

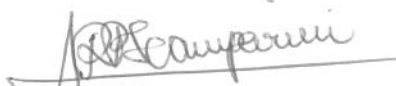
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**Preservação de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis*
cepa 280 através da técnica de secagem por atomização**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Cristina Maria Rodrigues da Silva** aprovada pela Comissão Julgadora em 16 de abril de 2003.

Campinas, 16 de abril de 2003.


Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
Presidente da Banca

Cristina Maria Rodrigues da Silva

Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
Orientadora

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

Campinas - 2003

UNIDADE	B0
Nº CHAMADA	UNICAMP
	Si 38p
V	EX
TOMBO BC	54244
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	12/06/03
Nº CPD	

CM00185604-7

BIB ID 293692

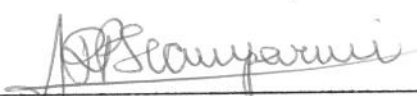
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

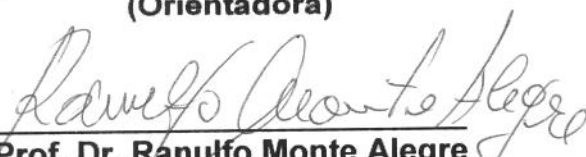
Si38p Silva, Cristina Maia Rodrigues da
Preservação de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa
280 através da técnica de secagem por atomização / Cristina
Maia Rodrigues da Silva – Campinas, SP:[s.n.], 2003.

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

1.Xanthomonas. 2.Secagem por atomização. 3.Preservação.
4.Goma xantana. I.Scamparini, Adilma Regina Pippa.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

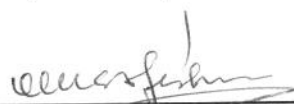
BANCA EXAMINADORA


Prof^a. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
(Orientadora)


Prof. Dr. Raulfo Monte Alegre
(Membro)


Prof^a Dra. Janice Izabel Druzian
(Membro)

Prof^a Dra. Daniela Martins Mariuzzo
(Membro)


Prof^a Dra. Elisa Teshima
(Membro)


Prof. Dr. José Luiz Pereira
(Membro)

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(Membro)

Campinas, de de 2003.

*À minha mãe Severina
Às minhas irmãs, Edileuza,
Mauricélia e Penha*

[...] talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito [...] Não somos o que deveríamos ser, mas somos o que iremos ser. Mas graças a Deus, não somos o que éramos (Martin Luther King).

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção;

À Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini, pela confiança, amizade e orientação;

Aos Professores Ranulfo Monte Alegre, Elisa Teshima, Daniela Martins Mariuzzo, Janice Izabel Druzian, Carlos Raimundo Ferreira Grosso, José Luiz Pereira pelas sugestões apresentadas na redação final deste trabalho;

À aluna de iniciação científica Maria Cândida;

À Francine Padilha e Sílvia Amélia pela ajuda, amizade e convivência fraterna;

À Priscila e Márcia pela palavra amiga;

À Karla do Laboratório Geral por estar sempre disposta a ajudar;

À Andréa Barbosa dos Santos pela ajuda com as fotomicrografias;

Ao Laboratório de Microscopia do Departamento de Biologia da UNICAMP;

Aos técnicos do Laboratório de Cereais da UNICAMP pela ajuda e utilização de equipamentos;

Ao pessoal da Secretaria do DCA e da Pós – Graduação, Marquinhos, Marcão, Jardete, Ricardo e Cosme pelos auxílios prestados;

A todos os colegas do Laboratório Geral de Ciências da FEA pela amizade, auxílio e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao CNPq pela bolsa concedida;

À Corn Products Brasil que nos cedeu gentilmente a maltodextrina;

À Colloids Naturels Brasil Comercial LTDA que nos cedeu gentilmente a goma arábica.

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

ÍNDICE GERAL

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO GERAL.....	1
GENERAL SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
 CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 5
1.2 - Secagem por atomização	6
1.3 -Utilização da técnica de secagem por atomização para preservação de bactérias	7
1.4 - Influência do tamanho da partícula e da umidade no processo de secagem	8
1.5 - Danos celulares provocados pela secagem	11
1.6 - Técnicas alternativas para preservação e manutenção de <i>X. campestris</i>	12
1.7 - Microencapsulação.....	15
1.8 - Ingredientes utilizados como material de parede	16
1.9 - Biossíntese da goma xantana	17
1.10 - Estrutura química da goma xantana	19
1.11 - Produção de goma xantana.....	20
1.12 - Uso de outras fontes para produção de goma xantana.....	24
1.13 - Recuperação da Goma Xantana	25
1.14 - Aplicação de biopolímeros.....	26
1.15 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
 CAPÍTULO 2 - Preparação do concentrado celular de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280 utilizando o método de secagem por atomização	 44
Resumo	44
SUMMARY	45
INTRODUÇÃO.....	46

MATERIAL E MÉTODOS	47
RESULTADOS	51
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
 CAPÍTULO 3 - Sobrevivência de células de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280	
após secagem por atomização.....	64
RESUMO	65
SUMMARY	66
3.1 - INTRODUÇÃO	67
3.2 - MATERIAL E MÉTODOS	68
3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
3.4 - CONCLUSÕES	83
3.5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS.....	88

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Influência da fase de crescimento na sobrevivência de células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 durante o processo de secagem por atomização. 52

Tabela 2 - Influência do meio de reidratação na viabilidade do concentrado celular de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280. 52

Tabela 3 - Efeito do tempo de reidratação na recuperação das células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280..... 53

Tabela 4 - Influência do meio de suspensão na sobrevivência celular do concentrado atomizado de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280..... 55

Tabela 5 - Influência da Temperatura do ar de saída do *spray drier* na sobrevivência de células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280. 55

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Sobrevivência de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 produzidos por meio de secagem por atomização em diferentes encapsulantes. 75

Tabela 2 – Influência da Temperatura do ar de entrada no *spray drier* na capacidade de produção de goma xantana pelos concentrados atomizados de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280..... 79

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Biossíntese da goma xantana.....	15
Figura 2 - Estrutura química da goma xantana.....	16

CAPÍTULO 2

Figura 1 - Sistema de secagem por atomização para a produção do concentrado celular de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280.....	45
Figura 2 - Efeito do pH do meio de reidratação na sobrevivência das células de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280.....	54

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Sistema de secagem por atomização para a produção do concentrado celular de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280.....	71
Figura 2 - Influência do tempo de estocagem na sobrevivência de células concentradas de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280 armazenadas a 5°C.....	77
Figura 3 - Influência do tempo na sobrevivência das células concentradas de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280 armazenadas a temperatura ambiente.....	77
Figura 4 - Curva de crescimento celular da bactéria <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280 após secagem por atomização.....	80
Figura 5 - Curva de crescimento celular da bactéria <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280 antes da secagem por atomização.....	81
Figura 6 - Colônias de <i>X. campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280 plaqueadas em agar YM pelo método de plaqueamento em superfície incubadas a 30°C por 48 horas. Obtidas do concentrado celular após atomização e armazenamento por 12 meses.....	82

ANEXO

Figura 1 - Fotomicrografias dos concentrados celulares de <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>manihotis</i> cepa 280 após atomização.....	88
---	----

RESUMO GERAL

A utilização da técnica de secagem por atomização como método de preservação de células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 foi estudada, visando à manutenção da viabilidade celular e da capacidade de produção de goma xantana.

A fim de investigar a viabilidade da bactéria durante o processo de secagem por atomização, os efeitos das condições de crescimento, os diferentes fluidos de suspensão e de reidratação dos concentrados celulares na taxa de sobrevivência das células após a secagem por atomização foram estudados.

Alta taxa de sobrevivência celular foi obtida quando leite desnatado reconstituído 10% como meio de suspensão das células e água destilada como fluido de reidratação do concentrado celular atomizado foram utilizados. Considerando as condições estudadas e utilizando a temperatura do ar de entrada no spray drier de 135°C e temperatura do ar de saída de 75°C, foi encontrado 98,42% de sobrevivência celular após secagem por atomização. Inoculando o concentrado atomizado em meio de fermentação contendo 2,0% de sacarose foram produzidos 13,86g/L de goma xantana, o que indica um aumento significativo na produção deste polissacarídeo em relação à produção de goma xantana através dos concentrados originais utilizados neste experimento. A viabilidade das células após secagem por atomização foi mais bem preservada quando os concentrados celulares foram armazenados a 5°C. Uma baixa recuperação de células viáveis foi obtida quando as culturas foram armazenadas em dessecador à temperatura ambiente.

A utilização de diferentes temperaturas do ar de entrada do spray drier de 135, 150 e 200°C e diferentes temperaturas do ar de saída de 75, 85 e 90°C também foram avaliadas. A utilização de temperatura do ar de saída mais baixa resultou em maior taxa de sobrevivência do concentrado celular após secagem por atomização.

Após 12 meses de preservação ensaios de viabilidade mostraram que as culturas concentradas atomizadas, armazenadas em dessecador à temperatura ambiente e a 5°C permaneceram estáveis, não sofrendo alteração morfológica. Não se detectou a presença de sublinhagens mutantes. A utilização de uma suspensão

contendo maltodextrina 20 DE (30%) e goma arábica (10%) resultou em maior proteção às células e maior recuperação de células viáveis.

GENERAL SUMMARY

The use of spray drying as a preservation method of *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* strain 280 cells was studied aiming to maintain cellular viability and capability to produce xanthan gum.

In order to investigate cells survival during spray drying process, the effects of growth conditions, different suspending and rehydration fluids on the concentrated cells survival rate after atomization were determined.

The highest viability rate was found, when skim milk 10% as cells suspension media and distilled water as rehydration fluid were used. Considering culture conditions, inlet air temperature of 135°C and outlet air temperature of 75°C, approximately 98,42% of survival rate was found. When this spray dried concentrated cells were inoculated in fermentation media containing 2% sucrose, it was produced 13,86g/L of xanthan gum per liter of broth. This date indicates a significant increase in the exopolysaccharide production.

The viability of spray dried cells showed good preservation when the concentrated cells were stored at 5°C. The storage at room temperature (25°C) compromised the culture survival rate resulting in lower recovery of viable cells.

After 12 months of preservation viability tests carried out demonstrated that the spray dried concentrated cells stored at 5°C and at room temperature did not present any morphological modification. It was not found any mutant strain. The maltodextrin 20DE (30%) and gum arabic (10%) blend provided protection concentrated cells resulting in further viable cells recover .

INTRODUÇÃO

O interesse na preservação de culturas concentradas secas aumentou nos últimos anos. Devido ao grande número de aplicações dessas culturas nas indústrias de alimentos, faz-se necessária a obtenção de culturas bacterianas estáveis e altamente viáveis (Lievense e van't Riet, 1993). Na escolha do método de preservação do microrganismo, deve-se levar em consideração a finalidade a que se destina e particularmente as características como manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento, ausência de perda das culturas, o controle eficiente da pureza, evitando qualquer fonte de contaminação, os custos com os materiais e com os equipamentos e a frequência do uso do microrganismo preservado. É pouco provável que um único método apresente as condições ideais para todas as linhagens de uma coleção de cultura destinada à indústria ou a investigação científica (Snell, 1991).

No Brasil encontram-se diferentes linhagens de bactérias do gênero *Xanthomonas* mantidas sob refrigeração em tubos em meio inclinado ou por liofilização, mas pouco se conhece sobre as condições para manutenção dessa cultura concentrada utilizando o processo de secagem por atomização.

Neste estudo utilizou-se a técnica de secagem por atomização como método de preservação de células de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280. As bactérias do gênero *Xanthomonas* são conhecidas por produzir grande quantidade do exopolissacarídeo denominado goma xantana quando cultivadas em meio contendo carboidratos. Sob condições ótimas cerca de 70% da fonte de carbono pode ser convertida a polissacarídeo. Este biopolímero é sem dúvida, a mais excepcional das gomas já desenvolvidas por processos biotecnológicos (Betz, 1979). A goma xantana grau alimentício e industrial é produzida em grande escala e comercializada por vários produtores (Sutherland, 2001).

O objetivo deste trabalho foi estudar a preservação do concentrado celular de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280 através da técnica de secagem por atomização.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Características da bactéria *Xanthomonas campestris*

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

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

2. Secagem por atomização

A secagem por atomização é a técnica mais comumente empregada em métodos de encapsulação na indústria de alimentos. As principais variáveis do processo são as temperaturas do ar de entrada e saída, o padrão do fluxo de ar, a distribuição de temperatura e umidade, o tempo de residência e geometria da câmara. O fluido é atomizado utilizando um bico aspersor ou um atomizador centrífugo. As gotículas formadas entram em contato com o fluxo de ar quente e então passam do estado líquido para o sólido em um curto espaço de tempo devido à grande superfície de contato do material atomizado, com uma variação muito rápida de temperatura e atividade de água. A rápida evaporação mantém a temperatura das gotículas relativamente baixa, podendo-se assim, aplicar altas temperaturas no ar de secagem sem afetar o produto final (Filková e Mujumdar, 1995).

A secagem por atomização pode ser dividida em três etapas: atomização do produto líquido; mistura ar-gotas aspergidas e evaporação da água, separação do produto seco do ar de saída (Filková e Mujumdar, 1995). O tipo de atomizador determina não somente a energia necessária para formar o *spray* como o tamanho e distribuição de tamanho das gotículas, além da trajetória e velocidade que determinam a morfologia final do produto. O tamanho da gota estabelece a superfície de transferência de calor disponível e assim a taxa de secagem. Os atomizadores mais comumente utilizados são os centrífugos, os aspersores de fluido simples e aspersores de fluido duplo (Filková e Mujumdar, 1995). Com esses atomizadores, soluções de baixa viscosidade (em torno de 2000 cP) podem ser quebradas em gotículas de até 2 μ . Devido a este aumento da superfície de contato, a secagem em um secador por atomização pode ser realizada em frações de segundos. Segundo Kieckbusch e King (1980), a retenção de voláteis varia consideravelmente com os diferentes modelos de aspersores a uma dada distância axial.

A secagem por atomização produz partículas esféricas devido à suspensão livre das gotículas líquidas no meio gasoso. As partículas formadas podem ser

sólidas ou porosas dependendo das características do material utilizado e das condições de secagem (Balassa e Fanger, 1971).

As propriedades físicas, a composição e a qualidade das cápsulas estão sujeitas a variações consideráveis dependendo da direção do fluxo e temperatura do gás de entrada, da uniformidade da atomização e concentração de sólidos, temperatura e grau de aeração do líquido de entrada (Lievense e van't Riet, 1993).

3. Utilização da técnica de secagem por atomização para preservação de bactérias

A possibilidade de preservar culturas através da secagem em *spray drier* data de 1914 com os estudos de Rogers, que investigou a secagem de bactérias lácticas. A pesquisa utilizando a técnica de secagem por atomização como método de preservação de bactérias a fim facilitar a manipulação, expedição e armazenagem das culturas sem perda da sua atividade foi estudado por Prajapati et al. (1987).

Do ponto de vista de inativação térmica, a principal vantagem mencionada é a rapidez da secagem (Filková e Mujumdar, 1995; Metwally et al., 1989), devido à alta área de superfície específica do *spray*. Isto resulta em um curto tempo (20 – 40s) de residência para as células bacterianas no *spray dryer*, limitando assim a inativação térmica (Elizondo e Labuza, 1974).

O choque térmico é sem dúvida uma das razões para a baixa sobrevivência de bactérias durante o processo de congelamento e liofilização, bem como durante o processo de secagem por atomização (Beal e Corrieu, 1994; Daemen et al., 1983). Demonstrou-se que a sobrevivência das bactérias durante a secagem foi afetada por muitos fatores, tais como a composição do meio (Daemen, 1983), a fase de crescimento da população bacteriana (Teixeira et al, 1995a), e a concentração da biomassa (Bozoglu et al., 1987).

Segundo (Lievense e van't Riet, 1993), por causa do resfriamento evaporativo na primeira parte do processo de secagem, a sobrevivência das células bacterianas durante atomização está fortemente correlacionada à temperatura do ar de saída, e não diretamente à temperatura do ar de entrada do secador. Labuza et al. (1970),

investigaram o efeito da temperatura na viabilidade celular em secagem por atomização. Lievense e van't Riet (1993), em temperaturas de saída altas um maior grau de inativação celular ocorreu. A maior taxa de sobrevivência é encontrada nas menores temperaturas de saída. Obviamente, baixas temperaturas resultam em menor inativação térmica, mas possivelmente também maior concentração de água residual a qual pode influenciar a sobrevivência. Segundo Favaro-Trindade e Grosso (2002), com temperatura do ar de entrada de 130°C e temperatura do ar de saída do *spray drier* de 75°C, o número de células viáveis de *Bifidobacterium lactis* praticamente não alterou, enquanto a população de *Lactobacillus acidophilus* foi reduzida em 2 ciclos logarítmicos.

As culturas secas são comumente produzidas por liofilização. Entretanto em escala comercial apresentam custo alto e a produção e o rendimento é baixo. Secagem por atomização pode ser um método alternativo para preservação de microrganismos e o *spray drier* tem maior rendimento de produção e menor custo de operação. Além disso, culturas de *Lactobacillus delbrueckii* em iogurte (Bielecka e Majkowska, 2000) e encapsulação de *Pseudomonas fluorescens putida* para inoculação em plantas (Amiet-Charpentier et al., 1999), foram estudadas.

