

KASSANDRA SUSSI MUSTAFÉ OLIVEIRA

DIFERENTES PARÂMETROS DE PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO
DE GOMA XANTANA PELA FERMENTAÇÃO DE
Xanthomonas campestris pv *campestris*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientador: Professor Dr. Pedro de Oliva Neto

Rio Claro, 2009

576
O48d Oliveira, Kassandra Sussi Mustafe.
Diferentes parâmetros de produção e extração de goma xantana pela fermentação de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* / Kassandra Sussi Mustafe Oliveira. - Rio Claro : [s.n.], 2009

80 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Pedro de Oliva Neto

1. Microorganismos. 2. Batelada simples. 3. Batelada alimentada. 4. Temperatura. 5. Fermentador. 6. Agitador orbital. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

KASSANDRA SUSSI MUSTAFÉ OLIVEIRA

**DIFERENTES PARÂMETROS DE PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE GOMA
XANTANA PELA FERMENTAÇÃO DE
Xanthomonas campestris pv *campestris***

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Comissão Examinadora

Professor Dr. Pedro de Oliva Neto
Professor Dr. Jonas Contiero
Professor Dr. Ranulfo Monte Alegre

Rio Claro, 01 de outubro de 2009

Aos meus pais, Mirian e Gil, aos meus irmãos,
Kamylle e Leonardo. Também aos meus
companheiros de graduação e de laboratório.
Bons tempos que passam rápido...

Agradecimentos

Ao me propor a esse desafio acreditava que no final eu mereceria todos os méritos. No entanto devo ter em mim agora mais gratidão do que o número de células que cultivei em 5 anos no Laboratório de Biotecnologia Industrial!! São muitos aqueles que tenho que agradecer e espero conseguir transmitir meu agradecimento através de palavras.

Agradeço à mamãe. Sua força me surpreende dia após dia e me inspira a ter mais garra, a ser mais forte, a recomeçar, a me superar novamente. Agradeço ao papai. Por acreditar em mim. Também por ter me incentivado tanto a tentar entrar na pós em Microbiologia. Esse estímulo foi imprescindível, pois não imaginava que seria capaz.

Obrigada Kamylle, por ser tão madura. Me dando colo ou bronca sempre que necessário. Obrigada Leonardo, meu pequeno “brother”. Amo vocês e quero o melhor do mundo pra vocês! A força que surge em mim aparece quando penso no futuro da nossa família! Que são vocês!! Já disse e repito: vocês dois são o motivo e fim da minha vida.

À família: meus avós, primos e primas, tios e tias, espalhados por Iturama, Uberaba, Goiânia, Brasília, Guaraí e Uberlândia...

Ao professor Pedro de Oliva Neto. Chefe compreensivo, que acreditou em mim (de novo) e compartilhou comigo (de novo) seu tempo e atenção.

À professora Valéria, por estar sempre receptiva aos alunos do LABI para orientações, correções, ajuda. Muito obrigada! Você me tornou melhor.

Aos professores Jonas Contiero e Denis Cantu Lozano, que me ouviram enquanto aprendia a trabalhar com nosso novo bebê: o fermentador. Vocês merecem os louros desse trabalho, pois me deram suporte para técnicas e força para refazer quando tudo dava errado! Também à professora Sandra que me orientou nos trâmites da pós e me ajudou por estar longe do Campus de Rio Claro.

Rio Claro foi uma excelente experiência para mim! Conheci um Campus lindo da UNESP, me identifiquei com a agitação de lá... e me aproximei de pessoas muito especiais! Agradeço à Carolina Demarchi (Carol Azul) e Thais Alvez Pinto, por terem me recebido em sua casa e também por terem me apresentados às peças raras: Rodrigo Labello, Thais Jocketa e o “Dom” Lorenzo. Vocês fazem muita falta no meu dia!! Agradeço também o imenso coração de Thais Demarchi, Aline Mariani Feistler (Grampola) e do Paçoca, que me receberam também em sua casa! Aprendi tanto com vocês!! E faria tudo denovo! Quer dizer.. vocês topam?? =)

Sou mesmo uma pessoa de muita sorte! No Programa conheci pessoas especialíssimas, que me acrescentaram muito em força, otimismo e coragem. Agradeço de coração ao Paulo Lopes, o Chal, que foi até em minha formatura, mas só conheci durante as disciplinas; ao Adriano Uemura, conterrâneo querido que encontrei em Rio Claro, tenho profunda admiração por você; à Kate, doçura personificada, linda, gentil e companheira de compras de cosméticos (a-do-ro!); à Juliana Possato, dedicação e garra puras; ao Fabrício Peão, experiência em pessoa, quebrou o gelo de uma “bixete” no Departamento; ao André Rodrigues, um exemplo, com certeza não há para ele outro caminho senão o sucesso; à Mari Messeti, pelas dicas de uma pessoa experiente, quando eu estava chegando no Programa; à Ariane Bertoletti, também um exemplo; à Roberta Barros Lovaglio, por ouvir e tranquilizar meus choramingos de pavor perante as fases do mestrado que vão passando; ao Alex, companheiro de congresso; ao Paulo Ávila, dedicado e focado, aprendi muito com você; à Paula Sanchez (divertidíssima!); à Sueli, por compartilhar comigo seu tempo e conhecimento em FTIR; à Maira Pereira “Descolada” pelas risadas!! Também a todos os colegas com quem pude dividir experiências de laboratório, de trabalho ou de vida durante todo esse tempo no Programa e também no Simpósio de Micro. Tenho orgulho de fazer parte desse grupo!

À Léia. Nossas diferenças também me fizeram melhor! Agradeço demais a ajuda em experimentos, a carga extra de ânimo quando me faltava, a animação pra fazer “eventos” de confraternização do LABI e os puxões de orelha que tornavam o ambiente do Laboratório tão... (huauhuaha) ... leve (huauhauha)!!!

Aos dinossauros como eu que me deixam, depois de 6 anos de sertão, mais à vontade e mais saudosa: Ana Carolina Arruda, Fábio Gava, Fernanda Moya, Grazi, Gustavo Loretto, Luiz Francisco, Michelle Coimbra, Milena Nakagawa, Nemailla Bonturi, Raphael José Veroneze, Renato Calabria, Tamaya Castro, Thiago Okubo, Willian Seiti.

