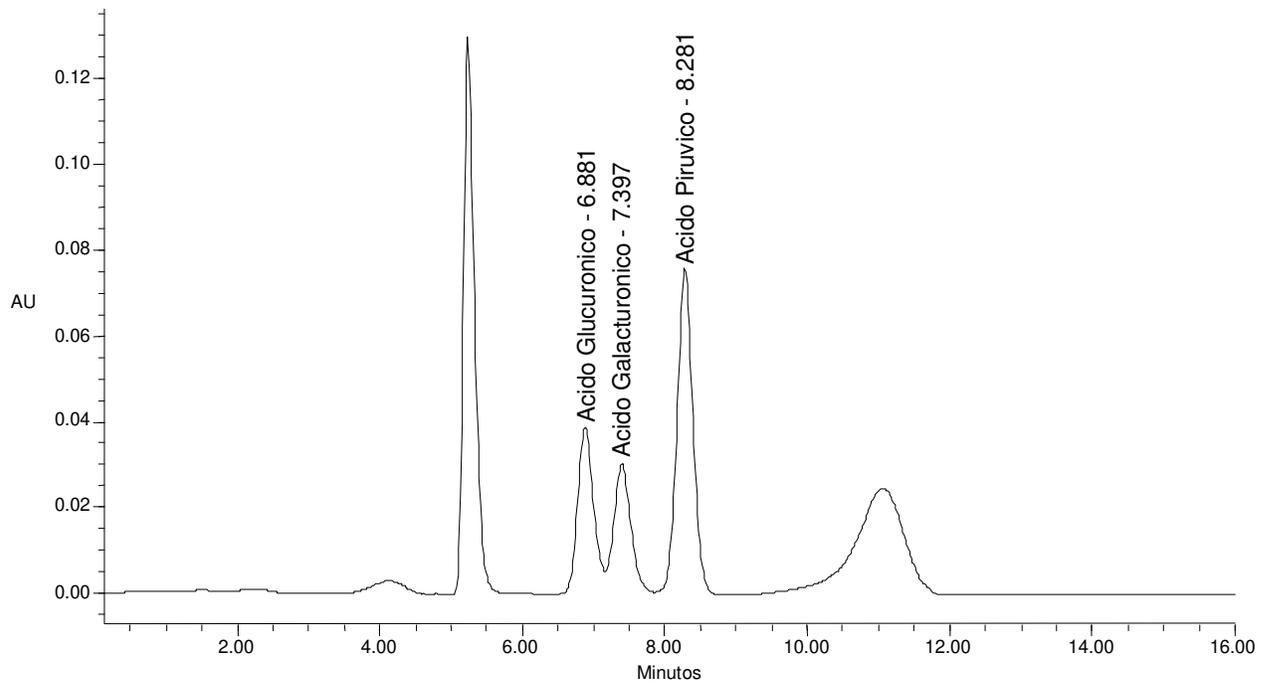
WHISTLER; J. N.; BEMILLER, R. L. Xathan, gellan, wellan, e rhamosan. In: *Industrial gums – Polysaccharides and their derivatives*. (Ed.), London, p. 342-371, 1993.

ZHANG XUEWU; LIU XIN; GU DEXIANG; ZHOU WEI; XIE TONG; MO YONGHONG. Rheological models for xanthan gum. *Journal of Food Engineering*, v. 27, p. 203-209, 1996.

ANEXO 1

ANEXO 1

Cromatograma dos padrões de ácido glucurônico, ácido galacturônico e ácido pirúvico



ANEXO 2

ANEXO 2

Cromatograma da análise de composição de ácidos orgânicos da goma xantana obtida através da fermentação com *X. campestris* pv. *manihotis* 280-95 sem “stress” alcalino + padrão de ácido pirúvico