4. Influência do tamanho da partícula e da umidade no processo de secagem

A umidade e temperatura de um sistema são influenciadas significativamente pelo tamanho da partícula. O tamanho da partícula depende de três propriedades físicas da suspensão celular: viscosidade, densidade e tensão superficial. A viscosidade é o único parâmetro que pode ser alterado consideravelmente pela mudança de concentração celular (Josic, 1982). A alta concentração de sólidos da suspensão celular resultará em grandes partículas (Espina e Packard, 1979). Com o aumento do tamanho da partícula o tempo de secagem também aumentará. Isso pode diminuir a taxa de sobrevivência porque o tempo de contato das partículas com o ar quente (necessário para alcançar uma certa concentração final de água) aumentará (Masters, 1989).

O tamanho da partícula também pode ser influenciado pelo tipo de bico aspersor e a pressão de atomização (Filková e Mujumdar, 1995). Uma redução da

sobrevivência de *Lactobacillus bulgaricus* e *S. thermophilus* (de 19,5% para 11%, respectivamente) devido ao maior tamanho da partícula na menor pressão de atomização foi relatado por Metwally et al. (1989). Kim e Bowmick (1990) encontraram em experimentos sobre secagem de culturas para iogurte, que a sobrevivência de *Lactobacillus bulgaricus* e *S. thermophilus* aumentou com redução da pressão de atomização.

As células de Rhizobactéria *Pseudomonas putida* foram microencapsuladas em EUDRAGIT RS30D por meio de secagem por atomização. Estas micropartículas foram em seguida incluídas na cobertura de sementes ou na forma de pellet. A sobrevivência das células em micropartículas foi estudada sob diferentes valores de umidade relativa (UR): 0, 33, 55 e 100%. O efeito protetor da sílica, presente em certas formulações, foi demonstrado nas umidades relativas de 33 e 55%. A velocidade de liberação da bactéria encapsulada durante o tempo também foi estudada. A liberação foi rápida, após 15 minutos de imersão das microcápsulas de EUDRAGIT em meio tampão aquoso a 20°C, a bactéria já estava liberada. Este resultado mostrando que a água é o elemento chave para a liberação das células de rhizobactéria (Amiet-Charpenter et al., 1999).

Uma coleção sinérgica de espécies de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* 151 e *Streptococcus thermophilus* MK-10 foi preservada com o método de secagem por atomização. Os Estudos foram baseados no efeito da temperatura do ar de saída na faixa de 60-80°C na sobrevivência das culturas no iogurte, bem como o conteúdo de umidade e propriedades sensoriais do iogurte em pó. A sobrevivência das culturas foi maior a 60 e 65°C, mas a umidade excessiva (10,2%) do iogurte em pó teve um efeito negativo sobre sua textura. O conteúdo de umidade do pó foi baixo a 80°C (4,4%), falhas sensoriais apareceram a esta temperatura, e a sobrevivência da bactéria diminuiu consideravelmente. A temperatura na faixa de 70-75°C assegurou a sobrevivência satisfatória das culturas do iogurte (*L. delbrueckii subsp. bulgaricus* – 13,7 – 15,8; *S. thermophilus* 51,6-54,7%, mantida a proporção das espécies L:S – 1:3), conteúdo de umidade satisfatório (5,1 – 6,3), e boas propriedades sensoriais do iogurte em pó (Bielecka e Majokowska, 2000).

Outros fatores inerentes ao processo de secagem por atomização podem ser importantes para se obter uma alta qualidade da cultura *starter* atomizada. Esperava-se que o cisalhamento no bico aspersor exercesse influência sobre a taxa de sobrevivência, mas estudos mostraram que não houve efeito do cisalhamento no bico aspersor sobre a sobrevivência de *Streptococcus lactis* ou *S. cerevisiae* (Elizondo e Labuza, 1974; Labuza et al., 1970). Um outro fator que pode influenciar a taxa de sobrevivência, são os depósitos na parede do *spray drier*. Estes depósitos aumentam o tempo de residência e assim a inativação térmica das células bacterianas. A deposição na parede pode ser influenciada pela concentração de água no produto e conseqüentemente a taxa de secagem (Lievense e van't Riet, 1993).

Inúmeras vantagens e desvantagens do processo de secagem em *spray drier* podem ser citadas. Uma vantagem do processo de secagem por atomização é que as células bacterianas podem ser secas como uma suspensão, sem a necessidade de material suporte (Lievense e van't Riet, 1993).

Uma desvantagem pode ser a nuvem de poeira que é geralmente obtida após secagem (Filková e Mujumdar, 1995). Um passo secundário da secagem consiste de uma vibração usada para aglomeração durante o estágio de secagem em leito fluidizado para prevenir a nuvem de poeira. Geralmente, boas propriedades de reconstituição de produtos atomizados podem ser consideradas como uma vantagem, enquanto que volumes pequenos desses pós aumentam os custos de embalagem e estocagem (Lievense e Riet, 1993).

Como mencionado acima, uma escolha correta da taxa de fluxo e da temperatura de entrada do ar e a taxa de fluxo de água que tem de ser evaporada (e assim a taxa de fluxo de alimentação bombeada para o bico aspersor), junto com o tamanho da partícula e da distribuição do tamanho, minimizarão a inativação térmica. A situação certa para essas variáveis é na maioria das vezes, atingida pelo método de tentativa e erro, pois é difícil calculá-la antecipadamente. A necessidade de realizar tais experimentos, o controle relativamente difícil durante o próprio processo de secagem, e a complicada modelagem/otimização do processo podem ser

considerados como desvantagens do processo de secagem por atomização (Lievens e Riet, 1993).

5. Danos celulares provocados pela secagem

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

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

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

Segundo Busta (1976) as condições de crescimento que influenciam a composição da célula ou seu estado fisiológico podem afetar sua susceptibilidade aos danos provocados pela liofilização. Estas mesmas condições podem também

influenciar a capacidade de reparo dos microrganismos após injúria, afetando o crescimento das células danificadas. Os fatores mais importantes envolvidos nos mecanismos de reparo das injúrias são: o pH, a temperatura, a atmosfera gasosa, a presença de nutrientes e sais específicos, a idade da cultura, a atividade de água, a força iônica, além de outras variáveis que podem agir na estrutura e na função de proteínas e por sua vez, influenciar de modo decisivo na injúria e no reparo dos microrganismos.

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

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

6. Técnicas alternativas para preservação e manutenção de *X. campestris*

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

Segundo Kidby et al. (1977), a preservação de *X. campestris* NRRL B-1459 em tiras de papel foi uma técnica simples e adequada para a manutenção não propagativa das células por um período de tempo mais curto. Assim, tiras de papel para cromatografia Whatman com 5,0 x 3,0 cm foram tratadas com ácido etilenodiaminotetraacético dissódico 20mM e lavadas em água deionizada. Posteriormente, foram secas a 100°C por 24 horas e esterilizadas a 121°C por 15 minutos e imersas numa cultura concentrada de *X. campestris*. Esta técnica de

preservação foi aplicada a 36 linhagens de *X. campestris* resultando em 78% de culturas viáveis. A produção de polissacarídeos por bactérias preservadas através deste método foi igual à produção através de outras formas tradicionais de inoculação. As células preservadas em tiras de papel produziram um inóculo viável que não mostrou tendência à degeneração durante o curso de uma fermentação. No entanto, a desvantagem desta técnica consistiu no curto prazo de preservação, sendo que um novo lote de inóculos deveria ser preparado a cada três meses, a partir de uma cultura liofilizada. Nos estudos de Baiocco (1997) como método de preservação, o emprego de culturas liofilizadas foi o mais adequado em relação ao binômio qualidade-custo, uma vez que a bactéria apresentou alta taxa de sobrevivência quando armazenada por um período de 12 meses.

Suslow e Schroth (1981) desenvolveram um método de preservação por congelamento ou desidratação de bactérias em soluções de metilcelulose. As linhagens bacterianas foram transferidas para soluções de 1% de metilcelulose até formar uma suspensão contendo 10^8 UFC/mL, sendo que 3 mL da suspensão foram congelados a -14°C e 15 mL foram desidratados em placas de Petri formando um filme fino com 12,7% de umidade residual. A viabilidade de *X. campestris* foi testada em vários intervalos de tempo pela reidratação de 1 cm^2 do filme desidratado em água destilada e pelo descongelamento de 3 mL da suspensão congelada. Após 38 meses de armazenamento a -14°C , 10^3 a 10^5 UFC/mL foram recuperadas. Em filmes desidratados, houve uma sensível redução da concentração inicial. A preservação das linhagens de *Xanthomonas* em filme de metilcelulose foi considerada uma técnica simples e eficiente.

Salcedo et al. (1992) avaliaram a preservação de *X. campestris* em sementes esterilizadas de *Brassica oleracea* obtendo resultados satisfatórios quanto a viabilidade celular e a capacidade de produção de goma xantana. As sementes foram esterilizadas por radiação gama e por lavagens em hipoclorito de sódio. As sementes tratadas foram colocadas em frascos contendo suspensões de *X. campestris* E-2 contendo 10^9 UFC/mL. Estas sementes, contendo aproximadamente 13.000 células cada, foram armazenadas durante 12 meses a 4°C . A viabilidade das bactérias após este período foi de 10% da inicial. Quando estas sementes foram

usadas como pré-inóculo para a produção de goma, a concentração do polímero variou de acordo com o tempo de armazenamento da semente e a produção do polímero ficou em torno de 11 g/L. Como a semente é o habitat natural destas bactérias, a presença de alguns micronutrientes fornecem condições microambientais vantajosas para a preservação da viabilidade e da capacidade de produção da goma xantana de boa qualidade reológica. Este procedimento apresenta como principais vantagens a facilidade de inoculação, a ausência de etapas propagativas através de repiques e a manutenção da bactéria no seu habitat natural.

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

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

7. Microencapsulação

A microencapsulação é definida como uma tecnologia de empacotamento de aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso com finas camadas poliméricas formando pequenas partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas (Sparks, 1981).

Na indústria de alimentos a microencapsulação é aplicada para reter compostos voláteis liberando-os sob condições específicas, proteger o conteúdo das microcápsulas contra condições adversas como luz, oxigênio, umidade e ingredientes reativos, facilitar a manipulação pela redução da higroscopicidade evitando aglomerados, uniformizar uma mistura em função de seu tamanho, quando usada em pequenas quantidades, transformar líquidos em sólidos para uso em sistemas secos, retardar a liberação do conteúdo das microcápsulas até que seja aplicado o estímulo correto e mascarar o sabor e o odor do conteúdo das microcápsulas (Shahidi e Han, 1993).

As microcápsulas são pequenos envoltórios compostos externamente por um material de parede e internamente por um material ativo (Jackson e Lee, 1991). Além dos parâmetros inerentes ao processo de encapsulação, a retenção do agente ativo nas cápsulas é governada por fatores relacionados à natureza química do material de recheio, incluindo o peso molecular, a funcionalidade química, a polaridade e a volatilidade relativa (Chang et al., 1988). No caso da cobertura das cápsulas, a capacidade de retenção está associada principalmente ao estado físico do encapsulante, e às suas características físico-químicas como o peso molecular e a funcionalidade química (Whorton e Reineccius, 1995).

As microcápsulas podem apresentar diferenças no formato e no tamanho, dependendo do material de parede e do processo utilizado para prepará-las (Salib, 1997). Para alguns tipos de material de recheio, o tamanho da cápsula pode ter grande influência no rendimento e estabilidade das microcápsulas. No caso de produtos voláteis, pesquisadores observaram que partículas de tamanho maiores resultaram em melhor retenção do *flavor* (Rulkens e Thijssen, 1972), efeito não observado por Reineccius e Coulter (1969). A liberação do conteúdo das

microcápsulas ocorre por diferentes mecanismos, por exemplo, ruptura mecânica ou dissolução, temperatura, pH, solubilidade no meio, biodegradação e por difusão (Whorton, 1995). A difusão, por sua vez, é regida por um gradiente de concentração e de forças atrativas intermoleculares (Shahidi e Han, 1993), controlada pela solubilidade do componente encapsulado na matriz e pela sua permeabilidade através da matriz (Reineccius, 1995).

Visando o aumento da vida útil, o recheio deve ser protegido da oxidação. Deve-se levar em consideração a presença de antioxidantes naturais, traços de metais, composição do ar de secagem e as propriedades de barreira ao oxigênio na partícula microencapsulada. É provável que o principal determinante na vida útil de compostos sensíveis ao oxigênio seja a porosidade da cápsula ao mesmo (Risch e Reineccius, 1988).

8. Ingredientes utilizados como material de parede

A seleção de um material de parede deve obedecer alguns requisitos, por exemplo, este deve possuir boas propriedades emulsificantes, ser um bom formador de filmes, ter baixa viscosidade mesmo em soluções com alto teor de sólidos, apresentar baixa higroscopicidade, baixo custo, não possuir sabor e odor, ser estável e oferecer boa proteção ao ingrediente encapsulado. O material de parede pode ser selecionado dos diversos polímeros naturais ou sintéticos dependendo do material a ser encapsulado e das características desejadas ao produto (Shahidi e Han, 1993).

Os polímeros lipossolúveis são usados para microencapsular um conteúdo hidrossolúvel, e vice-versa. Dentre os materiais mais utilizados como agentes encapsulantes estão incluídas as gomas, como goma arábica, alginato de sódio, carragena; carboidratos, como amido, dextrina, açúcar, xarope de milho; celulose: carboximetilcelulose, etilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; lipídios: cera parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos, óleos, gorduras e óleos hidrogenados; proteínas: glúten, caseína, gelatina e albumina (Shahidi e Han, 1993).

9. Biossíntese da goma xantana

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

Na síntese do exopolissacarídeo, a construção da cadeia formada por unidades repetidas é realizada através da adição de monossacarídeos ativados denominados açúcares nucleotídeos. No caso específico da goma xantana, os açúcares nucleotídeos formados são o GDP-manose, UDP-glicose e UDP- ácido glicurônico. Estes açúcares nucleotídeos doam sequencialmente seus resíduos de açúcares para o acceptor lipídico isoprenilfosfato C-55 para formar uma unidade de pentassacarídeo-P-P-lipídio, que é subsequente polimerizado, formando a goma xantana. A sequência correta é garantida pelos carregadores fosfato-álcool-isoprenóides e lipídios-isoprenóides. No último estágio da síntese, são introduzidos os grupos acetil e pirúvico (Figura 1). Somente a formação dos açúcares nucleotídeos ocorre no interior do citoplasma, sendo que a biossíntese é completada ao atravessar a membrana citoplasmática atingindo o meio externo. A síntese enzimática da goma xantana através de fermentação sob condições controladas fornece um polímero estruturalmente uniforme com limitada variação de peso molecular, característica esta que pode contribuir para a extraordinária estabilidade da solução de goma xantana (Ielpi et al., 1993; Harding et al., 1993; Roseiro et al., 1993a).

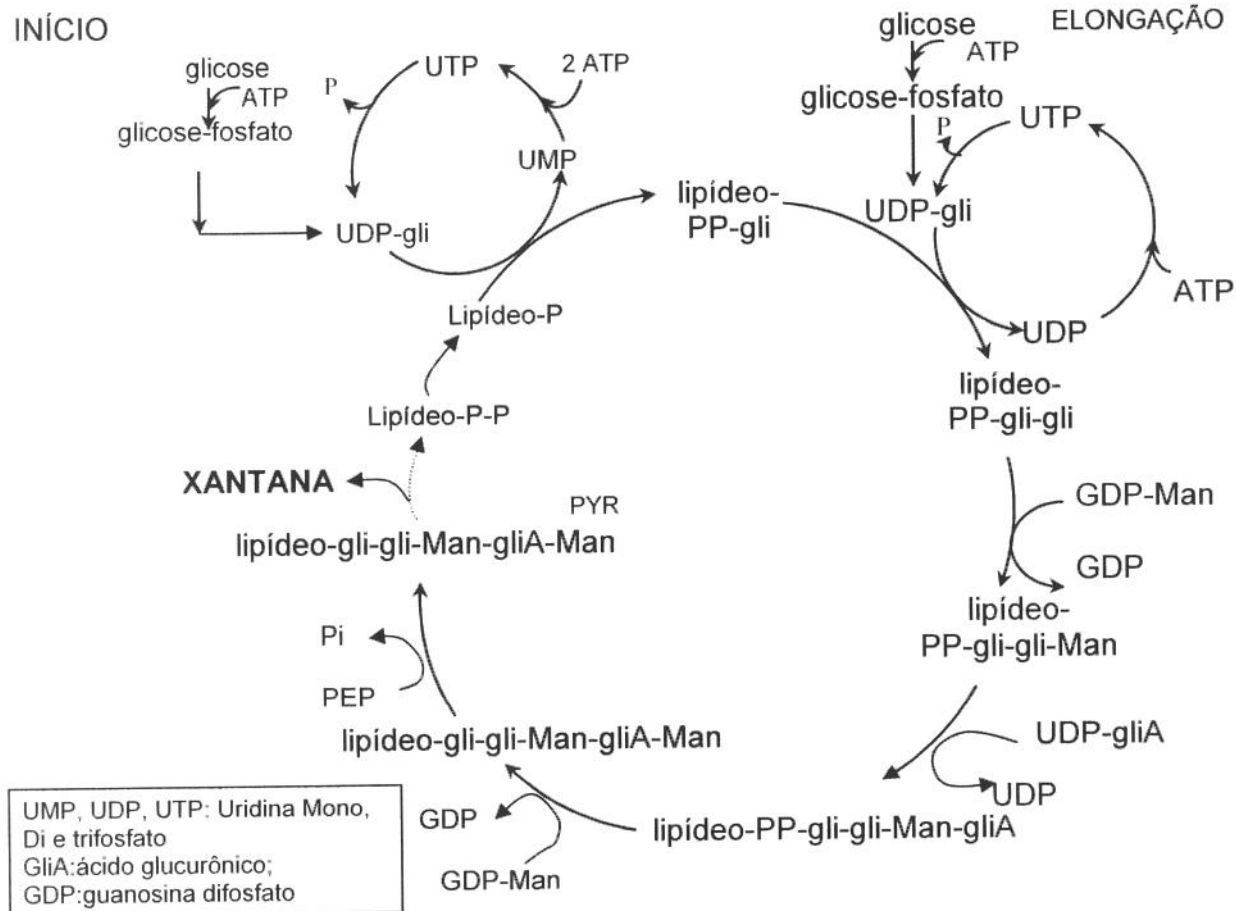


Figura 1 - Biossíntese do exopolissacarídeo goma xantana. Fonte: Dawes e Sutherland (1992).