Às super-mega-power-ultimate-18 kilates-Xanthomônicas!!! Cintia (eterna superiora, otimista, divertida, alto astral, super incentivadora, amiga pra vida inteira) e Lays (que veio renovar o sangue do grupo com sua “doçura” e “delicadeza” particulares.. ah, análises de açúcares é uma terapia para ela!! Artigos de reologia de 15 páginas em inglês então!! ...).

Aos companheiros do LABI, Aline Mattos, Aline Freitas, Amanda Flora, Bruno “Lab”, Carlos, Cris Gargel, Felipe Berto, Fernanda Oliveira, Gilberto Coradi, Mari Azevedo, Nathalia, Tânia “Madona” e Thais Caçula, por dividirem comigo tempo, idéias, potinhos (!!), fracassos e sucessos em experimentos. Em especial agradeço Mariana Albano e Bruno Henrique, pois me compreendiam sem a necessidade de palavras. Agradeço também

aos companheiros da divertida viagem semanal Assis-Rio Claro: Pablo e Camila. Estou sabendo um pouco mais de massives, História da Argentina, gatos e culinária graças a vocês!

Também aos funcionários da UNESP que sempre estavam dispostos a me atender quando necessário. Muitas vezes me socorreram, muitas vezes me ouviram falar e falar da xantana... Ivan, Sivaldo, Fernando, Pedrinho e tantos outros!

Àquelas que foram ou são companheiras de república. Muito obrigada Alejandra, Ana, Agnes, Nathalia, Tici, Renata, Gabi M. e Gabi A., Polly, Thais, Aline e Carol fofuuura. Minhas fontes de risos, de histórias hilárias e também ombros amigos.

Agradeço especialmente a Eduardo Marcos Balciunas que “morfou” de colega de laboratório para um confidente e, então, para um companheiro. Obrigada por compartilhar comigo a paixão pela micro, obrigada por me ensinar muito, obrigada por me ouvir, por me tornar especial.

Ao pequeno hamster Velox! Companhia garantida e fonte de carinho (e mordidas) infinitos!

*“A muitas cidades do Egito peregrina
Para aprender, para aprender dos doutos,
Tem todo o tempo Ítaca na mente
Estás predestinado a ali chegar”*

Ítaca, Konstantino Kaváfis

RESUMO

A goma xantana é um biopolímero produzido por *Xanthomonas campestris* muito utilizado como agente espessante. A síntese do biopolímero pode ocorrer em variadas condições, no entanto a qualidade a goma produzida também muda. Alguns trabalhos sugerem que a produção de goma xantana por batelada alimentada pode resultar num desempenho melhor em concentração de goma, rendimento e produtividade quando comparado à batelada simples. Nesse trabalho foram avaliados a influência de diferentes metodologias de oferta de sacarose na produção de goma xantana e sua qualidade, e também a produtividade e rendimento do processo. As melhores metodologias foram testadas em bioreator de 7,5L. Também foram avaliadas diferentes metodologias de separação do biopolímero (com o acréscimo de sais ao caldo ou ao etanol na etapa de extração da goma), bem como a influência de surfactantes e sais na viscosidade da goma em solução. Em incubadora com agitação orbital a quantidade e qualidade de goma xantana produzida a 25°C foram mais interessantes. Em fermentador, a produção de xantana a 30°C em meio contendo 2% de sacarose pode ter seu tempo reduzido sem que isso afete a concentração e a viscosidade da goma obtida. A viscosidade do biopolímero produzido a 25°C em meio contendo 4% de sacarose foi superior (365,9 cP) quando comparado ao biopolímero produzido a 30°C, em meio contendo 2% de sacarose. A produtividade e concentração de goma obtidos estão entre os encontrados na literatura (0,34 g xantana L⁻¹ h⁻¹ e 24 g xantana L⁻¹). O uso de sais na extração da goma permite a redução do solvente utilizado e uma goma de melhor qualidade. Destacaram-se a utilização dos sais NaCl na concentração de 0,01% e CaCl₂ a 0,05%. O tratamento térmico aumenta a quantidade e a viscosidade do biopolímero além de eliminar as células. A adição de 0,01% de SDS e de 0,001% de Tween 80 na solução de goma xantana aumenta sua viscosidade.

Palavras chave: Batelada simples, Batelada alimentada, Temperatura, Fermentador, Agitador orbital.

ABSTRACT

Xanthan gum is a biopolymer produced by *Xanthomonas campestris*, used as a thickener. Its synthesis can happen in different conditions, but quality of xanthan produced also changes. Studies suggest that fed batch xanthan gum production can result in better performance in gum concentration, yield and productivity, when compared to batch. This work evaluates the influence of different methods of sucrose supply on xanthan gum quantity and quality, as well its productivity and process efficiency. The best methods were tested in a bioreactor of 7.5 L. Were also evaluated different separation methods (with the addition of salt in broth or ethanol during the separation phase) and the influence of surfactants on viscosity on xanthan solution. In shaker incubator, the gum produced at 25°C was more interesting. In bioreactor, the xanthan production at 30°C using 2% sucrose can be reduced to 40 hours, without affecting concentration and viscosity of the gum obtained. The viscosity of the biopolymer produced at 25°C using 4% sucrose were higher (365.9 cP) when compared to biopolymer produced at 30°C with 2% sucrose. Concentration and yield are similar than those found in the literature (0.34 g xanthan L⁻¹ h⁻¹ and 24 g xanthan L⁻¹). The use of salts in xanthan extraction reduces the input and a better quality gum. The salts NaCl (concentration of 0.01%) and CaCl₂ (0.05%) showed best results. Heat treatment increases the xanthan quantity and viscosity and eliminates cells from broth. The addition of 0.01% SDS and 0.001% Tween 80 in the solution of xanthan gum increases its viscosity.