Segundo Jarman e Pace (1974, 1984) e Rye et al. (1988), a via de Entner-Doudorff e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos são as principais rotas metabólicas utilizadas para conversão da glicose a CO_2 pela *X. campestris*. Estima-se que para a síntese da goma xantana sejam utilizados 11 ATP para cada subunidade de 5 hexoses polimerizadas. Toda energia excedente do metabolismo de *X. campestris* é direcionada para a biossíntese da goma xantana, resultando no aumento da sua produção (Roseiro et al., 1993a).

10. Estrutura química da goma xantana

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

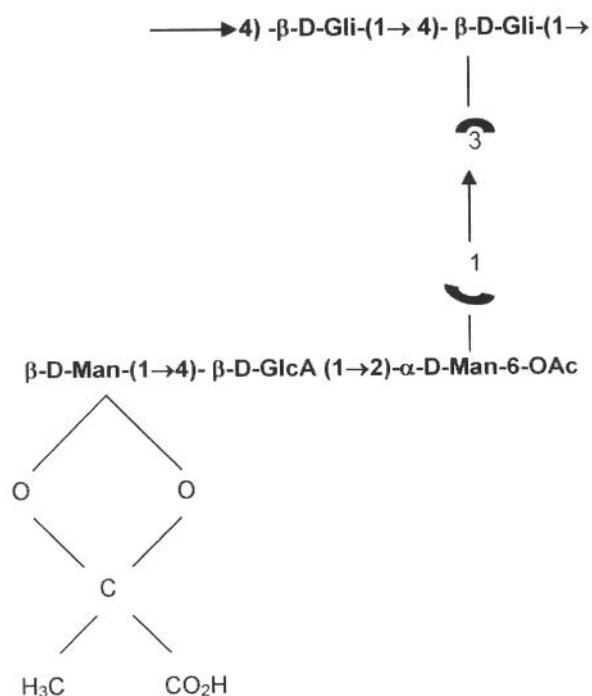


Figura 2. Estrutura química da goma xantana. Fonte: Pace e Righelato (1980).

Estudos sobre a hidrólise da goma xantana foram realizados por Cadmus et al., (1982); Sutherland (1982b) e Sutherland e Macdonald (1986). Como a goma xantana é essencialmente formada por uma cadeia principal de celulose, com cadeias laterais de trissacarídeos ligados às unidades de D-glicose alternadamente, pensou-se inicialmente, que tais polímeros fossem susceptíveis as celulasas ou à outras enzimas β (1,4)-glucanohidrolases. Entretanto, somente a goma xantana produzida por linhagens mutantes e aparentemente deficientes em cadeias laterais, mostrou alguma sensibilidade as celulasas comerciais. O único sistema enzimático capaz de hidrolisar especificamente a goma xantana é proveniente da bactéria *Bacillus* sp e é constituído por duas enzimas induzidas pelo crescimento desta bactéria em meio contendo goma xantana como substrato. Os produtos da hidrólise da xantana por preparações enzimáticas incluem trissacarídeos, resíduos de manose e glicose.

11. Produção de goma xantana

Em 1961, Rogovin e colaboradores relataram a produção de goma xantana como sendo um produto da fermentação de *X. campestris* NRRL b-1459, utilizando meio contendo 2% de glicose, 0,02% de nitrogênio e 0,2% de fosfato de potássio.

De acordo com Sutherland (1972, 1992, 2001), Glicksman (1982) e Kenne e Lindberg (1983) os exopolissacarídeos de origem microbiana constituem uma importante fonte de agentes emulsificantes e estabilizantes com propriedades reológicas adequadas para aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. A produção de exopolissacarídeos por técnicas de fermentação industrial e subsequente recuperação e purificação, apresenta vantagens sobre a produção de outras gomas, com propriedades similares, encontradas em fontes tradicionais como algas marinhas e plantas terrestres, que são extremamente susceptíveis aos fenômenos que ocorrem na natureza.

De acordo com Smiley (1966) e Moraine e Rogovin (1966), devido à alta viscosidade desenvolvida no fluido da cultura, somente 3 a 5% de glicose poderia ser

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

Silman e Rogovin (1970) produziram goma xantana usando a bactéria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 em fermentações contínuas em meio contendo glicose, uréia, sais minerais e resíduos solúveis de destilaria, por um período de 20 dias, sem reciclagem de nutrientes. Ficou determinado neste estudo que o componente limitante para o crescimento celular de *X. campestris* foi o nitrogênio. As taxas de consumo de glicose e de produção de goma xantana foram relacionadas com o pH e com a taxa de diluição da cultura. Assim, com uma alta taxa de diluição, a produção de xantana foi de 0,36 g/kg/h, com um rendimento de 68% em relação à glicose consumida. De acordo com estes autores, não houve evidência de deterioração da cultura bacteriana durante o período de fermentação analisado.

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

concentrações superiores às adequadas para cada ácido orgânico inibiram a produção de goma xantana.

Funahashi et al. (1987) descreveram o efeito de altas concentrações de glicose na produção de goma xantana pela bactéria *X. campestris* ATCC 13951. Ficou determinado que a faixa de concentração de glicose entre 30 a 40 g/kg de meio foi a melhor para a produção de goma xantana, sendo que após 96h de fermentação, foram obtidos 43 g de goma xantana por kg de meio. Concentrações de glicose acima de 50g/kg de meio provocaram a inibição do crescimento celular e de produção de goma. Segundo estes autores, a quantidade de glicose no meio de fermentação é um dos mais importantes fatores envolvidos na produção de goma xantana. Quando a concentração inicial de glicose foi de 100 g/kg de meio, o crescimento celular foi inibido e uma longa fase lag foi observada. Somente após 36 horas, a concentração celular atingiu o máximo e a produção de goma foi iniciada. Utilizando a concentração ótima de glicose de 45g/kg de meio, as células cresceram rapidamente, com um período de fase lag inexpressivo sendo que após 24 horas já houve produção de xantana.

Shu e Yang (1990) observaram que a temperatura iguais ou menores que 24°C, a formação de goma xantana foi retardada, ficando atrás do crescimento celular e assemelhando-se a um típico metabolismo secundário. Entretanto, a 27°C ou a temperaturas mais altas, a biossíntese da xantana seguiu o crescimento celular a partir do início da fase exponencial e continuou na fase estacionária. O crescimento celular a 35°C foi muito lento com altas taxas de morte celular. Os resultados obtidos sugeriram que as temperaturas ótimas para o crescimento celular foram entre 24°C e 27°C, enquanto que para a formação de goma ficou entre 30°C e 33°C. O rendimento final de goma xantana aumentou de 54% a 22°C para cerca de 90% a 33°C. Fermentações com temperaturas superiores a 35°C ocasionaram perdas na viabilidade celular, alta viscosidade do caldo e depleção dos nutrientes essenciais.

Garcia Ochoa et al. (1992) avaliaram a influência da composição do meio na produção de goma xantana. Os melhores resultados tanto para o crescimento de *X. campestris* como para a produção de goma xantana, foram obtidos utilizando o meio contendo: 20g de sacarose; 2,1g de ácido cítrico; 1,144g de NH_4NO_3 ; 2,866g de

KH_2PO_4 ; 0,507g de MgCl_2 ; 0,089g de Na_2SO_4 ; 0,006g de H_3BO_3 ; 0,006g de ZnO ; 0,0024g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,020g de CaCO_3 ; 0,13 mL de HCl e 1000mL de água destilada. O pH do meio foi ajustado para 7,0.

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

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

O processo de fermentação por batelada ainda é o método mais utilizado para a produção comercial de goma xantana pelas indústrias. As condições e os parâmetros destas fermentações têm sido estudados na tentativa de diminuição dos custos do processo e para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na biossíntese deste exopolissacarídeo (De Vuyst et al., 1987; Vashitz e Sheintuch, 1991; Roseiro et al., 1993b).

De modo geral, os estudos cinéticos constituem uma parte vital nas investigações da produção de exopolissacarídeos microbianos. Os modelos matemáticos de tais cinéticas facilitam a análise dos dados e fornece uma estratégia para a resolução dos diversos problemas encontrados durante os processos de fermentações industriais para produção de goma xantana. Uma revisão destes modelos pode ser encontrada nos trabalhos de Thomson e Ollis (1980); Pinches e Pallent (1986); Pons et al. (1989); Suh et al. (1992); Sánchez et al. (1992); Peters et al. (1992) e Roseiro et al. (1993b); Letisse et al. (2002); Esgalhado et al. (2001); Cho et al. (2002) e Casas et al. (2000).

12. Uso de outras fontes para produção de goma xantana

É possível encontrar na literatura diversos trabalhos desenvolvidos para aumentar o rendimento de produção, recuperação e purificação do polímero, abaixando o custo total do processo.

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

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

El-Salam et al. (1994) investigaram a produção de goma xantana produzida pela linhagem de *X. campestris* E-NRC-3 utilizando melaço de cana de açúcar como fonte alternativa de carbono. O meio mais eficiente foi constituído por 2,0% e melaço; 0,3% de K_2HPO_4 ; 0,025% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,15% de $(NH_4)_2HPO_4$ e 0,1% de $CaCO_3$.

Em meio contendo 2% de açúcares totais o rendimento obtido foi de 11,5g de goma xantana por litro e meio. Em meio contendo 25% de açúcares totais foram produzidos 41,3 gramas de goma xantana por litro de meio.

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

Segundo Baig et al. (1990), outra fonte economicamente viável que pode ser explorada para a produção de goma xantana é o soro de leite eliminado como subproduto das indústrias de laticínios. O soro de leite é constituído por 4 a 5% de lactose; 0,8 a 1,0% de proteínas, sais minerais e ácidos orgânicos. No entanto, a bactéria *X. campestris* possui baixo nível de β -galactosidase e, portanto não é capaz de crescer e produzir significativa quantidade de goma em meio contendo lactose como única fonte de carbono. Na tentativa de aproveitamento do soro de leite na produção de goma xantana, linhagens mutantes de *X. campestris* capazes de metabolizar soro de leite e a lactose foram pesquisadas por Schwartz e Bodie (1986); Tait e Sutherland (1989), Fu e Tseng (1990), Konícek e Konicková-Radochová (1992).

13. Recuperação da Goma Xantana

Os polissacarídeos podem ser separados das células bacterianas por centrifugação e/ou microfiltração e posteriormente isolados do meio de cultura por precipitação com solventes orgânicos solúveis em água como álcoois ou acetona ou

através de precipitação seletiva com detergentes catiônicos. A secagem do exopolissacarídeo separado, após diálise com água para remoção do açúcar residual e do solvente orgânico, normalmente deve ser realizada à temperatura ambiente para não ocorrer degradação. Ou através da liofilização do polímero (Druzian, 2000).

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

Gonzales et al., (1989) determinaram as melhores condições de recuperação da goma xantana em soluções aquosas usando a técnica de precipitação com etanol, na presença de sais específicos. Em laboratório os solventes mais utilizados são o etanol e a acetona. O custo do etanol, a sua aceitação para uso alimentar e a possibilidade de sua reutilização através de destilação são as principais vantagens da utilização do etanol na precipitação da goma. As melhores condições para a recuperação da xantana foram a 15°C pela adição de etanol 65% contendo 1% de KCl.

14. Aplicação de biopolímeros

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

A potencialidade do uso de biopolímeros microbianos na indústria de alimentos moderna é um consenso na literatura existente. Segundo Scamparini et al. (2000) devido às propriedades funcionais e versáteis dos biopolímeros, estes podem

se tornar uma ferramenta poderosa para o desenvolvimento de produtos com textura e viscosidade diferenciadas e, conseqüentemente novos produtos.

Segundo Jeanes et al., (1976) e Betz (1979), as propriedades reológicas da goma xantana e sua estabilidade numa ampla faixa de pH e de temperatura mesmo na presença de sais, a torna um excelente agente estabilizante para alimentos, como cremes, sucos artificiais, sobremesas enlatadas ou em pó, molhos para saladas, carne, frango ou peixe, assim como para xaropes e coberturas para sorvetes e sobremesas. A compatibilidade deste polissacarídeo com a maioria dos colóides usados em alimentos, incluindo o amido, torna ideal para a preparação de pães e outros produtos para panificação (Christianson et al., 1974).

A obtenção de biopolímeros para consumo humano é uma tarefa mais complexa do que para a utilização em outros produtos, uma vez que devem ser considerados seguros do ponto de vista alimentar e, portanto, satisfazer os severos códigos e legislações alimentares, atualmente em vigor. Um exemplo disso é que apesar da pesquisa em polissacarídeos produzidos por microrganismos ter sido iniciada há mais de três décadas, até hoje apenas três biopolímeros foram aprovados para uso alimentar nos EUA: xantana produzida por *Xanthomonas campestris*, gelana por *Sphingomonas* e dextrana por *Leuconostoc* (Stredansky et al., 1999; Vandame et al., 1996).

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

A goma xantana encontra outros campos de aplicação. Na indústria farmacêutica este polissacarídeo é empregado em loções, géis e emulsões, fornecendo excelente estabilidade para cremes e loções, melhorando as propriedades dos “xampus” e de sabonetes líquidos, suspendendo pigmentos insolúveis e produzindo um creme de limpeza estável (Baird e Pettitt, 1991; Dziezak, 1991).

A solução de goma xantana é um excelente agente de suspensão e viscosidade, estável numa ampla faixa de pH e temperatura. Apresenta compatibilidade com muitos componentes dos alimentos e com sais e outros produtos químicos. Na indústria de petróleo e de explosivos, a goma xantana também encontra aplicação devido à tolerância à ampla faixa de temperatura, à reologia e à estabilidade em soluções salinas, propriedades essas requeridas pelas indústrias desses setores. A compatibilidade do biopolímero com uma grande variedade de tintas é muito útil na formulação de pastas de impressão e de soluções para aplicações têxteis (Pettitt, 1982; Sutherland, 2001).

Segundo Kennedy et al. (1982), a goma xantana tem sido utilizada extensivamente pela indústria do petróleo, na perfuração de novos poços e na recuperação secundária do petróleo. O uso de goma xantana em associação com a lama de perfuração e no fraturamento hidráulico tem resultado num processo de menor custo e maior eficiência para a indústria petroquímica. Na agricultura, a goma xantana tem sido usada como agente de suspensão e estabilizante em herbicidas, pesticidas, fertilizantes e fungicidas (Sutherland, 2001).

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

Devido à grande aplicabilidade industrial da goma xantana e ao seu amplo mercado mundial inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas para a determinação das condições ótimas de crescimento celular, de produção, recuperação e de purificação deste exopolissacarídeo (Silman e Rogovin, 1972, 1972; Kennedy et al., 1982; Funahashi et al., 1987 e Ahlgren, 1993).

Segundo Baird e Pettitt (1991) o mercado americano anual para as gomas utilizadas em alimentos foi estimado em 405 milhões de dólares e somente para a goma xantana foi avaliado em torno de 60 milhões de dólares. De acordo com dados fornecidos pela SECEX, a importação de goma xantana no Brasil no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2002 foi de 1.640.782 kg líquido totalizando um valor de US\$ 11.831.898. Estes dados justificam a intensa procura por novos processos mais viáveis e eficientes para a produção de goma xantana em lotes homogêneos com qualidade assegurada.

Contudo, a instabilidade genética da bactéria *X. campestris* ocasionada pelo seu contínuo subcultivo durante as etapas de produção de inóculo constitui-se num dos principais fatores que afetam a produção de goma xantana (Jeanes et al. 1976). O aparecimento de linhagens mutantes ao longo do cultivo de *X. campestris* tem sido relatado na literatura (Moraine e Rogovin, 1973; Cadmus et al., 1978). Estas sublinhagens produzem uma goma xantana claramente diferente da original, com propriedades reológicas inadequadas e com baixo rendimento, ocasionando um alto custo de produção (Ramírez et al., 1988).

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

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLGREN, J. A. Purification and properties of a xanthan depolymerase from a heat-stable SALT-tolerant bacterial consortium. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 12, n. 2, p. 87-92, 1993.

- AMIET-CHARPENTIER, C.; GADLLE, P. & BENOIT, J. P. Rhizobacteria microencapsulation: properties of microparticles obtained by spray drying. *Journal Microencapsulation*, v. 16, 2, p. 215-229, 1999.
- BAIG, S.; QADEER, M. A.; AKHTAR, M. S.; AHMED, T. Utilization of unhydrolyzed cheese whey for the production of extracellular polysaccharide by *Xanthomonas cucurbitae* PCSIR b-52. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 69, n.6, p. 345-349, 1990.
- BAIOCCO, L.M. Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis*. Tese de Mestrado. 1997. UNICAMP, 184P.
- BAIRD, J. K.; PETTITT, D. J. Biogums used in food and made by fermentation. In: GOLDBERG, I.; WILLIAMS, R. (ed) *Biotechnology and Food Ingredients*. New York: Van Nostrand Reinhold, cap. 9, p. 223-263, 1991.
- BALASSA, L. L.; FANGER, G. O. Microencapsulation in food industry. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, v. 2, n. 2, p. 245-265, 1971.
- BEAL C.; CORRIEU, G. Viability and acidification activity of pure and mixed starters of *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 398 at the different steps of their production. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*, v. 27, n. 1, p. 86-92, 1994.
- BETZ, D. A. Xanthan gum, a biosynthetic polysaccharide for the food industry. *Food Technology in Australia*, p.11 –16, 1979.
- BEUCHAT, L. R. Injury and repair of Gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. *Advances in Applied Microbiology*, v. 23, p. 219-243, 1978.
- BIELECKA, M. & MAJKOWSKA, A. Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensory properties of yoghurt powder. *Nahrung*, v. 44, n.4, p. 257-260, 2000.

BOZOGLU, T. F.; OZILGEN, M. AND BAKIR, U. Survival kinetics of acid lactic starter cultures during and after freeze-drying. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 9, n. 9, p. 531-537, 1987.

BRADBURY, J. F. *Xanthomonas*. In: *BERGEY'S manual of systematic bacteriology*, v. 1, KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (ed) Williams & Wilkins Company USA, 1984.

BUSTA, F. F. Introduction to injury and repair of microbial cells. *Advances in Applied Microbiology*, v. 23, p. 195-201, 1978.

BUSTA, F. F. Practical implications of injured microorganisms in food. *Journal Milk Food Technology*, v. 39, p. 138-145, 1976.

CADMUS, M. C.; JACKSON, L. K.; BURTON, K. A.; PLATTNER, R. D.; SLODKI, M. E. Biodegradation of xanthan gum by *Bacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, v.44, n.1, p. 5-11, 1982.

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

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operations conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology*, v.26, n.2-4, p.282-291, 2000.

CHANG, Y. I.; SCIRE, J.; JACOBS, B. Effect of particle size and Microstructure properties on encapsulated orange oil. In: REINECCIUS, G. A.; RISCH, S. J. *Flavor Encapsulation*. (eds) ACS Symposium Series, n. 370. American Chemical Society, 1988.

CHO, Y. J. AND YUN, J. W. Purification and characterization of an endoinulinase from *Xanthomonas oryzae* No. 5. *Process Biochemistry*, v.37, p.1325-1331, 2002.

CHRISTIANSON, D. D.; GARDNER, H. W.; WARNER, K.; BOUNOY, B. K.; INGLET, G. E. Xanthan gum in protein-fortified starch bread. *Food Technology*, v. 28, n. 6, 1974.

DAEMEN, A. L. H, KRUK, A. and van der STEGE, H. J. The destruction of enzymes and bacteria during the spray drying of milk and whey. 3. Analysis of the drying process according to the stage in which the destruction occurs. *Netherland Milk Dairy Journal*, v. 37, p. 213, 1983.

DAWES, I. W. AND SUTHERLAND, I. W. *Microbial physiology*. Series Basic Microbiology. Blackwell Scientific Publications, 1992, V. 4, 289p.

DE VUYST, L.; LOO, J.; VANDAME, E. J. Two step fermentation process for improved xanthan production by *X. campestris* NRRL B-1459. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 39, n. 4, p. 263-273, 1987.

DE VUYST, L.; VERMEIRE, L. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 42, n. 1, p. 187-191, 1994.

DIZIEZAK, J. D. A focus on gums. *Food Technology*, March, p. 116-132, 1991.

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. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP, 2000.

ELIZONDO, H. & LABUZA, T.P. Death kinetics of yeast in spray drying. *Biotechnology Bioengineering*, v. 16, p. 1245-1259, 1974.

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

ESGALHADO, M. E.; CALDEIRA, A. T.; ROSEIRO, J. C.; EMERY, A. N. Polysaccharide synthesis as a carbon dissipation mechanism in metabolically

uncoupled *Xanthomonas campestris* cells. *Journal of Biotechnology*, v.89, n.1, p. 55-63, 2001.

ESPINA, F.; PACKARD, V. S. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray-drying process. *Journal of Food Protection*, v. 42, n. 2. p. 149-152, 1979.

FAVARO-TRINDADE, C. S. AND GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal Microencapsulation*, v.19, n.4, p. 485-494, 2002.

FILKOVÁ, I., MUJUMDAR, A. S. Industrial Spray Drying Systems In: *Handbook of Industrial Drying*. Arun S. Mujumdar. Marcel Dekker Inc. New York. 742p. 1995.

FU, J. F.; TSENG, Y. H. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, n. 4, p. 919 – 923, 1990.

FUKUI, R.; ARIAS, R.; ALVAREZ, R. Efficacy of four semi-selective media for recovery of *Xanthomonas campestris* pv *campestris* from tropical soils. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 77, n. 5, p. 534-540, 1994.

FUNAHASHI, H.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H. Effect of glucose concentration on Xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Fermentation Technology*, v. 65, n. 5, p. 603-606, 1987.

GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMÍREZ, M. E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on Agar slopes: effects on xanthan production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, n. 5, p. 634-637, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; FRITSCH, A. P. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 14, n. 12, p. 991-996, 1992.

GIBSON, L. F.; KHOURY, J. T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Letters in Applied Microbiology*, v. 3, n. 6, p. 127-129, 1986.

GLICKSMAN, M. *Food hydrocolloids*. Boca Raton: CRC PRESS, 1982, v. 1, 202p.

GODET, P. Fermentation of polysaccharide gums. *Process Biochemistry*, v. 8, n. 1, p. 33-34, 1973.

GONZALES, R.; JOHNS, M. R.; GREENFIELD, P. F.; PACE, G. W. Xanthan gum precipitation using ethanol. *Process Biochemistry*, v. 24, n. 6, p. 200-203, 1989.

HARDING, N. E.; RAFFO, S.; RAIMONDI, A.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Identification, genetic and biochemical analysis of genes involved in synthesis of sugar nucleotide precursor of xanthan gum. *Journal of General Microbiology*, v. 139, part. 3, p. 447-457, 1993.

HECKLY, R. J. Preservation of microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, v. 24, p. 1-53, 1978.

IELPI, L.; COUSO, R. O.; DANKERT, M. A. Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 9, p. 2490 – 2500, 1993.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technology*, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, v. 45, p. 275-282, 1975.

JARMAN, T. R.; PACE, G. W. Energy requirements for microbial exopolysaccharides - New hydrocolloids of interest to the food industry. *Food Technology*, v. 28, n. 5, p. 34-40, 1974.

JARMAN, T. R.; PACE, G. W. Energy requirements for microbial exopolysaccharide synthesis. *Archives of Microbiology*, v. 137, p. 231-235, 1984.

JEANES, A.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. Agricultural Research Service - U. S. Department of Agriculture. ARS-NC-51, p. 1-14, 1976.

JOSIC, D. Optimization of process conditions for the production of active dry yeast. *Lebensmittel Wiss Und Technology*, v. 14, n. 1, 5-14, 1982.

KANG, k. s.; VEEDER, G. T.; COTTRELL, I. W. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. In: BUSHELL, M. E. *Progress in Industrial Microbiology*, v. 18, 1983.

KENNE, L.; LINDBERG, B. *Bacterial Polysaccharides*. In: ASPINAL, G. O. (ed), *The Polysaccharides*, v. 2, New York: Academic Press Inc., p.287-363, 1983.

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

KIDBY, D.; SANDFORD, P.; HERMAN, A.; CADMUS, M. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 33, n. 4, p. 840-845, 1977.

KIERCKBUSCH, T. G.; KING, C. J. Volatiles loss during atomization in spray drier. *AIChE Journal*, v. 26, n. 5, p. 718-725, 1980.

KIM, S. S. e BHOWMIK, S. R. Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yogurt. *Journal Food Science*, v. 55, p. 1008-1010, 1990.

KONÍČEK, J.; KONÍČKOVÁ-RADOCHOVÁ, M. Use of whey for production of exocellular polysaccharide by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. *Folia Microbiologica*, v. 37, n. 2, p. 102-104, 1992.

LABUZA, T. P.; FAN, T. S.; TANNENBAUM, S. R. *Biotechnology Bioengineering*, v. 12, p. 35, 1970.

LAWRENCE, A. A. Edible gums and related substances. *Food Technology Review*, n.9, Park Ridge, New Jersey, Noyes Data Corporation, 1973.

LECHEVALLIER, M. W.; SINGH A.; SCHIEMAN, D. A.; McFETTERS, G. A. Changes in virulence of waterborne enteropathogens with chlorine injury. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 412-419, 1985.

LETISSE, F.; CHEVALLEREAU, P.; SIMON, JEAN-LUC; LINDLEY, N. The influence of metabolic network structures and energy requirements on xanthan gum yields. *Journal of Biotechnology*, v.99, n.3, p. 307-317, 2002.

LIEVENSE, L. C. & van't RIET, K. Convective drying of bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 50, p. 46-60, 1993.

MASTERS, K. Spray drying handbook. *Drying Technology*, v.7, n.2, p. 419-425, 1989.

METWALLY, M. M.; Abd EL-GAWAD, I. A.; EL-NOCKRASHY, S. A. e AHMED, K. E. Spray drying of lactic acid culture I: the effect of spray drying conditions on the survival of microorganisms. *Egyptian Journal Dairy Science*, v.17, p. 35-43, 1989.

MOCHI, A. C.; SCAMPARINI, A. R. P. Xanthan gum production from Brazilian strains. In: NISHINARI, K.; DOI, E. (ed.) *Food Hydrocolloids*. New York, Plenum Press, p. 147-150, 1993.

MORAINE, G. J. & ROGOVIN, P. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 8, p. 511-524, 1966.

MORAINÉ, G. J. & ROGOVIN, P. Kinetics of xanthan fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. XV: 225-237, 1973.

MORAINÉ, R. A. e ROGOVIN, P. Growth of *Xanthomonas campestris* is not simply nutrient-limited. *Canadian Journal of Microbiology*, v.17, p. 1473-1474, 1971a.

MORAINÉ, R. A. e ROGOVIN, P. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. *Biotechnology and Bioengineering*, v.XIII, p.381-391, 1971b.

ORENTAS, D. G.; SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Pyruvic acid content and constituent sugars of exocellular polysaccharides from different species of the genus *Xanthomonas*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 9, n. 1, p. 427-430, 1963.

PACE, G. W. AND RIGHELATO, R. C. Production of extracellular microbial polysaccharides. *Advances in Biochemical Engineering*, v.15, 41-69, 1980.

PETTERS, H.-U; SUH, I. S.; SCHUMPE, A.; DECWER, W. D. Modelling of batchwise xanthan production. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 70, n. 4, p. 742-750, 1992.

PETTITT, D. J. Xanthan gum In: GLICKSMAN, M. (ed) *Food Hydrocolloids*, v. 1, CRC Press, cap. 5, p. 128-149, 1982.

PINCHES, A.; PALLENT, L. J. Rate and yield relationship in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. *Biotechnology and Bioengineering*, v. XXVIII, n. 10, p. 1484-1496, 1986.

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

PRAJAPATI, J. B.; SHAH, R. K. & DAVE, J. M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in blended - spray dried acidophilus preparations. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 42, n.1/2, p. 17-21, 1987.

RAMÍREZ, M. E.; FUCIKOVSKY, L.; JIMENEZ, G.; QUINTERO, R.; GALINDO, E. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n.1, p. 5-10, 1988.

REINECCIUS, G. A. Controlled release techniques in food industry. In: REINECCIUS, G. A.; RISCH, S. J. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. (eds) ACS symposium Series n. 590. American Society, 1995.

REINECCIUS, G. A.; COULTER, G. Flavor retention during drying. *Journal Dairy Science*, v. 52, n. 8, 1969.

RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated orange oil. In: REINECCIUS, G. A.; RISCH, S. J. *Flavor encapsulation* (eds) ACS Symposium Series n. 370. American Chemical Society, 1988.

ROGERS, L. A. The preparations of dried cultures. *Journal of infections Diseases*, v.14, p.100-123, 1914.

ROGOVIN, S. P.; ANDERSON, R. F.; CADMUS, M. C. Production of polysaccharide with *Xanthomonas campestris*. *Journal of Biochemistry and Microbiology Technology*, v.3, p.51-62, 1961.

ROSEIRO, J. C.; GIRIO, F. M.; KARA, A.; COLLAÇO, M. T. A. Kinetic and metabolic effects of nitrogen, magnesium and sulphur restriction in *Xanthomonas campestris* batch cultures. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 75, n.4, p.381-386, 1993b.

ROSEIRO, J.C.; EMERY, A. N.; SIMÕES, P.; ESTEVÃO, F.; COLLAÇO, M. T. A. Production of xanthan by in-flow cultures of *Xanthomonas campestris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 38, n.6, p. 709-713, 1993a.

RULKENS, W. H. E THIJSSSEN, H. A. C. Retention volatile compounds in freeze-drying slabs of maltodextrin. *Journal Food Technology*, v.7, n.1, 1972.

RYE, A. J.; DROZD, J. W.; JONES, C. W.; LINTON, J. D. Growth efficiency of *Xanthomonas campestris* in continuous culture. *Journal of General Microbiology*, v. 134, n. 4, p. 1055 – 1061, 1988.

SALCEDO, G. RAMÍREZ, M. E.; FLORES, C.; GALINDO, E. Preservation of *Xanthomonas campestris* in *Brassica oleracea* seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 5, p. 723-727, 1992.

SALIB, N. A review of microencapsulation. *Pharmaceutical Industry*, v. 39, n. 5, p. 506-512, 1997.

SANCHÉZ, A.; MARTINEZ, A.; TORRES, L.; GALINDO, E. Power consumption of three impeller combinations in mixing xanthan fermentation broths. *Process Biochemistry*, v. 27, n. 6, p. 351-365, 1992.

SCAMPARINI, A. R. P.; VENDRUSCOLO, C.; MALDONADE, I.; DRUZIAN, J.; MARIUZZO, D. New biopolymers produced by nitrogen fixing microorganism for use in foods. Hydrocolloids. Part 1. *Physical Chemistry Industrial Application of Gels Polysaccharides, and Proteins*. Edited by Katsuyoshi Nishinari. Osaka City University, Osaka, Japan. 169 – 178, 2000.

SCHWARTZ, R. D.; BODIE, E. A. Production of high-viscosity whey-glucose broths by a *Xanthomonas campestris* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v.51, n. 1, p. 203-205, 1986.

SECEX – SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Mercadoria: 391390020 – Goma xantana em formas primárias. Período 01/2002 a 12/2002.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Encapsulation of food ingredients. *Critical Review in food Science and Nutrition*, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

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

SILMAN, R. W.; ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.XII, p. 75-83, 1970.

SILMAN, R. W.; ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate. *Biotechnology and Bioengineering*, v. XIV, p. 23-31, 1972.

SLONEKER, J. H.; ORENTAS, D. G.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. III. Structure. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 42, p. 1261-1269, 1964.

SMILEY, K. L. Microbial polysaccharides – A review. *Food Technology*, v. 20, n. 9, p. 112-116, 1966.

SNELL, J. J. S. *General introduction to maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods*. 2ed London: Academic Press Inc, p. 21-30, 1991.

SOUW, P.; DEMAİN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B 1459. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 37, n. 25, p. 131-143, 1979.

SPARKS, R. E. Microencapsulation. In: *KIRK-OTHMER Encyclopedia of Chemical Technology*, 3 ed. John Wiley and Sons. New York, v. 15, 470 p. 1981.

STARR, M. P. The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutritive requirements of the genus *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*, v.51, n. 25, p.131-143, 1946.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L.; BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, v.34, n.1, p. 11-16, 1999.

SUH, I. S.; SCCHUMPE, A.; DECKWER, W. D. Xanthan production in bubble column and air-lift reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 39, n. 1, p. 85-94, 1992.

SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methylcellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 42, n. 5, p. 872-877, 1981.

SUTHERLAND, I. W. An enzyme system hydrolyzing the polysaccharides of *Xanthomonas* species. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 53, n. 3, p. 385-393, 1982a.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. In: ROSE, A. H.; MORRIS, J. G. (ed), *Advances in Microbial Physiology*, v. 23, London: Academic Press Inc., p. 79-150, 1982b.

SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysaccharides-potential. *Process Biochemistry*, v. 7, n.11, p.27-30, 1972.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, v. 11, p. 663-674, 2001.

SUTHERLAND, I. W. The role acylation in exopolysaccharides including those for use. *Food Biotechnology*, v. 6, n.1, p. 75-86, 1992.

SUTHERLAND, I. W.; MACDONALD, R. M. Extracellular enzyme isolation and purification from exopolysaccharide-producing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, v.6, n.1, p. 27-31, 1986.

SUTTON, J.C.; WILLIAMS, P.H. Comparison of extracellular polysaccharide of *Xanthomonas campestris* from culture and from infected cabbage leaves. *Canadian Journal of Botany*, v. 48, p. 645-651, 1970.

TAIT, M. I.; SUTHERLAND, I. W. Synthesis and properties of a mutant type of xanthan. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 66, n. 5, p. 457-460, 1989.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H. & KIRBY, R. Spray drying as method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of applied bacteriology*, v. 78, n. 4, p. 456-462, 1995a.