Keywords: Batch, Fed Batch, Temperature, Bioreactor, Shaker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Figura 1: Eletromicrografia de transmissão de <i>Xanthomonas campestris</i> (x 12000) (GARCIA-OCHOA, et al. 2000).....	18
Figura 2.	Figura 2: Estrutura primária da unidade do polímero extracelular goma xantana. (GARCIA-OCHOA, et al. 2000).....	20
Figura 3.	Figura 3: Conformação em hélice da goma xantana vista perpendicular (à esquerda) e paralelamente (à direita) ao eixo da hélice. (MOORHOUSE, WALKINSHAW, ARNOTT, 1977).....	21
Figura 4.	Figura 4: Via metabólica de síntese de xantana e metabolismo da glicose em <i>Xanthomonas campestris</i> NRRL-1459. (CHIA-HUA e LO, 2003)	23
Figura 5.	Figura 5: Fluxograma das etapas de produção e separação da goma xantana. (Adaptado de GARCIA-OCHOA, et al., 2000).....	27
Figura 6.	Figura 6: Esboço do processo de produção de xantana. (URLACHER e NOBLE, 1999)	28
Figura 7.	Figura 7: Representação esquemática do efeito do cisalhamento na rede do polímero goma xantana. (Adaptado de KI-WON, YONG-SEOK e GAP-SHIK, 2006)	39
Figura 8.	Figura 8: Esquema do fermentador TECBIO – TECNAL, suas dimensões e foto do agitador tipo turbina de Rushton.....	42
Figura 9.	Figura 9: pH em função do tempo de produção de goma xantana a 25°C.....	48
Figura 10.	Figura 10: pH em função do tempo de produção de goma a 30°C.....	49
Figura 11.	Figura 11: Média da viscosidade da solução 1% de goma xantana em função do protocolo de adição de sacarose.....	52
Figura 12.	Figura 12: Produção de goma xantana por batelada simples a 25°C em meio contendo 4% de sacarose.....	55
Figura 13.	Figura 13: Viscosidade do caldo e da goma xantana produzidos em batelada simples a 25°C em meio contendo 4% de sacarose.....	56
Figura 14.	Figura 14: Produtividade (g xantana L ⁻¹ ·h ⁻¹) na produção de goma xantana em batelada simples a 25°C em meio contendo 4% de sacarose.....	57
Figura 15.	Figura 15: Produção de goma xantana por batelada simples a 30°C em meio contendo 2% de sacarose.....	59
Figura 16.	Figura 16: Viscosidade do caldo e da goma xantana produzidos por batelada simples a 30°C em meio contendo 2% de sacarose.....	60
Figura 17.	Figura 17: Produtividade (g L ⁻¹ ·h ⁻¹) na produção de goma xantana por batelada simples a 30°C em meio contendo 2% de sacarose.....	61
Figura 18.	Figura 18: Viscosidade da goma xantana extraída com a adição de sais ao etanol.....	63
Figura 19.	Figura 19: Quantidade e viscosidade de goma xantana extraída em função do tratamento térmico de caldo fermentativo.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Tabela 1: Estratégias de alimentação de sacarose durante a fase de produção de goma xantana.....	41
Tabela 2.	Tabela 2: Biomassa seca do tempo 72h de produção em função do tratamento de adição de sacarose e em diferentes temperaturas.....	50
Tabela 3.	Tabela 3: Goma xantana do tempo 72h de produção em função do tratamento de adição de sacarose e em diferentes temperaturas.....	51
Tabela 4.	Tabela 4: Rendimento de goma xantana em função do tratamento de adição de sacarose e em diferentes temperaturas.....	53
Tabela 5.	Tabela 5: Concentração da goma xantana extraída com adição de sais ao etanol.....	62
Tabela 6.	Tabela 6: Concentração da goma xantana extraída com adição de sais no caldo fermentativo.....	64
Tabela 7.	Tabela 7: Viscosidade da goma xantana extraída com a adição de sais no caldo.....	64
Tabela 8.	Tabela 8: Viscosidade em função da adição de sais ou surfactantes à solução aquosa de goma xantana a 1%.....	66

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO.....	16
2.1. Biopolímeros.....	16
2.2. Histórico.....	17
2.3. Caracterização de <i>Xanthomonas campestris</i>	17
2.4. Goma Xantana.....	19
2.4.1. Estrutura.....	19
2.4.2. Biosíntese.....	22
2.4.3. Propriedades, Aplicações e Mercado.....	24
2.4.4. Produção do biopolímero.....	26
2.4.4.1. Matéria prima e aspectos nutricionais.....	26
2.4.4.2. Condições de produção.....	28
2.4.5. Extração do biopolímero.....	33
2.4.6. Influência dos eletrólitos na viscosidade da goma xantana.....	36
2.4.7. Reologia.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1. Estudo comparativo da produção de goma xantana por batelada simples e batelada alimentada com dois pulsos de sacarose em incubadora com agitação orbital.....	40
3.2. Estudo comparativo da produção de goma xantana por batelada simples e batelada alimentada com dois pulsos de sacarose em fermentador de 7,5 litros (escala piloto)	41
3.3. Estudo da extração de goma xantana.....	43
3.3.1. Efeito do acréscimo de sais no etanol ou caldo para extração de xantana.....	43
3.3.2. Estudo da concentração e viscosidade da goma em função do tratamento térmico do caldo.....	44
3.4. Estudo da adição de sais ou surfactantes na ressuspensão da goma.....	44
3.5. Procedimentos analíticos.....	44
3.6. Análises estatísticas.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1. Estudo em agitador orbital da produção de goma xantana por batelada simples e batelada alimentada com dois pulsos de sacarose.....	47
4.2. Estudo da produção de goma xantana por batelada simples em fermentador de 7,5 litros (escala piloto de bancada).....	53
4.3. Estudo da extração de goma xantana.....	62
4.3.1. Efeito do acréscimo de sais ao etanol utilizado para extração da goma xantana.....	62
4.3.2. Efeito da adição de sais no caldo fermentativo na extração da goma xantana.....	62
4.3.3. Efeito do tratamento térmico do caldo fermentativo na extração de goma xantana.....	65
4.4. Efeito da adição de sais ou surfactantes na solução aquosa de goma xantana a 1%	66
5. CONCLUSÕES.....	67
6. REFERÊNCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

Bactérias da espécie *Xanthomonas campestris* sintetizam a goma xantana, um biopolímero extracelular capaz de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações (ROCKS, 1971). Essas características fizeram com que os biopolímeros se tornassem foco de intensa pesquisa, tendo em vista o seu alto potencial de aplicação em vários segmentos industriais. Segundo Stading (1988) não existe outra categoria de substâncias que demonstre tal comportamento. O uso de biopolímeros na indústria moderna, em alimentos como agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes e emulsificantes é consenso na literatura existente. Novos produtos e expansão do mercado dependerão das aplicações e propriedades físicas únicas desse exopolissacarídeo. A tendência é encontrar aplicações para esses novos produtos nas áreas de cosméticos e não substituir os produtos já existentes na área alimentícia (PRADELLA, 2006).

Do ponto de vista comercial, a goma xantana é o polissacarídeo microbiano mais importante. O mercado brasileiro é um tradicional importador de polissacarídeos para uso industrial, com exceção dos amiláceos, e segue a tendência mundial, na qual o total de importação de biopolímeros vem crescendo (CRUZ, 1983). As principais indústrias produtoras de xantana são Kelco (EUA), Rhône-Poulanc (França), Pfizer (EUA) e Mero-Rousselot-Santia (França). O crescimento da demanda da goma xantana está estimado à taxa contínua de 5% a 10% ao ano, prevendo-se mercado para 2015 de 80.000 t/ano e US\$ 400 milhões/ano. Mesmo com resultados tão significativos a goma xantana não predomina no mercado devido a seu alto custo de produção saindo em média US\$ 6,8/Kg. Este valor ainda não inclui gastos com despachantes, transporte e impostos (PRADELLA, 2006). A goma xantana, no entanto, é considerada um polissacarídeo de referência devido à alta conversão do substrato em polímero (60 a 70%) e devido sua inúmera aplicabilidade industrial.

O crescimento de *Xanthomonas campestris* e a biossíntese do exopolissacarídeo podem ocorrer em amplas condições de cultivo. A versatilidade nutricional de *Xanthomonas campestris* é o maior atributo industrial na produção de xantana. Porém a qualidade do biopolímero sintetizado em diferentes substratos pode variar consideravelmente quanto à massa molecular interferindo em suas características reológicas (SUTHERLAND, 1993).

Oliveira (2002) selecionou uma linhagem selvagem, utilizada neste trabalho, com excelente crescimento em meio sólido e boa produção de polissacarídeo. Silva

(2004 e 2007) formulou um meio alternativo para a fase de crescimento celular, para essa mesma linhagem, capaz de estimular as células a produzirem maior quantidade de goma. Esse meio é economicamente mais viável que o meio YM (descrito por HAYNES, WICKERHAM e HESSELTINE, 1955) até então sugerido pela literatura. Oliveira (2007) estudou a produção de goma xantana em seis diferentes temperaturas (meio contendo 2% de sacarose) e produziu maior quantidade de goma em temperaturas mais altas e goma de melhor qualidade em temperaturas mais baixas. Novos estudos estão em andamento para encontrar um meio eficiente e economicamente mais viável para substituir os atualmente utilizados, destacando-se o meio proposto por Souw e Demain (1979).

A produção de goma foi muito estudada desde a década de 60 pelos métodos de batelada simples (PETERS et al., 1992) e contínua (SILMAN E ROGOVIN, 1970, 1972; LEE, CHANG e KIM, 1989). Embora a batelada simples seja comercialmente preferida, tendo poucos parâmetros a serem controlados e compreendidos, uma possível limitação deste processo é que o ambiente para o crescimento celular muda ao longo do “ciclo de crescimento” e pode gerar condições adversas, tais como produtos tóxicos, pH extremo ou exaustão de nutrientes. Na cultura contínua o meio de crescimento é continuamente fornecido à cultura. Assim condições extremas não ocorrerão enquanto o meio é continuamente diluído e removido do vaso de reação (ROSALAM e ENGLAND, 2006). Por outro lado o processo contínuo pode ocasionar maiores problemas de contaminação e mutação genética, o que pode comprometer a produção de goma xantana.

Alguns trabalhos sugerem que a produção de goma xantana por batelada alimentada pode resultar em aumento da concentração de goma quando comparado à batelada simples (AMANULLAH, TUTTIETT e NIENOW, 1998b). Além disso a transferência de oxigênio se torna crescentemente difícil nesses caldos fermentativos tão viscosos (AMANULLAH, TUTTIETT e NIENOW, 1998a).

Zhao e colaboradores (1991) compararam a produção em batelada simples à produção em batelada alimentada por glicose em dois pulsos e que este último aumentou o rendimento de goma xantana e sua produtividade.

A batelada alimentada é um processo que se baseia na alimentação de um nutriente limitante do crescimento microbiano para a cultura. A estratégia é normalmente utilizada em bioprocessos industriais para chegar a uma elevada densidade de células no fermentador, ou evitar a inibição por substrato. A solução de alimentação é altamente concentrada e a adição controlada do nutriente afeta diretamente a taxa de crescimento da cultura.

Para o desenvolvimento da produção de goma xantana no Brasil as principais iniciativas que devem ser tomadas são: 1) obtenção de linhagens eficientes na produção da goma xantana com características requeridas pelo mercado; 2) estudo em escala de laboratório visando à otimização do processo; e 3) estudo em escala piloto (ampliação de escala).

Considerando o exposto, o trabalho buscou avaliar diferentes metodologias de oferta de sacarose na produtividade, quantidade e qualidade de goma xantana produzida em escala laboratorial. Os melhores protocolos foram testados em fermentador (escala). Também foram estudadas diferentes metodologias de separação do biopolímero (com o acréscimo de sais ao caldo ou ao etanol na etapa de extração da goma), bem como a influência de surfactantes e sais na viscosidade da goma em solução.

2. REVISÃO

2.1. Biopolímeros

Os polissacarídeos microbianos podem ser classificados conforme sua localização morfológica, em intracelular, integrantes da parede celular e extracelulares (ou exopolissacarídeos). Enquanto os polissacarídeos associados à célula apresentam importância médica, muitos exopolissacarídeos (EPS) têm amplo espectro de aplicação na indústria de alimentos (CANILHA, 2006).

A função biológica dos biopolímeros pode estar relacionada à proteção do microrganismo contra ambientes limitantes e/ou tóxicos, reconhecimento celular, interação com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas. Alguns, produzidos pela maioria das bactérias fitopatogênicas, são altamente aniônicos e assim podem atuar também como resinas de trocas iônicas, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula (SILVA et al, 2001).