TEIXEIRA, P. C.; CASTRO, M. H.; MALCATA, F. X. & KIRBY, M. R. Survival of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* following spray drying. *Journal Dairy Science*, v. 78, p. 1025-1031, 1995b.

THOMSON, N.; OLLIS, D. F. Extracellular microbial polysaccharides. II. Evolution of broth power-law parameters for xanthan and pullulan batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. XXII, p. 875-883, 1980.

VANDAME, E. J.; BRUFFEMAN, G.; BAETS, S.; VANHOOREN, P. T. Useful polymers of microbial origin. *Agro Food Industry Hi-Tech.*, v.7, n.5, p. 21-25, 1996.

VASHITZ, O.; SHEINTUCH, M. Analysis of polymer synthesis rates during steady-state growth of *X. campestris*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 37, n. 4, p. 383-385, 1991.

WHORTON, C. Factors influencing volatile release from encapsulation matrices. *ACS Symposium Series*, n. 590, p. 134-142, 1995.

WHORTON, C.; REINECCIUS, G. A. Evaluation of mechanisms associated with the release of encapsulated flavor materials from maltodextrin matrices. *ACS Symposium Series*, n. 590, p. 143-160, 1995.

**Preparação do concentrado celular de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis*
cepa 280 utilizando o método de secagem por atomização**

Cristina Maria Rodrigues da Silva, Maria Cândida Maia Mellado, Adilma Regina
Pippa Scamparini.

CAPÍTULO 2

Preparação do concentrado celular de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280 utilizando o método de secagem por atomização

Cristina Maria Rodrigues da Silva, Maria Cândida Maia Mellado, Adilma Regina Pippa Scamparini.

RESUMO

A utilização da técnica de secagem por atomização como método de preservação de culturas concentradas de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 foi estudada, visando à manutenção da viabilidade celular e da capacidade de produção de goma xantana.

A fim de investigar a viabilidade da bactéria durante o processo de secagem por atomização, os efeitos das condições de crescimento, os diferentes fluidos de suspensão e reidratação na taxa de sobrevivência das células após a secagem por atomização, foram estudados. A mais alta taxa de sobrevivência celular foi obtida, quando leite desnatado reconstituído 10% como meio de suspensão e água destilada como fluido de reidratação da cultura concentrada atomizada, foram utilizados. Considerando as condições estudadas, a temperatura do ar de entrada no spray drier de 135°C e temperatura do ar de saída de 75°C, obteve-se 98,42% de sobrevivência celular após secagem por atomização. Inoculando o concentrado celular atomizado em meio de fermentação contendo 2% de sacarose foram produzidos 13,86g/L de goma xantana, o que indica um aumento significativo na produção deste polissacarídeo em relação à produção de goma xantana através de concentrados convencionais. A combinação de maltodextrina DE 20 (30%) e goma arábica (10%) resultaram em maior proteção ao concentrado celular e maior taxa de recuperação de células viáveis.

Palavras chaves: *Xanthomonas*, secagem por atomização, viabilidade celular, preservação.

SUMMARY

The use of spray drying as a preservation method of *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* strain 280 cells was studied aiming to maintain cellular viability and capability to produce xanthan gum.

In order to investigate cells survival during spray drying process, the effects of growth conditions, different suspending and rehydration fluids on the concentrated cells survival rate after atomization were determined.

The highest viability rate was found, when skim milk 10% as cells suspension media and distilled water as rehydration fluid were used. Considering culture conditions, inlet air temperature of 135°C and outlet air temperature of 75°C, approximately 98,42% of survival rate was found. When this spray dried concentrated cells were inoculated in fermentation media containing 2% sucrose, it was produced 13,86g/L of xanthan gum per liter of broth. This data indicates a significant increase in the exopolysaccharide production.

The maltodextrin 20 DE (30%) and gum arabic (10%) blend provide protection concentrated cells resulting to further viable cells recover.

Key Words: *Xanthomonas*, spray drying, cells viability, preservation.

INTRODUÇÃO

A possibilidade de preservar culturas através de secagem teve início com os estudos de Rogers (1914) que investigou a secagem de bactérias láticas. A preservação de bactérias através da técnica de secagem por atomização, visando facilitar a manipulação, expedição e armazenagem das culturas sem perda da sua atividade, também foi estudada por Prajapati et al. (1987).

Devido ao grande número de aplicações dessas culturas nas indústrias de alimentos, faz-se necessária a obtenção de culturas bacterianas estáveis e altamente viáveis (Lievense e van't Riet, 1993). Na escolha do método de preservação do microrganismo, deve-se levar em consideração a finalidade a que se destina e particularmente as características como manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento, ausência de perda das culturas, o controle eficiente da pureza, evitando qualquer fonte de contaminação, os custos com os materiais e com os equipamentos e a frequência do uso do microrganismo preservado. É pouco provável que um único método apresente as condições ideais para todas as linhagens de uma coleção de cultura destinada à indústria ou a investigação científica (Snell, 1991).

No Brasil são encontradas diferentes cepas de bactérias do gênero *Xanthomonas* armazenadas sob refrigeração em ágar inclinado ou liofilizadas, contudo pouco se conhece sobre as condições para preparação e manutenção dessa cultura como concentrado através de secagem por atomização.

De acordo com Teixeira et al. (1994), a observação das características específicas de cada bactéria pode ajudar na eficiência da liofilização durante a produção de culturas "starters". É interessante verificar a resistência da cultura ao choque térmico, a fase de crescimento em que as bactérias são menos sensíveis aos processos adversos sofridos durante o congelamento e a secagem, o controle do processo de reidratação e a preservação da membrana das células.

Por causa do resfriamento evaporativo na primeira parte do processo de secagem, a sobrevivência das células bacterianas durante atomização está intimamente correlacionada à temperatura do ar de saída e não diretamente a temperatura de

entrada do *spray drier*. O Objetivo deste trabalho foi investigar a preservação do concentrado celular de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 através do processo de secagem por atomização e também os fatores que influenciam a manutenção da viabilidade e a capacidade de produção de goma xantana pela bactéria após atomização.

MATERIAL E MÉTODOS

Preservação e manutenção do microrganismo

Nesse experimento foi utilizada a linhagem nº 280 de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* liofilizada e armazenada a baixa temperatura. Quando necessário, as culturas foram reativadas e transferidas para tubos de ensaio contendo meio ágar YM inclinado. A cultura pura foi mantida no ágar YM em tubo inclinado, sob refrigeração e repicada periodicamente durante o experimento.

Preparo do concentrado celular

Uma alçada padrão (alça de platina com 3,0mm de diâmetro) da cultura bacteriana, crescida em ágar YM inclinado, foi inoculada em caldo YM e incubado a 30°C por 40 horas a 200 rpm. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada a 16.000g por 30 minutos em centrífuga refrigerada marca Shimadzu, modelo CR21 a temperatura de 5°C. O sobrenadante foi descartado e o concentrado celular foi resuspendido com água esterilizada por três vezes, para lavagem das células. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, obteve-se o concentrado celular padronizado para o *spray drier*.

Determinação da curva de crescimento

Para determinação da curva de crescimento da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* linhagem nº 280, foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YM padrão inoculados com 1% do concentrado inicial reidratado com água destilada. Em seguida, a cada intervalo de tempo foram coletadas amostras para avaliação dos seguintes parâmetros de crescimento: pH final, crescimento celular, teor de açúcares redutores totais e quantidade de goma xantana.

Determinação do pH final no meio de crescimento

Depois de retirada cada amostra, foi feita a leitura do pH em potenciômetro marca DIGIMED, modelo DMPH-2.

Determinação do crescimento celular

Para essa determinação a amostra foi centrifugada a 16000 x g por 30 minutos a 5°C. A cada intervalo de tempo a massa celular obtida na centrifugação foi lavada com água destilada estéril, outra vez centrifugada e levada à estufa à 55°C, após esse procedimento a amostra foi deixada em dessecador para resfriar, sendo pesada até peso constante.

Determinação da influência do tempo de crescimento celular.

A influência do tempo de crescimento celular na sobrevivência da bactéria foi determinada de acordo com Teixeira et al. (1995) e Baiocco (1997).

Determinação da influência do meio de suspensão celular, do tempo e fluido de reidratação do concentrado celular.

A influência do meio de suspensão celular, do tempo e do meio de reidratação celular foi determinada segundo os procedimentos descritos em (Choate e Alexander, 1967; Teixeira et al. 1995; Baiocco, 1997).

Determinação do teor de açúcares totais

Para determinação do teor de açúcares totais foi empregada a técnica do DNS (Miller, 1959). O valor de absorbância obtido de cada amostra foi convertido em açúcares redutores totais utilizando uma curva padrão de açúcares redutores em função dos valores de absorbância, previamente estabelecida. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro Beckman DU 70. O branco foi feito substituindo a amostra hidrolisada por 1,0 ml de água destilada.

Determinação da goma xantana

Após inoculação das células em meio de produção de goma (Mochi e Scamparini, 1993) ou caldo YM, as amostras após 120 horas ou 48 horas de fermentação foram centrifugadas para separação das células do caldo e a goma foi precipitada do sobrenadante com etanol na proporção de 1 parte de sobrenadante e 3 partes de etanol. A goma precipitada foi filtrada e seca em estufa a 55°C, até peso constante. O rendimento de goma xantana foi calculado segundo Jeanes et al. (1967).

Condições de operação do *spray drier* no processo de atomização

Suspensão de leite desnatado reconstituído 10% (Skim Milk – marca DIFCO), maltodextrina (Corn Products Brasil) e de goma arábica (Spray Gum IRX 28830,

Colloids Naturels Brasil Comercial LTDA) em água destilada estéril foram inoculadas com o concentrado celular de culturas de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* linhagem nº 280. A suspensão foi incubada a 30°C por 30 minutos para melhor adaptação da cultura, sob agitação, e então atomizadas em “Spray dryer” modelo SD 04 (Lab-Plant, Huddersfield, UK), pressão do ar 5,0 kg/cm², fluxo da bomba peristáltica 5 mL/min e diâmetro do bico aspersor igual a 0,5 mm. A temperatura de entrada do ar foi de 135°C, e a temperatura de saída foi de (75, 85 e 90°C). Cada amostra foi reidratada ao volume original com água estéril a temperatura ambiente. As células foram agitadas por 10 minutos em “Shaker – New Brunswick Scientific Co, modelo G25”. A Figura 1 mostra o equipamento utilizado para microencapsulação de células de *X. campestris* pv *manihotis* nº 280.



Figura 1. Sistema de secagem por atomização para a produção do concentrado celular de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.

Contagem de microrganismos e cálculo da taxa de sobrevivência celular

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

Para contagem dos microrganismos as amostras foram submetidas a diluições decimais em série, transferindo-se 1,0 mL da amostra reidratada para tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril, sucessivamente, até as diluições desejadas. As amostras foram plaqueadas em superfície de ágar YM. Todos os testes de contagem foram feitos em triplicata. Os resultados foram expressos em Log Unidades Formadoras de Colônias por mL (Log UFC/mL).

A sobrevivência foi calculada com relação à concentração inicial de células presentes no concentrado e os resultados foram expressos em porcentagem de acordo com Choate e Alexander (1967).

Todos os ensaios foram realizados em três repetições.

Os resultados foram analisados por comparação de médias com base no teste de Tukey com ajuda do software ASSISTAT (Assistência Estatística – Prof. Francisco de Assis Santos Silva – UFPB).

RESULTADOS

A influência da fase de crescimento é um fator importante quando se deseja maior recuperação da viabilidade celular de bactérias. Após 40 horas de incubação a 30°C e 200 rpm as células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 apresentaram maior resistência ao processo de secagem por atomização (Tabela 1). Neste estudo, os concentrados foram produzidos com células cultivadas em caldo YM, centrifugadas, resuspensas em leite desnatado reconstituído 10% e reidratadas com água destilada.

Tabela 1 - Influência da fase de crescimento na sobrevivência de células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 durante o processo de secagem por atomização.

	Tempo (horas de incubação)		
	24	40	48
Log UFC/mL*	3,59c	8,74a	7,48b

^{a,b,c} Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (p<0,05)

* UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônias por mL

Concentração inicial de células $7,6 \times 10^8$ UFC/mL

Assim como o meio de crescimento é essencial para o crescimento celular, o meio de reidratação se constitui fator de importância no desempenho das culturas submetidas a condições subletais. A Tabela 2 mostra a Influência do meio de reidratação na viabilidade da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.

Tabela 2 - Influência do meio de reidratação na viabilidade do concentrado celular de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.

Meio de reidratação	Log UFC/mL*	MCS (g/L)	Goma xantana (g/L)	ART (g/L)	Rendimento de goma (%)
Água destilada	8,74 a	0,44	13,86	1,21	69,45
Caldo YM	5,40 b	1,78	3,46	7,70	17,30
Solução de sacarose 10%	5,43 b	2,35	4,23	7,35	21,15

^{a, b} Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (p<0,05)

* UFC/mL

MCS = Massa Celular Seca

ART = Açúcares Redutores Totais

Células cultivadas em caldo YM, centrifugadas, resuspensas em leite desnatado reconstituído 10% e reidratadas com água destilada. Demais resultados obtidos após 120 horas de incubação em meio de produção de goma.

Concentração inicial de células $7,6 \times 10^8$ UFC/mL

A utilização de procedimentos inadequados na reidratação das células secas pode resultar em perda total da viabilidade celular (Josic, 1982). Para avaliar o tempo ótimo de reidratação, as células foram cultivadas em caldo YM, centrifugadas, resuspensas em leite desnatado reconstituído 10% e reidratadas com água destilada. O tempo de 10 e 20 minutos na reidratação das células resultou em redução logarítmica de 0,14 e 0,34 respectivamente. A Tabela 3 mostra o efeito do tempo de reidratação na sobrevivência das células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.

Tabela 3 - Efeito do tempo de reidratação na recuperação das células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.

	Tempo de reidratação (minutos)			
	5	10	20	30
Log UFC/mL*	5,73b	8,74a	8,54a	5,67b

a, b, c Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ($p < 0,05$).

*UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônias por mL.

Concentração inicial de células foi $7,6 \times 10^8$ UFC/mL.

O efeito do pH no meio de crescimento constitui-se um dos principais fatores para o crescimento celular. Portanto, o ajuste do pH do meio de reidratação também influencia na recuperação das células viáveis como mostrado na Figura 2.

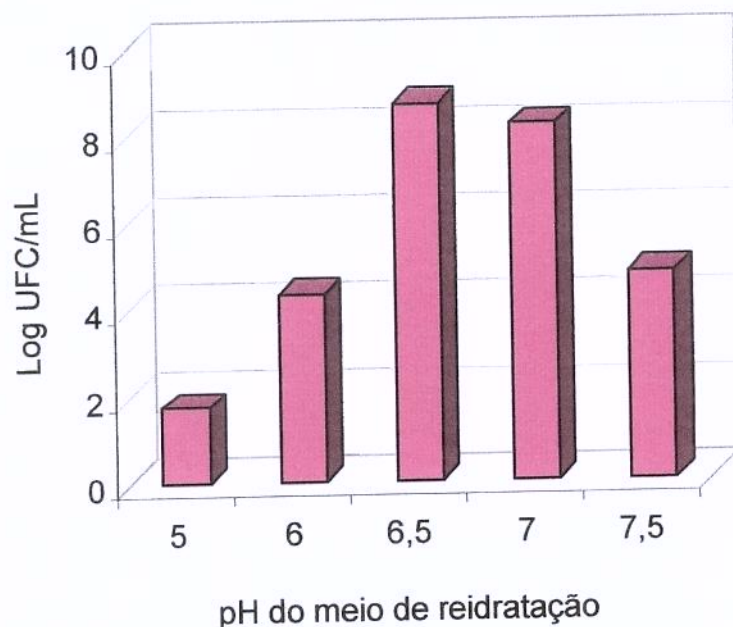


Figura 2 - Efeito do pH do meio de reidratação na sobrevivência das células de *X. campestris pv manihotis* cepa 280.

O meio de suspensão é essencial para prevenir a secagem excessiva da cultura e proteger as células dos danos mecânicos e físicos que ocorrem durante a liofilização e o armazenamento (Font de Valdéz e Giori, 1993). Neste experimento a viabilidade celular foi marcadamente influenciada pelo meio de suspensão das células. A influência do meio de suspensão na sobrevivência de *X. campestris pv manihotis* cepa 280 após o processo de secagem por atomização encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Influência do meio de suspensão na sobrevivência celular do concentrado atomizado de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.

Meios de suspensão celular	Log UFC/mL*	MCS (g/L)	Goma xantana (g/L)	ART (g/L)
Leite desnatado reconstituído 10%	8,74a	0,44	13,86	1,21
Caldo YM	5,85b	1,77	5,23	5,20
MD (30%) + GA (10%)	5,53c	2,71	3,54	5,86

*a, b, c Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ($p < 0,05$)

*UFC/mL obtidas 48 horas após o processo de secagem por atomização.

MD = Maltodextrina

GA = Goma arábica

Células cultivadas em caldo YM. Meio de reidratação foi água destilada. Demais resultados foram obtidos após 120 horas de incubação em meio de produção de goma. Concentração inicial das células foi $7,6 \times 10^8$ UFC/mL

A Influência da temperatura do ar de saída do spray drier na sobrevivência da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 foi estudada. Neste experimento as células foram cultivadas em caldo YM, centrifugadas, resuspensas em leite desnatado reconstituído 10% e reidratadas com água destilada. A utilização de temperatura mais baixa foi significativamente diferente ($p < 0,05$). A Tabela 5 mostra o efeito da temperatura do ar de saída na recuperação das células.

Tabela 5 - Influência da Temperatura do ar de saída do *spray drier* na sobrevivência de células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.

Temperatura (°C)	Log UFC/mL ¹	MCS (g/L)	Goma (g/L)	ART ² (g/L)	Rendimento de goma (%)
75	8,74a	0,44	13,89a	1,21	69,45
85	8,66b	0,53	13,57b	1,81	67,85
90	8,52b	0,52	13,54b	1,79	67,70

a,b,c Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ($p < 0,05$)

¹ UFC = Unidades Formadoras de Colônias.

ART = Açúcares Redutores Totais

Células cultivadas em meio YM e resuspensas em leite desnatado. O meio de reidratação foi água destilada. Demais resultados foram obtidos após 120 horas de incubação em meio de produção de goma. Concentração inicial de células foi $7,6 \times 10^8$ UFC/mL.

DISCUSSÃO

Diversos fatores estão envolvidos na sobrevivência de microrganismos após o processo de secagem por atomização. Assim a influência das condições de crescimento da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 durante o processo foi estudada. Fatores como os nutrientes presentes no meio de crescimento, o pH, a temperatura, a fase de crescimento das culturas, influenciam o crescimento celular e também a taxa de sobrevivência (Busta, 1978). As células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após 40 horas de incubação, fase estacionária de crescimento, foram mais resistentes ao processo de secagem por atomização do que as células com 24 e 48 horas. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo com *L. bulgaricus* em leite desnatado em diferentes temperaturas (Teixeira, 1994; 1995). Segundo Gehrke et al. (1992), este efeito pode ser atribuído a maior espessura da parede celular em células que estão na fase estacionária de crescimento e que, portanto, não mais passam pelo processo de divisão celular. Segundo Baiocco (1997) os inóculos liofilizados contendo células recuperadas após 40 horas de incubação apresentaram 80,33% de sobrevivência celular, enquanto que as células recuperadas após 12 horas de incubação apresentaram somente 12 % de sobrevivência celular. Uma correlação direta entre a fase de crescimento da cultura de *E. coli* e a taxa de células sobreviventes após liofilização foram obtidas por Heckly (1961), a sobrevivência aumentou de 0,02% para uma cultura de 1,25 horas para 12,9% para uma cultura de 18 horas de incubação.

A reidratação é uma das etapas mais importantes que influenciam a sobrevivência dos microrganismos. Nesta etapa inúmeras mudanças ocorrem na concentração dos solutos. Estas mudanças afetam não apenas o equilíbrio osmótico das células como também podem afetar os componentes celulares específicos dos organismos (Choate e Alexander, 1967). Água destilada foi o melhor meio de reidratação para o concentrado celular de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após o processo de secagem por atomização, resultando uma maior recuperação de células viáveis. A liberação da bactéria da matriz contendo maltodextrina e goma arábica pode ter sido influenciada pelo grau de intumescimento da cápsula e a capacidade de penetração

do solvente em hidrocolóides. Segundo Worton (1995), a liberação de conteúdo das microcápsulas pode ocorrer através de ruptura mecânica, da ação da temperatura, pH, solubilidade do meio, biodegradação e também por difusão. Para Karel e Buera (1994), a difusão é influenciada pelo grau de intumescimento da cápsula que pode ocorrer pela adsorção de água ou outro solvente provocando o aumento dos poros e dos espaços livres. Segundo Baiocco (1997) inóculos liofilizados e reidratados com água destilada obtiveram 35,66% de sobrevivência celular e 68,33% quando o meio de reidratação foi solução de sacarose 10%. Teixeira et al. (1995) não encontrou diferença significativa quando água deionizada, tampão fosfato, caldo MRS e leite desnatado foram utilizados como meio de reidratação. Ray et al. (1971) obteve resultados semelhantes durante a reidratação de *Salmonella anatum* liofilizada e propôs que leite desnatado pode ter suplementado os nutrientes necessários às células com injúrias. Neste estudo caldo YM, solução de sacarose 10% como meio de reidratação contribuíram para a recuperação das células, porém com contagem mais baixa de células viáveis. Interação entre os meios e os componentes da matriz pode ter dificultado a liberação das células no meio. Segundo Beuchat (1978) a capacidade das células em reter a viabilidade quando expostas a um ambiente com maior ou menor concentração de solutos depende da integridade da membrana celular. Durante um choque osmótico podem ocorrer perdas de proteínas associadas às membranas, tais como as proteases e conseqüentemente, provocar uma diminuição na viabilidade das células.

As condições de reidratação também influenciam a sobrevivência das células. Determinados procedimentos de reidratação podem resultar em baixa taxa de recuperação das células. Dentre as condições, o tempo de reidratação e o pH do meio foram avaliados. O tempo de reidratação de 10 e 20 minutos resultou em maior recuperação de células viáveis. Com 30 minutos de reidratação, a sobrevivência decaiu cerca de três ciclos logarítmicos. Para *Leuconostoc mesenteroides* a taxa de sobrevivência foi de 70% após 10 minutos de reidratação e de 57% após 30 minutos de exposição ao fluido reconstituente (Font de Valdéz et al., 1985a). A capacidade de fermentação das leveduras desidratadas foi destruída pela utilização de procedimentos de reidratação que aparentemente não afetavam a viabilidade celular.

Métodos especiais de reidratação foram necessários para a retenção das propriedades de fermentação (Leach e Scott, 1959). Em alguns organismos, os fluidos de reidratação podem regular a velocidade na qual a água entra nas células, enquanto que em outras cepas podem provocar fenômenos osmóticos desfavoráveis (Leach e Scott, 1959; Font de Valdéz, 1985c). O tempo de 10 minutos foi importante na adaptação da cultura para posterior secagem.

Neste estudo mostrou-se a importância do pH do meio de reidratação na sobrevivência das células após o processo de secagem por atomização. Os resultados obtidos neste experimento estão de acordo com os resultados encontrados por Baiocco (1997) para a bactéria *X. campestris* pv *manihotis* liofilizada. Para os concentrados de *X. campestris* pv *manihotis* obtidos após secagem por atomização o pH ótimo do meio de reidratação foi 6,5 com a maior contagem de células viáveis. As taxas de sobrevivência mais baixas encontradas em meios com valores de pH mais ácidos do que alcalinos, deve-se possivelmente aos componentes da parede celular serem mais suscetíveis à degradação em meio ácido do que em meio básico. Deve-se considerar ainda, que o cátion da base e o ânion do ácido utilizado para ajustar o pH do meio pode interferir nos resultados (Baiocco, 1997).

Desde que a técnica de secagem por atomização envolve a utilização de temperaturas altas, o meio de suspensão das células deve protegê-las durante o processo. O melhor meio de suspensão celular para produção de concentrados de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 foi o leite desnatado reconstituído 10%, com recuperação de 98,42% das células viáveis. Nenhuma diferença significativa na taxa de sobrevivência ocorreu quando caldo YM, solução de sacarose 10% e suspensão contendo maltodextrina 30% e goma arábica 10% foram usadas como meio de suspensão das células. Segundo Gehrke et al. (1992), durante a liofilização, os danos não ocorrem na fase de sublimação, mas durante a fase de desorção da água e são devidos a super secagem das amostras. O maior ou menor grau de comprometimento das estruturas celulares que ocorre nesta etapa depende diretamente da composição do meio de suspensão utilizado. A utilização de leite desnatado reconstituído 10% como meio de suspensão apresenta a vantagem de

oferecer suplementação de nutrientes, proteção e facilidade de desidratação. As proteínas presentes no leite desnatado reconstituído fornecem uma matriz protetora para as macromoléculas celulares danificadas durante os processos de preservação. Embora a sacarose seja recomendada como um agente adequado para substituir o leite desnatado, neste estudo a recuperação das células e a capacidade de produção de goma foram baixas. A adição de compostos que influenciam a taxa de secagem ou nível de umidade residual e de água disponível no produto pode certamente influenciar a taxa de sobrevivência das culturas (Font de Valdéz et al., 1985c). Os mecanismos de ação dos agentes protetores ainda não estão bem esclarecidos. Sabe-se que agentes como a sacarose e o leite desnatado reconstituído na liofilização, altera as características de permeabilidade da membrana celular permitindo o fluxo de solutos do meio extracelular para o meio intracelular durante processos de congelamento e o fluxo inverso durante o descongelamento das suspensões. Assim, a eficiência dos agentes está na sua capacidade em permitir a perda de solutos, reversivelmente, pela membrana durante um choque osmótico (Meryman, 1971).

A taxa de sobrevivência ou destruição da bactéria durante a secagem por atomização pode depender do binômio temperatura –tempo utilizados no processo e também da resistência do organismo ao calor. A maior taxa de sobrevivência do concentrado celular de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 foi observado na temperatura de 75°C com 98,42% de células viáveis e 13,86g/L de goma xantana. O aumento de temperatura para 85 e 90°C não teve efeito significativo na sobrevivência e capacidade de produção de goma do concentrado celular após atomização. Segundo Lievense e van't Riet (1993) por causa do resfriamento evaporativo na primeira parte do processo de secagem por atomização, a sobrevivência da bactéria está correlacionada a temperatura do ar de saída e não diretamente a temperatura do ar de entrada do secador. Favaro-Trindade e Grosso (2002) também encontraram maior sobrevivência nas menores temperaturas de entrada e saída do ar, sendo $1,8 \times 10^8$ UFC/g antes do processo e $1,3 \times 10^8$ UFC/g após o processo de atomização. Os resultados obtidos neste experimento demonstram que o processo de secagem por atomização pode ser utilizado como método de preservação de concentrados

celulares de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280. Os fatores como a fase de crescimento, os fluidos de suspensão celular e de reidratação do concentrado foram essenciais na recuperação dos danos celulares causados durante o processo de secagem por atomização.

CONCLUSÕES

A preservação da bactéria *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* nº 280 através da técnica de secagem por atomização apresenta a vantagem de facilitar a manipulação, evitando os diversos repiques da cultura, e também o transporte.

A utilização de leite desnatado reconstituído 10% como meio de suspensão é de fundamental importância quando se deseja a proteção das células de secagem excessiva.

A água destilada como meio de reidratação associada a um tempo de 10 minutos de reidratação são fatores importantes na liberação das células da matriz contendo maltodextrina e goma arábica.

Na temperatura de entrada do ar de 135°C e temperatura do ar de saída no spray drier de 75°C resultou numa maior recuperação de células viáveis, porém não parece refletir na quantidade de goma produzida.

Considerando que a bactéria utilizada neste experimento já havia sido liofilizada pela segunda vez, os procedimentos aplicados neste experimento foi satisfatório quanto à manutenção da viabilidade celular e da capacidade de produção de goma xantana do concentrado celular de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIOCCO, L.M. Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*. Tese de Mestrado. 1997. UNICAMP, 184P.

BEUCHAT, L. R. Injury and repair of Gram – negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. *Advances in Applied Microbiology*, v.23, p. 219 – 243, 1978.

BUSTA, F. F. Introduction to injury and repair of microbial cells. *Advances in Applied Microbiology*, v.23, p. 195-201, 1978.

CHOATE, R. V.; ALEXANDER, M. T. The effect of the rehydration temperature and rehydration medium on the viability of freeze-dried *Spirillum atlanticum*. *Cryobiology*, v.3, n.5, p. 419-422, 1967.

FAVARO-TRINDADE, C. S. AND GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal Microencapsulation*, v.19, n.4, p. 485-494, 2002.

FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G. S.; RUIZ HOLGADO, A. P.; OLIVER, G. Rehydration conditions and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Cryobiology*, v.22, n.6, p. 574-577, 1985a.

FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G. S. Effect of freezing and thawing on the viability and uptake of aminoacids by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Cryobiology*, v. 30, n.3, p. 329-334, 1993.

FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G. S. RUIZ HOLGADO, A. P.; OLIVER, G. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, n.2, p. 413-415, 1985c.

GEHRKE, H. H.; PRALLE, K.; DECWER, W. D. Freeze drying of microorganisms- influence of cooling rate on survival. *Food Biotechnology*, v.6, n.1, p. 35-49, 1992.

HECKLY, R. J. Preservation of bacteria by lyophilization. *Advances in Applied Microbiology*, v.3, p. 1-76, 1961.

JEANES, A.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. Agricultural Research Service - U. S. Department of Agriculture. ARS-NC-51, p. 1-14, 1976.

JOSIC, D. Optimization of process conditions for the production of active dry yeast. *Lebensmittel Wiss Und Technology*, v. 14, n. 1, 5-14, 1982.

KAREL, M. and BUERA, M. P. Glass Transition and its potential effects on kinetics of condensation reactions and in particular on non-enzymatic browning. In: The Maillard Reactions in Chemistry Food and Health; Labuza, T. P.; Reineccius, G. A.; Monier, V. M.; O'Brien, J. M.; Baynes, J. W. eds. Royal Chemistry Society, 1994.

LEACH, R. H.; SCOTT, W. J. The influence of rehydration on the viability of dried microorganisms. *Journal of General Microbiology*, v.21, n.2, p. 295-307, 1959.

LIEVENSE, L. C. & van't RIET, K. Convective drying of bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 50, p. 45-63, 1991.

MERYMAN, H. T. Cryoprotective agents. *Cryobiology*, v.8, n.2, p. 173-183, 1971.

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

RAY, B.; JEZESKI, J. J. and BUSTA, F. F. Effect of rehydration on recovery, repair and growth of injured freeze-dried *Salmonella anatum*. *Applied Microbiology* v.22, p. 184-189, 1971.

ROGERS, L. A. The preparations of dried cultures. *Journal of infections Diseases*, v.14, p.100-123, 1914.

SILVA, F. de A. S. e. The ASSISTAT software: statistical assistance. In: International Conference on Computers in Agriculture, v.6, Cancun, 1996. Anais...Cancun: American Society of Agricultural Engineers, p. 294-298, 1996.

SNELL, J. J. S. General introduction to maintenance methods. In: KIRSOP, B. E.; DOYLE, A. (ed.) *Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: a manual of laboratory methods*. 2.ed. London: Academic Press Inc, p. 21-30, 1991.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H. & KIRBY, R. Spray drying as method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of applied bacteriology*, v. 78, n. 4, p. 456-462, 1995.

TEIXEIRA, P.C.; CASTRO, M. H. & KIRBY, R.M. Inducible thermotolerance in *Lactobacillus bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 18, p. 218-221, 1994.

WORTON, C. Factors influencing volatile release from encapsulation matrices. *ACS Symposium series*, n. 590, p. 134-142, 1995.

**Sobrevivência de células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após
secagem por atomização**

Cristina Maria Rodrigues da Silva; Maria Cândida Maia Mellado; Andréa Barbosa
Santos; Adilma Regina Pippa Scamparini

CAPÍTULO 3

Sobrevivência de células de *X. campestris* pv *manihotis* nº 280 após Secagem por atomização.

Cristina Maria Rodrigues da Silva; Maria Cândida Maia Mellado; Andréa Barbosa Santos; Adilma Regina Pippa Scamparini

RESUMO

A utilização da técnica de secagem por atomização para produção de concentrados de células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 foi estudada, visando estabilidade da cultura durante o período de armazenagem.

A viabilidade das células após secagem por atomização foi mais bem preservada quando os concentrados celulares foram armazenados a 5°C. O armazenamento em dessecador à temperatura ambiente comprometeu a taxa de sobrevivência das culturas levando a uma baixa recuperação de células viáveis. Após 12 meses de preservação os testes de viabilidade mostraram que as culturas atomizadas, mesmo as armazenadas em dessecador à temperatura ambiente não sofreram deterioração morfológica, permanecendo estáveis. A utilização de diferentes temperaturas do ar de entrada do spray drier de 135, 150 e 200°C e diferentes temperaturas do ar de saída de 75, 85 e 90°C também foram avaliadas. A utilização de temperatura do ar de saída mais baixa resultou em maior taxa de sobrevivência do concentrado celular após secagem por atomização. Na temperatura do ar de saída de 75°C foram produzidos 13,86; 13,81; 13,78g/L para as temperaturas do ar de entrada de 135, 150 e 200°C, respectivamente. Ensaio de viabilidade após 12 meses de preservação mostraram que as culturas concentradas armazenadas em dessecador à temperatura ambiente e a 5°C não sofreram alteração morfológica. Não se detectou a presença de sublinhagens mutantes.

Palavras-chave: *Xanthomonas*, secagem por atomização, viabilidade celular, preservação

SUMMARY

Spray drying as a produce method of concentrated cultures of *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280 was studied, aiming to maintain cellular viability and capability to produce xanthan gum during storage.

The viability of spray dried cells showed good preservation when the concentrated cultures were stored at 5°C. The storage at room temperature (25°C) compromised the culture survival rate resulting in lower recovery of viable cells.

After 12 months of preservation viability tests carried out demonstrated that the spray dried concentrated cells stored at 5°C and at room temperature did not present any morphological modification. It was not found any mutant strain. The maltodextrin 20 DE (30%) and gum arabic (10%) blend provided protection concentrated cells resulting in further viable cells recover .