Os EPS são, geralmente, considerados metabólitos secundários, produzidos quando uma fonte de carboidrato está em excesso (PACE, 1991). Os metabólitos secundários são definidos como compostos sintetizados pelos microrganismos quando as células crescem lentamente ou cessam o crescimento. Como fonte de substrato pode ser utilizada sacarose, glicose, frutose, lactose, amido hidrolisado e diferentes hidrocarbonetos (MARGARITIS e PACE, 1985).

São exemplos de biopolímeros industrialmente importantes: dextrana, gelana, pululana, curdlana e xantana, obtidas respectivamente de *Leuconostoc mesenteroides*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Aureobasidium pullulans*, *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* e *Xanthomonas campestris* (MAUGERI-FILHO, 2001).

Apesar das amplas possibilidades do uso de biopolímeros em alimentos, os mercados de consumo mais importantes para polissacarídeos são as indústrias de petróleo, mineração, papel, cosmética, farmacêutica, e de produtos agropecuários, onde além de serem utilizados como formadores de gel, espessantes e agentes de suspensão, são utilizados também por suas propriedades floculantes, adesivas, formadoras de filmes, lubrificantes e redutoras de fricção (PETTIT, 1982).

2.2. Histórico

A goma xantana foi descoberta em 1950 pelos cientistas nos Laboratórios de Pesquisas Regionais do Norte (NRRL) dos Estados Unidos, quando identificavam microrganismos produtores de gomas hidrossolúveis de interesse comercial. Foi anunciada primeiramente como polissacarídeo B-1459 produzido pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* (GODET, 1973). Pesquisas intensivas sobre esse biopolímero desenvolveram-se em vários laboratórios industriais durante os anos sessenta, culminando em produção semi-comercial da goma Kelzan pela Kelco (GARCIA-OCHOA, et al. 2000).

A aprovação pela FDA (Food and Drugs Administration) ocorreu em 1969 após vários estudos toxicológicos e de segurança que realizou em ratos e cachorros. Os testes indicaram que a goma xantana não inibia o crescimento, não provocava alterações significantes no peso dos órgãos ou na constituição sanguínea desses animais e não promovia a formação de tumores, quando feitos a curto e a longo prazo (BETZ, 1979; PETTIT, 1982). No Brasil, a adição de goma xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55871, da Legislação Brasileira de Alimentos como estabilizante e espessante em alimentos (MORRIS, 1984; LIMA et al., 2001).

Devido sua ampla aplicabilidade, o processo para produção da xantana tem sido muito estudado. No processo original, a xantana foi sintetizada em fermentação de 96 horas, extraída e purificada pela precipitação do caldo de fermentação com solvente miscível em água. Outros estudos foram feitos visando melhorar o processo e diminuir o custo de produção (MORAINE e ROGOVIN, 1971).

2.3. Caracterização de *Xanthomonas campestris*

Xanthomonas campestris são bactérias que apresentam morfologia de bastonetes delgados, são Gram-negativas, catalase positiva, oxidase negativa e móveis por flagelo único, fitopatogênicas, pertencentes à família Pseudomonaceae e produtoras de biopolímero (BRADBURY, 1984).

Esses microrganismos obrigatoriamente aeróbicos crescem em meio complexo e em meio definido, utilizando principalmente a via Entner-Doudoroff (Figura 2) para o catabolismo da glicose (GARCIA-OCHOA, SANTOS e ALCON, 2004). São quimiorganotróficos, capazes de usar uma variedade de carboidratos, sais e ácidos orgânicos

como fonte de carbono. Fatores de crescimento geralmente requeridos incluem metionina, ácido glutâmico, ácido nítrico ou a combinação desses (STARR, 1946).

As colônias normalmente são lisas, viscosas e amareladas, no entanto, o pigmento amarelo pode estar ausente quando ocorre alguma degradação da linhagem (GARCIA-OCHOA et al., 2000). Diferentes técnicas são utilizadas na conservação desses microrganismos a longo e curto prazo. Para conservação a longo prazo são usadas as técnicas de liofilização e congelamento em solução a 10% de glicerol. A conservação a curto prazo, que permite algum crescimento microbiano, é feita em meio sólido e mantida em refrigeradores a 4°C. Nesse caso a cultura deve ser transferida para meio novo a cada 14 dias para prevenir a degradação da linhagem (SILMAN e ROGOVIN, 1970; CADMUS et al., 1976; DE VUYST, LOO e VANDAME, 1987).

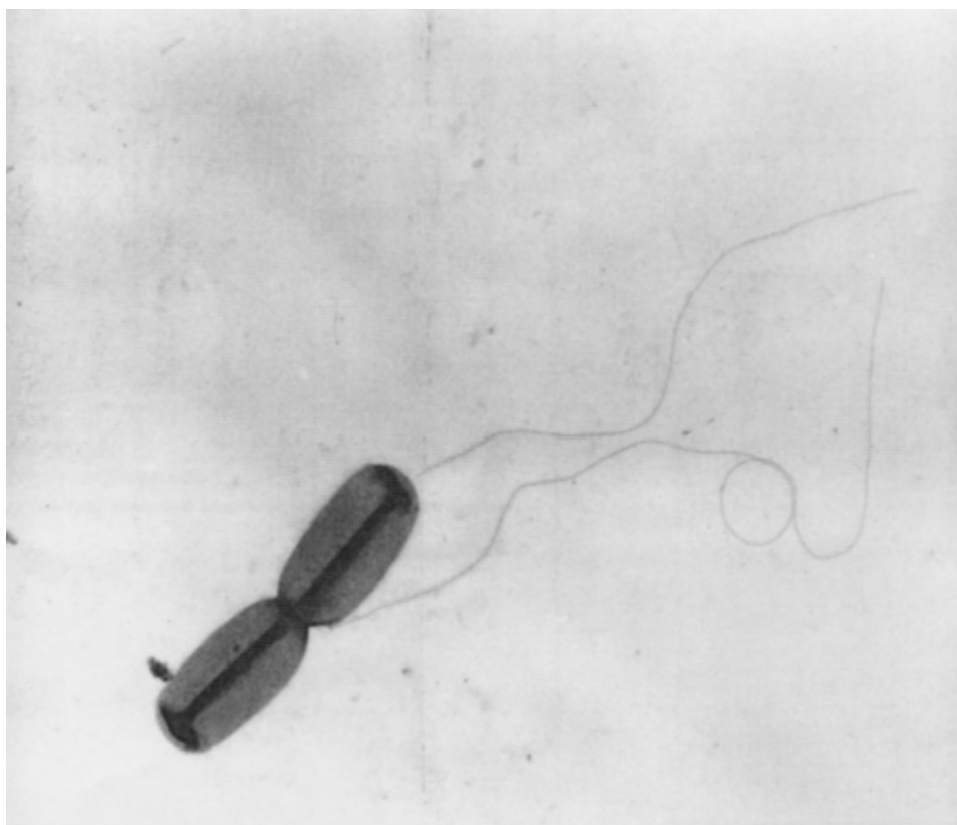


Figura 1: Eletromicrografia de transmissão de *Xanthomonas campestris* (x 12000) (GARCIA-OCHOA, et al. 2000).

A espécie *Xanthomonas campestris* está dividida em mais de 120 grupos denominados patovares (pv) que são classificados de acordo com a especificidade da planta hospedeira (BRADBURY, 1984). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é um patógeno

que infecta a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) pela parte aérea e se transloca até as raízes pelos vasos do xilema (SOUSA, 2003). Essas bactérias são agentes causadores da podridão negra, encontrada em qualquer lugar onde crucíferas cresçam. É considerada a doença mais destrutiva de crucíferas em todo o mundo. Muitas espécies são suscetíveis à infecção, incluindo couve, brócolis, couve-flor e repolho. A podridão negra ocorre em solos úmidos com temperaturas em torno de 20 a 30°C, as quais são comuns em regiões tropicais e subtropicais (MARIANO et al., 2001). A patogenicidade de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* está relacionada com a produção da xantana pela bactérias. Segundo Tang e colaboradores (1991) mutações em qualquer dos genes reguladores da produção do polímero afetam a patogenicidade da bactéria.

2.4. Goma xantana

2.4.1. Estrutura

A composição dos biopolímeros é limitada a um número pequeno de monossacarídeos e outros componentes não carboidratos, principalmente os grupamentos de acetila e piruvato que são responsáveis pela viscosidade das soluções aquosas destes polímeros. Porém estas apresentam diversidade nas propriedades físicas. Alguns destes polímeros produzem soluções altamente viscosas, e outros podem formar géis semelhantes ao ágar pela adição de sais (SOUW e DEMAINE, 1979; CRESCENZI, 1995).

Os grupos acetila e outros substituintes não açúcares podem alterar grandemente as propriedades físicas, assim como conferir carga ao exopolissacarídeo. Na ausência de tais cargas as macromoléculas podem ser insolúveis. O piruvato e o acetato influenciam a transição e estabilização ou desestabilização da conformação ordenada, respectivamente. Grupos acetila geralmente impedem a associação sinérgica e sua remoção produz polímeros gelificantes em concentrações baixas (SUTHERLAND, 1997).

A goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris* é composta por glicose, manose, ácido glicurônico, ácido pirúvico e grupos acetila (SANDFORD, 1979; KANG, VEEDER e COTTRELL, 1983). Em laboratório, o polissacarídeo pode ser preparado em grande quantidade e separado das células bacterianas por centrifugação de alta velocidade (SUTHERLAND, 1993). Trata-se de um biopolímero do tipo β -(1→4), constituído por unidades de glicose na cadeia principal, e cadeia lateral formada por molécula de manose,

ácido glicurônico e uma manose terminal. As ramificações alternadas de piruvil encontram-se na manose terminal e as de acetil estão na manose ligada à cadeia principal (Figura 2).

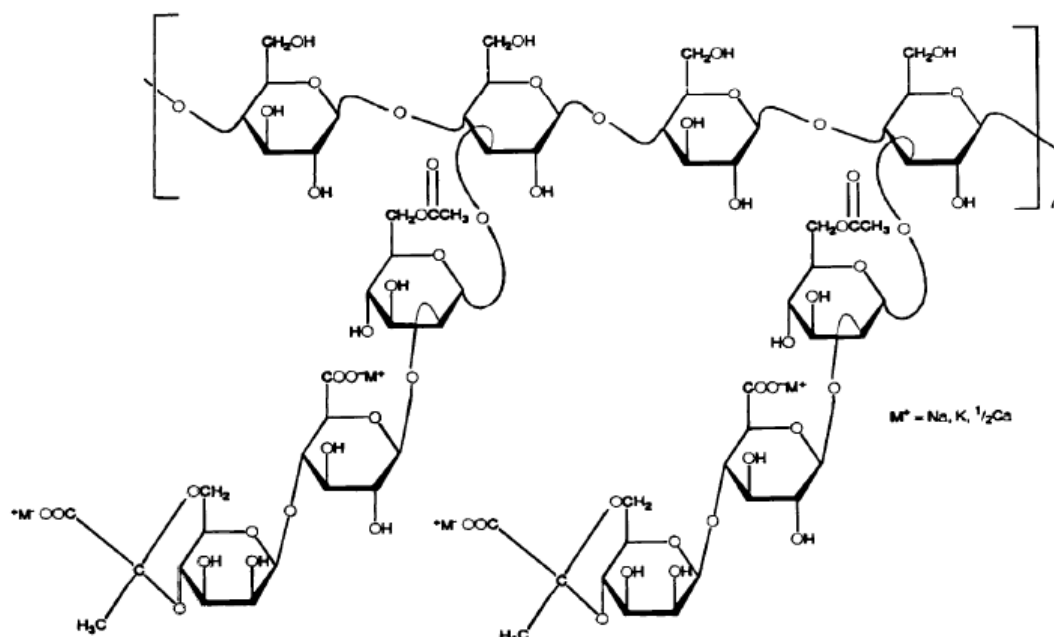


Figura 2: Estrutura primária da unidade do polímero extracelular goma xantana. (GARCIA-OCHOA, et al. 2000).