Key words: *Xanthomonas*, spray drying, cells viability, preservation, storage.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias pertencentes ao gênero *X. campestris* são microrganismos fitopatogênicos específicos de ocorrência natural. São bactérias Gram negativas, obrigatoriamente aeróbicas, com células exibindo morfologia de bastonetes curtos e delgados. O crescimento destas bactérias em meio Agar YM é caracterizado pela presença de grandes colônias sem pigmentação (Bradburry, 1984). A espécie *X. campestris* é conhecida por produzir grandes quantidades do exopolissacarídeo Xantana. Devido ao grande interesse comercial e a diversidade de aplicação desta goma, é que se tem investigado técnicas alternativas para a preservação das células de *X. campestris* (Kidby et al, 1977; Suslow e Schroth, 1981; Gibson e Koury, 1986).

Segundo Kidby et al. (1977), a preservação de *X. campestris* NRRL B-1459 em tiras de papel foi uma técnica simples e adequada para a manutenção não propagativa das células por um período de tempo mais curto. Assim, tiras de papel para cromatografia Whatman com 5,0 x 3,0 cm foram tratadas com ácido etilenodiaminotetraacético dissódico 20mM e lavadas em água deionizada. Posteriormente, foram secas a 100°C por 24 horas e esterilizadas a 121°C por 15 minutos e imersas numa cultura concentrada de *X. campestris*. Esta técnica de preservação foi aplicada a 36 cepas de *X. campestris* resultando em 78% de culturas viáveis. A produção de polissacarídeos por bactérias preservadas através deste método foi igual à produção através de outras formas tradicionais de inoculação. As células preservadas em tiras de papel produziram um concentrado viável que não mostrou tendência à degeneração durante o curso de uma fermentação. No entanto, a desvantagem desta técnica consistiu no curto prazo de preservação, sendo que um novo lote de concentrados deveria ser preparado a cada três meses, a partir de uma cultura liofilizada. Nos estudos de Baiocco (1997), como método de preservação, o emprego de culturas liofilizadas foi o mais adequado em relação ao binômio qualidade-custo, uma vez que a bactéria apresentou alta taxa de sobrevivência quando armazenada por um período de 12 meses.

Teixeira (1995) estudou a sobrevivência de *L. delbrueckii subsp bulgaricus* inoculado em suspensão de leite em pó desnatado reconstituído (11% de sólidos) e

maltodextrina (40%) através da secagem por atomização. O efeito da temperatura do ar de entrada e da temperatura do ar de saída do *spray drier* na sobrevivência de culturas starter de iogurte também foi estudada por Bielecka e Majkowska (2000). Gibson e Khoury (1986) propuseram um método de preservação através de ultracongelamento de *X. campestris*. Deste modo, uma densa suspensão da cultura bacteriana foi inoculada em frascos contendo 1 mL do meio composto por 3% de triptona; 0,5% de glicose; 2,0% de leite desnatado reconstituído e 4,0% de glicerol sendo imediatamente armazenadas a -80°C . As linhagens preservadas por este método mantiveram sua viabilidade por um período de 28 meses. O método de ultracongelamento foi mais adequado que o subcultivo em intervalos de tempo, fornecendo um acesso mais fácil e rápido à cultura e reduzindo o tempo e o custo de produção e o de reativação das células. Entretanto, em termos econômicos, consiste em uma técnica cara, necessitando de equipamentos de refrigeração mais sofisticados.

Contrariando todos os demais trabalhos publicados sobre a manutenção de culturas de *X. campestris* e sua conhecida instabilidade genética, Galindo et al. (1994) descreveram a manutenção das características destas culturas quando preservadas em meio YM ágar inclinado, por um período de 11 meses, com repiques mensais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência das células de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280 após secagem por atomização durante o período de armazenagem, em temperaturas diferentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preservação e manutenção do microrganismo

Nesse experimento foi utilizada a cepa nº 280 de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* liofilizada e armazenada a baixa temperatura. Quando necessário, as culturas foram reativadas e transferidas para tubos de ensaio contendo meio ágar YM inclinado. A cultura pura foi mantida no ágar YM em tubo inclinado, sob refrigeração e repicada periodicamente durante o experimento.

2.2. Preparo do concentrado celular

Uma alçada padrão (alça de platina com 3,0mm de diâmetro) da cultura bacteriana, crescida em ágar YM inclinado, foi inoculada em caldo YM e incubado a 30°C por 40 horas a 200 rpm. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada a 16.000g por 30 minutos em centrífuga refrigerada marca Shimadzu, modelo CR21 a temperatura de 5°C. O sobrenadante foi descartado e o concentrado celular foi resuspendido com água esterilizada por três vezes, para lavagem das células. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, obteve-se o concentrado celular padronizado para o *spray drier*.

2.3. Determinação da curva de crescimento

Para determinação da curva de crescimento da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* linhagem nº 280, foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio YM padrão inoculados com 1% do concentrado inicial reidratado com água destilada. Em seguida, a cada intervalo de tempo foram coletadas amostras para avaliação dos seguintes parâmetros de crescimento: pH final, crescimento celular, teor de açúcares redutores totais e quantidade de goma xantana.

2.4. Determinação do pH final no meio de crescimento

Depois de retirada cada amostra, foi feita a leitura do pH em potenciômetro marca DIGIMED, modelo DMPH-2.

2.5. Determinação do crescimento celular

Para essa determinação a amostra foi centrifugada a 16000 x g por 30 minutos a 5°C. A cada intervalo de tempo a massa celular obtida na centrifugação foi lavada com água destilada estéril, outra vez centrifugada e levada a estufa à 55°C, após

esse procedimento a amostra foi deixada em dessecador para resfriar, sendo pesada até peso constante.

2.6. Determinação do teor de açúcares totais

Para determinação do teor de açúcares totais foi empregada a técnica do DNS (Miller, 1959). O valor de absorbância obtido de cada amostra foi convertido em açúcares redutores totais utilizando uma curva padrão de açúcares redutores em função dos valores de absorbância, previamente estabelecida. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro Beckman DU 70. O branco foi feito substituindo a amostra hidrolisada por 1,0 ml de água destilada.

2.7. Determinação da goma xantana

As amostras após 48 horas de fermentação foram centrifugadas para separação das células do caldo e a goma foi precipitada do sobrenadante com etanol na proporção de 1 parte de sobrenadante e 3 partes de etanol. A goma precipitada foi filtrada e seca em estufa a 55°C, até peso constante. O rendimento de goma xantana foi calculado segundo Jeanes et al. (1976).

2.8. Condições de operação do *spray drier* no processo de secagem por atomização

Suspensão de leite desnatado reconstituído 10% (Skim Milk – marca DIFCO), maltodextrina (Corn Products Brasil) e de goma arábica (Spray Gum IRX 28830, Colloids Naturels Brasil Comercial LTDA) em água destilada estéril foram inoculadas com o concentrado celular de culturas de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* linhagem n° 280. A suspensão foi incubada a 30°C por 30 minutos para melhor adaptação da cultura, sob agitação, e então atomizadas em *spray drier* modelo SD 04 (Lab-Plant, Huddersfield, UK), pressão do ar 5,0 kg/cm², fluxo da bomba peristáltica 5,0 mL/min e diâmetro do bico aspersor igual a 0,5 mm. A temperatura

de entrada do ar foi de 135, 150 e 200°C, e a temperatura de saída foi de (75, 85 e 90°C). Cada amostra foi reidratada ao volume original com água destilada estéril a temperatura ambiente. As células foram agitadas por 10 minutos em “Shaker – New Brunswick Scientific Co, modelo G25”. A Figura 1 mostra o sistema de secagem por atomização utilizado na produção do concentrado celular de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.



Figura 1 - Sistema de secagem por atomização para a produção do concentrado celular de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280.

2.9. Contagem de microrganismos e cálculo da taxa de sobrevivência celular

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

Para contagem dos microrganismos as amostras foram submetidas a diluições decimais em série, transferindo-se 1,0 mL da amostra reidratada para tubos de ensaio contendo 9 mL de água destilada estéril, sucessivamente, até as diluições desejadas (Baiocco, 1997). As amostras foram plaqueadas em superfície de ágar YM. Todos os testes de contagem foram feitos em triplicata. Os resultados foram expressos em Log Unidades Formadoras de Colônias por mL (Log UFC/mL).

A sobrevivência foi calculada com relação à concentração inicial de células presentes no concentrado e os resultados foram expressos em porcentagem de acordo com Choate e Alexander (1967).

Os resultados foram analisados por comparação de médias com base no teste de Tukey com ajuda do software ASSISTAT (Assistência Estatística – Prof. Francisco de Assis Santos Silva – UFPB).

2.10. Influência do tempo e da temperatura de armazenagem

As culturas concentradas produzidas em diferentes temperaturas de secagem foram divididas em dois lotes. Um lote foi armazenado à temperatura ambiente (27°C) e outro lote foi armazenado sob refrigeração a temperatura de 5°C, durante um período de 12 meses.

Para determinar a influência do tempo e da temperatura de armazenamento na viabilidade celular, foi feita a contagem de microrganismos nas amostras dos dois lotes de acordo com os procedimentos adotados anteriormente.

2.11 Morfologia das microcápsulas

A morfologia das microcápsulas foi avaliada através de microscopia eletrônica de varredura constando de duas etapas: preparação da amostra e observação em microscópio eletrônico.

As amostras foram fixadas em cilindros metálicos, de 1,0cm de diâmetro, com fita metálica adesiva de dupla face. Este material foi transferido para um evaporador Balzer mod. SCD50 para ser recoberto com uma camada de ouro. Foi aplicada uma corrente de 40mA por 75s formando um filme de ouro com espessura de aproximadamente 19 nm, conforme Kim e Morr (1996). Os cilindros com as amostras foram armazenados a vácuo em um dessecador para posterior análise em um microscópio eletrônico de varredura JEOL mod. JSM-T300.

2.12 Distribuição de tamanho médio das partículas

Para esta determinação utilizou-se um equipamento Lumosed Photo-Sedimentometer ANTON PAAR modelo A-8054. Através de três sensores que medem a transmitância de feixes de laser que atravessam a cubeta, determinou-se o perfil de sedimentação em relação ao tempo e assim se pode calcular a distribuição de tamanho de partícula. A quantidade de amostra foi de 34,0 mg e o tempo de análise de cada amostra foi de 10 minutos. O peso das amostras e o tempo de análise foram determinados em testes preliminares. Para os cálculos foram utilizados como dados:

Densidade do solvente (isopropanol) = 790 kg/m^3

Viscosidade do solvente = $0,00286 \text{ Pa.séc}$

Densidade da amostra encapsulada = 500 kg/m^3 (determinada pela razão da massa conhecida pelo volume deslocado).

A análise foi realizada em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Influência da composição do material de parede na sobrevivência celular de *X. campestris pv manihotis* cepa 280 após atomização

A influência da utilização de maltodextrina, goma arábica e uma mistura contendo maltodextrina e goma arábica na produção do concentrado celular de *X. campestris pv manihotis* cepa 280 por meio de secagem por atomização foi estudada.

As bactérias Gram negativas, de modo geral, apresentam uma alteração na resistência térmica quando as culturas passam de uma fase de crescimento para outra. Segundo Beuchat (1978) as células que estão na fase exponencial de crescimento são geralmente mais sensíveis às injúrias e à inativação quando expostas a temperaturas reduzidas do que as células que estão na fase estacionária. A recuperação das células foi realizada na fase estacionária de crescimento (com 40 horas de incubação) para produção dos concentrados para o *spray drier*. Após atomização as amostras foram reidratadas ao volume original com água destilada estéril e foram realizadas as diluições necessárias para determinação da viabilidade celular.

Os concentrados celulares em suspensão contendo maltodextrina (40%) e goma arábica (10%) após atomização obtiveram 98,42% de sobrevivência celular, enquanto que os concentrados celulares com suspensão de maltodextrina (40%) e de goma arábica (40%) obtiveram 95,83% e 95,40% de células viáveis, respectivamente. Diferença significativa ($p < 0,05$) foi encontrada (Tabela 1). Por questão econômica e por apresentar maior taxa de sobrevivência celular, a utilização da mistura de maltodextrina (30%) e goma arábica (10%) pode ser recomendada para preservação dos concentrados celulares de *X. campestris pv manihotis* cepa 280.

Tabela 1 - Sobrevivência de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após atomização em diferentes composições do material de parede.

Material de parede	Log UFC/mL ³	(%) Sobrevivência
¹ MD (40%)	8,51 c	95,83
² GA (40%)	8,47 b	95,40
MD (30%) + GA (10%)	8,74 a	98,42

a, b, c Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (p<0,05)

¹MD = Maltodextrina

²GA = Goma arábica

³UFC = Unidades Formadoras de Colônias

Concentração inicial de células foi de $7,6 \times 10^8$ UFC/mL

Condições de secagem (temperatura do ar de entrada no spray drier 135°C e temperatura do ar de saída 75°C)

Segundo Cassidy et al. (1996) a encapsulação em spray drier reduz o número de células viáveis em cerca de 1% em relação ao número inicial, contudo o percentual de sobrevivência celular, varia com a cepa, a composição do material parede, do método e das condições de secagem.

Quando inoculado em meio de produção de goma o concentrado atomizado produziu 0,44g/L de massa celular seca e 13,86g/L, enquanto que a cultura original produziu 12,28g/L de goma xantana. O resultado indica que as condições utilizadas durante o processo de atomização aumentou a produção de goma em cerca de 11,40%.

3.2 Morfologia e distribuição do tamanho das microcápsulas

O concentrado celular em suspensão de maltodextrina 40% após atomização formou microcápsula com parede lisa e de forma esférica, com tamanho médio de 21,0µm com variação de 5,3 a 44,5µm. As microcápsulas formadas com a utilização

da suspensão de goma arábica 40% apresentaram concavidades na superfície, possivelmente devido às condições do processo de secagem, a parede lisa sem aparente porosidade, o tamanho médio da partícula foi 20,9µm com variação de 5,3 a 42,7µm. Os concentrados celulares com a composição de (maltodextrina 30% e goma arábica 10%) apresentaram microcápsulas com tamanho médio de 21,0µm com variação de 5,3 a 44,5µm, aparentemente forma esférica. As fotomicrografias e os gráficos de distribuição de tamanho de partícula dos concentrados celulares atomizados podem ser visualizadas no ANEXO. Segundo Salib (1997) as microcápsulas podem apresentar diferenças no formato e no tamanho, dependendo do material de parede e do processo utilizado para prepará-las. Neste experimento independente do tamanho e do formato do material de parede utilizado, a viabilidade e a capacidade de produção de goma xantana da cultura de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 foi preservada. Contudo os concentrados celulares com a composição de (maltodextrina 30% e goma arábica 10%) apresentaram maior taxa de sobrevivência.

3.3 Influência do tempo e da temperatura de armazenagem

A sobrevivência dos concentrados de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 foi avaliada quanto ao tempo e temperatura de armazenamento e pode ser visualizada na Figura 2 e na Figura 3. Uma suspensão contendo maltodextrina e goma arábica foi utilizada na produção dos concentrados. Neste estudo as células foram cultivadas em caldo YM, centrifugadas, resuspensas em leite desnatado reconstituído 10%, submetidas ao processo de secagem por atomização nas condições de temperatura do ar de entrada de 135°C, 150°C e 200°C, e com temperatura do ar de saída de 75°C.

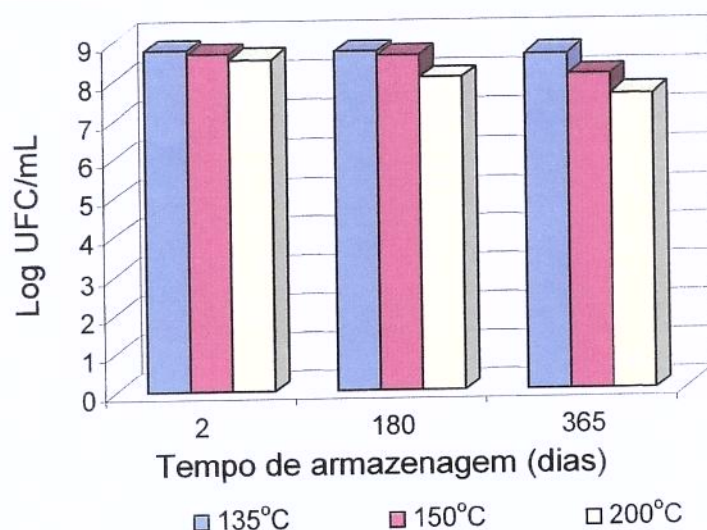


Figura 2 - Influência do tempo de estocagem na sobrevivência de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após atomização e armazenadas a 5°C.

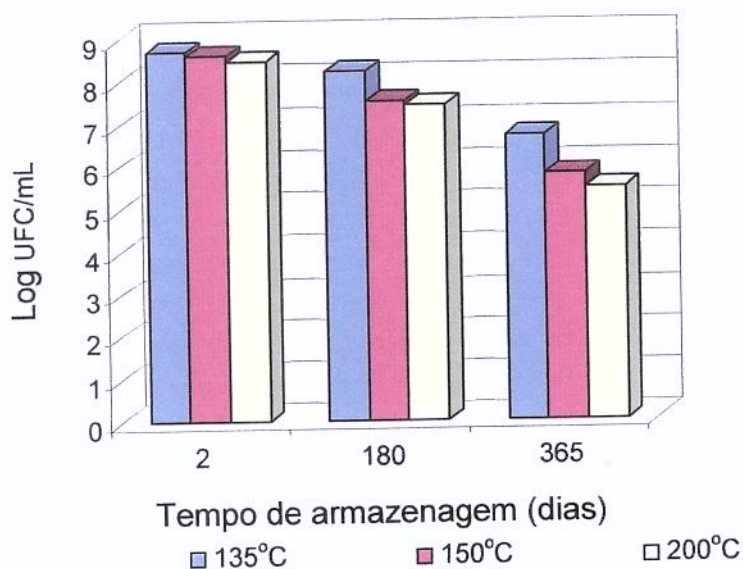


Figura 3 - Influência do tempo na sobrevivência de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após atomização e armazenadas a temperatura ambiente.