A presença de cadeias laterais e o caráter iônico nas moléculas de xantana aumentam a sua hidratação e conferem, com os ácidos glicurônico, pirúvico e acético, tonicidade à xantana e ainda estão relacionados à conformação molecular. A massa molecular da xantana é em torno de 2 a 12×10^6 Da (Daltons), mas pode variar dependendo do processo fermentativo e da linhagem utilizada (MISAKI, 1993). A unidade de ácido D-glicurônico fica entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glicose da cadeia principal. A rigidez da cadeia principal de xantana, aliada à solubilidade induzida pelas cadeias laterais, e demais características da sua estrutura química conferem as características únicas que tornaram a xantana tão importante para a indústria de alimentos e outras. Aproximadamente metade dos resíduos D-manose terminais contém um ácido pirúvico ligado, com distribuição indeterminada. A unidade D-manose ligada na cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6 (SUTHERLAND et al., 1992; GARCIA-OCHOA et al., 2000; PORTILHO, 2002). A Figura 3 a seguir ilustra a estrutura secundária da goma xantana.

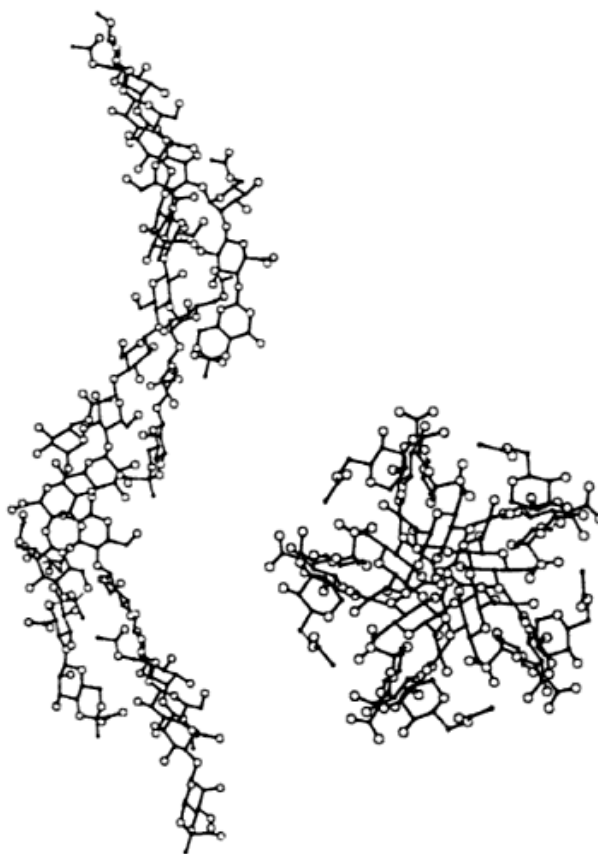


Figura 3: Conformação em hélice da goma xantana vista perpendicular (à esquerda) e paralelamente (à direita) ao eixo da hélice. (MOORHOUSE, WALKINSHAW, ARNOTT, 1977).

A composição química da goma xantana é fundamental para sua funcionalidade e aplicação. As gomas de interesse comercial devem ser capazes de formar estruturas secundárias, terciárias e, às vezes, quaternárias em meio aquoso. Por esse motivo a estrutura primária (ou química) não pode constituir-se num impedimento espacial (SILVA e TREINCHEL, 2006).

A molécula da xantana apresenta duas conformações: hélice e espiral aleatória, dependendo da temperatura de dissolução (GALINDO, 1994; CHALLEN, 1993). Devido à presença dos ácidos D-glicurônico, pirúvico e agrupamentos acetila em sua estrutura molecular a goma possui caráter aniônico marcante. Nos produtos comerciais, estas funções ácidas encontram-se neutralizadas por eletrólitos (ATKINS, 2001).

Esse polímero, que possui estrutura de fibra alimentar, pode ser usado em produtos nos quais a adição de amiláceos seja indesejável, como produtos dietéticos, com a obtenção de textura sem acréscimo calórico.

2.4.2. Biossíntese

Um bom entendimento do processo bioquímico é importante, pois estas informações podem ser usadas para controle e otimização da produção e também para ter conhecimento das características físico-químicas dos mesmos. Com o conhecimento do processo biossintético, pode-se melhorar processos com o objetivo de diminuir os custos (DE VUYST e DEGEEST, 1999; LOOIJESTEIJN et al., 2001).

O processo de formação da goma xantana tem sido descrito e revisto por vários autores. A biossíntese desse biopolímero é bem complexa e se inicia com a produção de precursores UDP- glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples para precursores derivados de açúcares nucleotídeos. As subunidades de pentassacarídeos são fixadas no interior da membrana portadora de fosfato poliprenol e a adição de grupos acetil e piruvato ocorre durante a polimerização de unidades repetidas de pentassacarídeos e secreção do polímero (IELPI, COUSO e DANKERT, 1993).

Os açúcares nucleotídeos (açúcar difosfato nucleotídeo) fornecem as formas ativadas de monossacarídeos e também fornecem à célula bacteriana um meio de interconvenção dos vários monossacarídeos através de reações de epimerização, desidrogenação e descarboxilação (HARDING et al., 1993). Estes açúcares nucleotídeos doam, seqüencialmente, seus resíduos de açúcares para o acceptor lipídico isoprenilfosfato para formar uma unidade de pentassacarídeos-P-P-lipídeos, que é polimerizado, formando a goma xantana. A seqüência correta é garantida pelos carregadores fosfato-álcool-isoprenóides e lipídeos isoprenóides. No último estágio da síntese são introduzidos os grupos acetil e piruvil. A etapa final da biossíntese ocorre quando a goma é excretada para o meio extracelular (ROSEIRO et al., 1993). Cada etapa requer uma série de enzimas e substratos específicos. A ausência de uma enzima ou substrato inibe a síntese do exopolissacarídeo. Em *Xanthomonas campestris* uma série de enzimas de membrana formam a molécula acceptora do polímero (SILVA et al., 2001).

O processo necessita de energia, e é provavelmente realizado através de um sistema de transporte específico, o qual assegura a liberação do polímero do carregador lipídico e o transporta pela membrana externa. Estima-se que para a síntese de goma xantana sejam utilizados 11 ATP para cada subunidade de cinco hexoses polimerizadas. A energia excedente do metabolismo de *Xanthomonas campestris* é direcionada para a biossíntese da goma xantana, aumentando sua produção (ROSEIRO et al., 1993).