Na avaliação do tempo de armazenagem em diferentes temperaturas verificamos que nos primeiros 180 dias os concentrados celulares produzidos nas

temperaturas do ar de saída de 135, 150 e 200°C apresentaram 98,00; 96,73 e 90,32% de sobrevivência respectivamente, quando armazenados a 5°C e 92,68; 84,68 e 84,00% quando armazenados a 25°C. Em termos de sobrevivência celular, os concentrados produzidos na temperatura de entrada do ar do *spray drier* de 200°C apresentaram menor taxa de sobrevivência, sendo 61,49% no final de 365 dias de armazenagem a 25°C (Figura 3). Espina e Packard (1979) relataram 98,3% de redução nas células viáveis de *L. acidophilus* após 30 dias de estocagem sob nitrogênio a 4°C em preparações contendo 40 e 25% de sólidos respectivamente.

Segundo Josic (1982), o poder fermentativo de leveduras secas produzidas com leveduras frescas de boa qualidade e secagem cuidadosa pode ser afetado, como consequência da estocagem inadequada. Portanto, recomenda-se à manutenção das leveduras secas a temperaturas abaixo de 20°C em embalagens pobre em oxigênio, sob vácuo ou sob nitrogênio. De acordo com Nei et al. (1966) a sobrevivência das células diminui quando a desidratação aumenta. O mesmo autor sugeriu que a remoção da água livre não danifica as células, mas quando o conteúdo de umidade se aproxima de zero, a viabilidade dos organismos diminuem como consequência da eliminação da fração não congelável da água celular.

3.4 Influência da temperatura do ar de entrada no *spray drier* na capacidade de produção de goma xantana

A influência da temperatura do ar de entrada no *spray drier* na capacidade de produção de goma foi determinada. A capacidade de produção de goma xantana foi mantida o que indica que os possíveis danos sofridos durante a secagem podem ter sido reparados e a capacidade de produção de goma xantana foi preservada. Não ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) a 135 e 150°C, e também a 150 e 200°C como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Influência da Temperatura do ar de entrada no spray drier na capacidade de produção de goma xantana pelas concentrados celulares atomizados de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* cepa 280.

	Temperatura de entrada do ar no spray drier		
	135°C	150°C	200°C
MCS (g/L)	0,44	0,46	0,58
Goma (g/L)	13,86 a	13,81 ab	13,78 b
ART (g/L)	1,21	1,68	1,27
Rendimento de goma (%)	69,45	69,05	68,90

^{a, b} médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ($p < 0,05$)

MCS – Massa Celular Seca

ART – Açúcares Redutores Totais

3.5 Crescimento da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 antes e após atomização

Para avaliação dos parâmetros de crescimento da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após secagem por atomização foi utilizado o concentrado produzido nas seguintes condições: células cultivadas em caldo YM, resuspensas em leite desnatado reconstituído 10%, inoculadas em suspensão contendo maltodextrina e goma arábica, atomizadas e reidratadas com água destilada.

O crescimento da bactéria teve a sua fase lag prolongada quando comparada à cultura original (Figura 4), resultado este esperado, desde que outros microrganismos submetidos a processos de secagem mostraram fase lag muito extensa quando inoculadas direto no meio cultura. Os estudos de Foster (1962) mostraram que as curvas de crescimento das culturas lácticas secas reidratadas são quase idênticas as das culturas livres, porém ocorre diferença acentuada na

extensão da fase lag, entretanto quando reativadas produziram ácido com o mesmo rendimento.

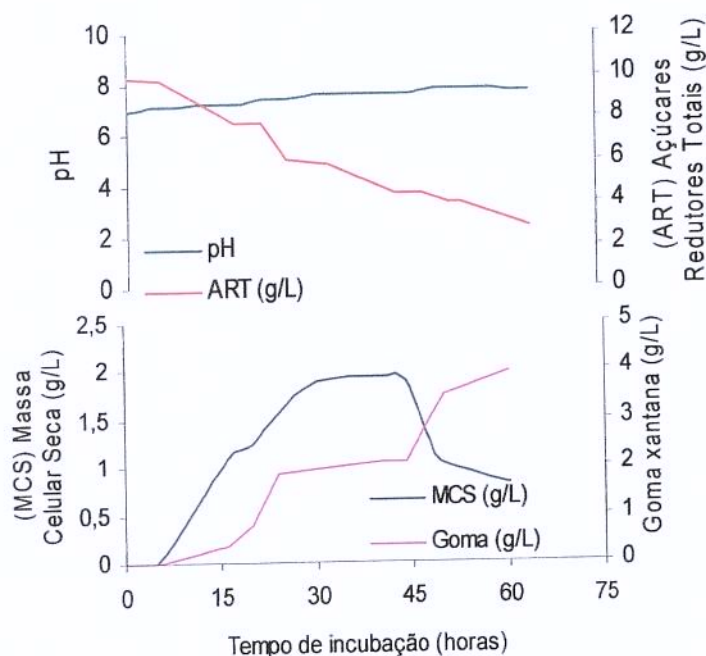


Figura 4 - Curva de crescimento da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após secagem por atomização.

Ainda na Figura 4 podemos verificar que após 24 horas de cultivo houve a produção de 1,57g/L de células e 1,89 g/L de goma xantana, enquanto que após 60 horas de cultivo houve a produção de 0,81g/L de células e 3,97g/L da goma. Na Figura 5 verificamos que a cultura original após 24 horas produziu 1,307g/L de goma xantana e 1,19g/L de células, enquanto que após 60 horas de cultivo houve a recuperação de 1,04g/L de células e 3,13g/L de goma xantana. Baiocco (1997) relatou que a diferença entre as curvas de crescimento da bactéria *X. campestris* pv *manihotis*

cepa 280 liofilizada e da cultura original foi o aumento de 37% na produção de goma xantana. Este fato pode ser resultado da ação do processo empregado, selecionando as células com alta atividade metabólica e com alto poder de produção de goma xantana. Na Figura 5 encontra-se a curva de crescimento da cultura original antes da secagem.

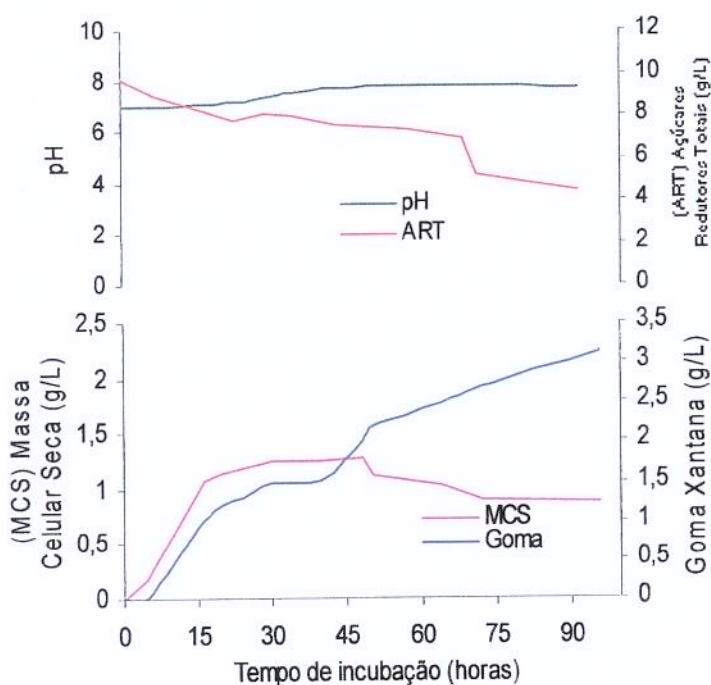


Figura 5 – Curva de crescimento celular da bactéria *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 antes da secagem por atomização.

Segundo Lievense e Riet (1994) a extensão e severidade da injúria subletal, os mecanismos dos danos e os mecanismos de recuperação variam com os processos térmicos, as espécies e cepas microbianas, as condições fisiológicas do microrganismo e os procedimentos de recuperação celular.

A cepa 280 de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis* quando cultivada em ágar YM, apresenta colônias sem pigmentação, com aspecto mucóide e brilhante, superfície lisa e formas convexas, circulares, sem reentrâncias (Figura 6). Durante o período de desenvolvimento deste trabalho, não foi detectado o aparecimento de linhagens mutantes, nem variação das características das colônias formadas.



Figura 6 – Colônias de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 plaqueadas em ágar YM, incubadas a 30°C por 48 horas. Obtidas do concentrado celular após atomização.

4. CONCLUSÕES

A utilização do processo de secagem por atomização como método de preservação de células de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 apresenta vantagem em termos de sobrevivência, produção de goma e biomassa porque os concentrados após atomização permaneceram estáveis não havendo ocorrência de alterações morfológicas das colônias da bactéria nem de contaminantes.

A utilização de uma matriz contendo maltodextrina e goma arábica resultou na maior taxa de sobrevivência de células viáveis e manutenção da capacidade de produção de goma xantana pela bactéria.

A fim de se obter um maior número de células viáveis de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 após atomização, recomenda-se à utilização das células na fase estacionária de crescimento e o uso de substâncias formadoras de filmes além de uma reidratação por 10 minutos.

A estocagem à temperatura de 5°C assegurou maior taxa de sobrevivência das células após secagem por atomização quando armazenadas por um período de 12 meses. Não foram observados o aparecimento de sublinhagens nem variação das características das colônias formadas.

Nas condições trabalhadas e considerando que a bactéria utilizada durante o processo de secagem por atomização já havia sido liofilizada por duas vezes, verifica-se que o processo empregado neste experimento foi satisfatório, a viabilidade e a capacidade de produção de goma xantana pela bactéria foram preservadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAIOCCO, L.M. Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv *manihotis*. Tese de Mestrado. 1997. UNICAMP, 184p.
- BEUCHAT, L. R. Injury and repair of Gram-negative bacteria, with special consideration of the involvement of the cytoplasmic membrane. *Advances in Applied Microbiology*, v. 23, 219-243, 1978.
- BIELECKA, M. & MAJKOWSKA, A. Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensory properties of yoghurt powder. *Nahrung*, v. 44, n.4, p. 257-260, 2000.
- BRADBURY, J. F. *Xanthomonas*. In: *BERGEY'S manual of systematic bacteriology*, v. 1, KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (ed) Williams & Wilkins Company USA, 1984.
- CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 16, p.79-101, 1996.
- CHOATE, R. V.; ALEXANDER, M. T. The effect of the rehydration temperature and rehydration medium on the viability of freeze-dried *Spirillum atlanticum*. *Cryobiology*, v.3, n.5. p.419-422, 1967.
- ESPINA, F.; PACKARD, V. S. Survival of *Lactobacillus acidophilus* in a spray drying process. *Journal of Food Protection*, v.42, n.2, p.149-152, 1979.
- FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G. S.; RUIZ HOLGADO, A. P.; OLIVER, G. Effect of the rehydration on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.50, n.5, p. 1339-1341, 1985b.
- FONT DE VALDÉZ, G.; GIORI, G. S.; RUIZ HOLGADO, A. P.; OLIVER, G. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, n.2, p. 413-415, 1985c.

- FOSTER, E. M. Culture preservation. *Journal of Dairy Science*, v.45, p. 1290-1294, 1962.
- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M. E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.40, n.5, p.634-637, 1994.
- GIBSON, L. F.; KHOURY, J. T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Letters in Applied Microbiology*, v. 3, n. 6, p. 127-129, 1986.
- JEANES, A.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. Agricultural Research Service - U. S. Department of Agriculture. ARS-NC-51, p. 1-14, 1976.
- JOSIC, D. Otimization of process conditions for the production of active dry yeast. *Lebensmittel Wissenschaft Und Technology*, v.14, n.1, 5-14, 1982.
- KIDBY, D.; SANDFORD, P.; HERMAN, A.; CADMUS, M. Maintenance procedures for the curtailment of genetic instability: *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. *Applied and Environmental Microbiology*, v.33, n.4, p.840-845, 1977.
- KIM, Y. D.; MORR, C. V. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray dried orange oil emulsion particles. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v.44, p.1320-1324, 1996.
- LIEVENSE, L. C. & van't RIET, K. Convective drying of bacteria. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v.50, p. 46-60, 1993.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p. 426-428, 1959.

MOCHI, A. C.; SCAMPARINI, A. R. P. Xanthan gum production from Brazilian strains. In: NISHINARI, K.; DOI, E. (ed.) *Food Hydrocolloids*. New Jersey, Noyes Data Corporation, 1993.

NEI, T.; SOUZU, H.; ARAKI, T. Effect if residual moisture content n the survival of freeze-dried bacteria during storage under various conditions. *Cryobiology*, v.2, n.5, p.276-279, 1966.

SALIB, N. A review of Microencapsulation, *Pharmaceutical Industry*, v.39, n.5, p.506-512, 1997.

SILVA, F. de A. S. e. The ASSISTAT software: statistical assistance. In: International Conference on Computers in Agriculture, v.6, Cancun, 1996. *Anais...Cancun: American Society of Agricultural Engineers*, p. 294-298, 1996.

SUSLOW, T. V.; SCHROTH, M. N. Bacterial culture preservation in frozen and dry-film methylcellulose. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 42, n. 5, p. 872-877, 1981.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H. & KIRBY, R. Spray drying as method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of applied bacteriology*, v. 78, n. 4, p. 456-462, 1995.

ANEXOS

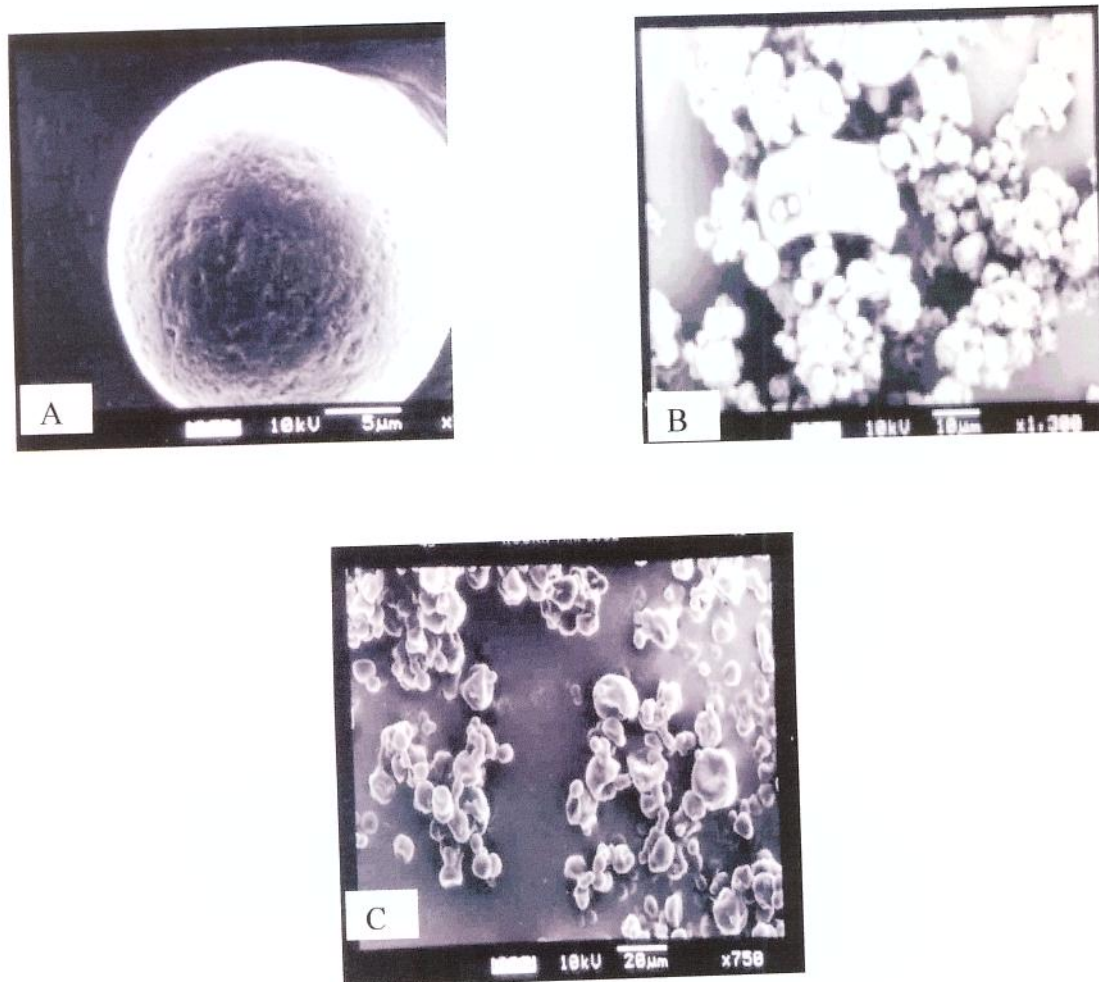


Figura 1 - Fotomicrografia dos concentrados celulares de *X. campestris* pv *manihotis* cepa 280 em diferentes encapsulantes (A) maltodextrina (B) goma arábica (C) maltodextrina e goma arábica.