De acordo com Vashitz e Sheintuch (1991) a síntese do biopolímero não é um processo simplesmente associado ao crescimento da célula, mas é interdependente do seu balanço energético e da formação de metabólitos celulares. Dessa maneira a conversão da glicose via ciclo dos ácidos tricarboxílicos é competitiva com a conversão da glicose para a síntese do exopolissacarídeo. A temperatura é um dos parâmetros mais importantes, afetando a síntese de goma xantana. Estudos têm mostrado que temperaturas mais altas induzem a biossíntese, enquanto que temperaturas mais baixas favorecem o crescimento celular (SHU e YANG, 1990).

O local preciso do processo de polimerização e o estágio final da secreção do EPS a partir da membrana citoplasmática, envolvendo a passagem pelo periplasma e membrana exterior e a excreção para o ambiente extracelular, ainda são pouco elucidados (HARDING, CLEARY e IELPI, 1994; SUTHERLAND, 1997 e SUTHERLAND, 2001). Os autores ainda não entraram em consenso, pois alguns citam que primeiro ocorre à polimerização das unidades pentassacarídica no interior da célula e após, a secreção do polissacarídeo no exterior (SUTHERLAND, 2001). De acordo com Köplin e colaboradores (1992) as unidades pentassacarídicas são secretadas no exterior da célula e então polimerizadas no ambiente extracelular.

A Figura 4 a seguir apresenta a rota de biossíntese de goma xantana.

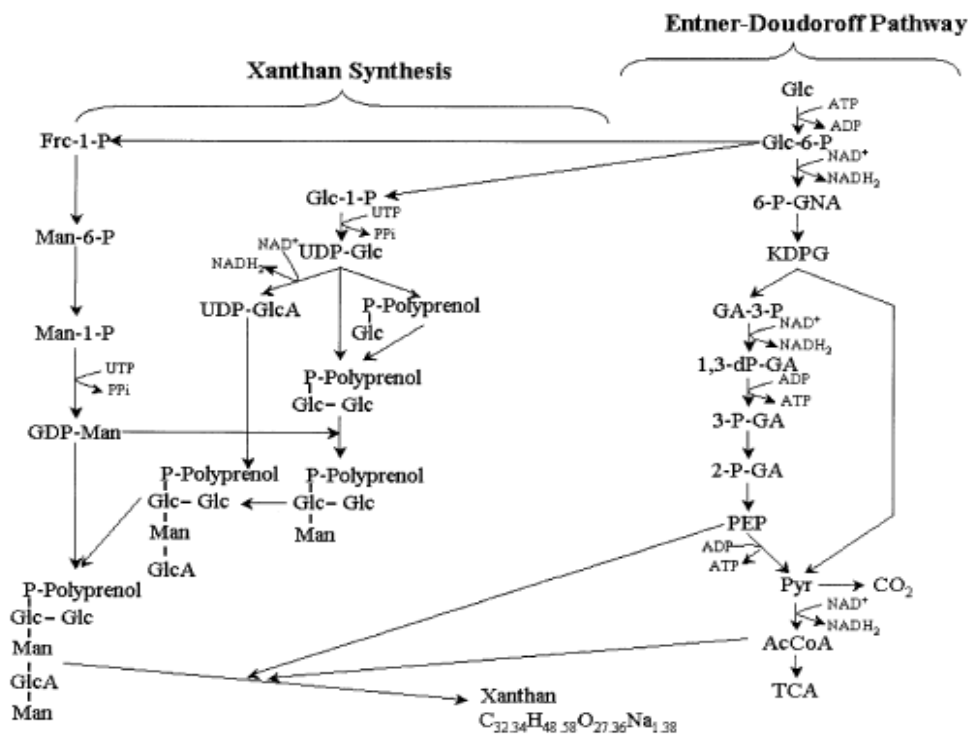


Figura 4: Via metabólica de síntese de xantana e metabolismo da glicose em *Xanthomonas campestris* NRRL-1459. (CHIA-HUA e LO, 2003).

No exterior da célula microbiana os exopolissacarídeos podem permanecer soltos (como muco viscoso) ou podem estar ligados covalentemente a um fosfodiéster ou a um lipídeo na superfície da célula. Neste último caso, o material pode formar uma cápsula, que pode ser reconhecida microscopicamente e que pode estar aderida firmemente à superfície celular (SILVA et al., 2001).

2.4.3. Propriedades, aplicações e mercado

Polissacarídeos extraídos de plantas e algas, também denominados de hidrocolóides, ainda dominam o mercado de gomas devido ao baixo custo de produção, mas vêm sendo substituídos progressivamente pelos biopolímeros. Segundo Sanderson (1990) essa tendência deve-se, em parte, às incertezas no suprimento do mercado mundial de polissacarídeos de fontes naturais, os quais são vulneráveis aos fenômenos naturais e à instabilidade política das regiões produtoras, provocando escassez e altos preços. As propriedades e características funcionais dos biopolímeros somadas à vantagem da sua produção ser independente de condições climáticas permitem que esses sejam obtidos em condições controladas, em lotes homogêneos e com qualidade assegurada.

Atualmente, o estudo da funcionalidade dos hidrocolóides tem crescido de importância na indústria de alimentos, devido às suas propriedades espessantes e estruturais (MORRIS et al., 1981; MORRIS, 1984; MORRIS, 1992). A viscosidade de hidrocolóides pode ser significativamente afetada por variáveis como taxa de deformação, temperatura da amostra, pressão e tempo de cisalhamento. Para os fluidos não-Newtonianos, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de deformação, caracterizando o que se denomina comportamento pseudoplástico.

Gomas e estabilizantes são incorporados em uma gama de alimentos. Em particular eles são usados para oferecer resistência a processos físicos indesejados como cristalização, sedimentação e desagregação mecânica, que pode ocorrer durante a distribuição e armazenagem dos produtos (MARCOTTE, HOSHAHILI, RAMASWAMY, 2001).

A ampla aplicabilidade da goma xantana deve-se, principalmente, às suas propriedades físicas e químicas singulares, à eficiência do processo de fermentação e ao desenvolvimento contínuo de novas aplicações industriais (SYMES, 1980; KANG, VEEDER e COTTRELL, 1983).

A estrutura secundária da molécula de xantana (Figura 2), na qual as cadeias laterais estão envolvendo a cadeia principal, explicam a resistência incomum desse

hidrocolóide para degradação por ácidos ou bases, altas temperaturas, congelamento e descongelamento, enzimas e agitação prolongada (URLACHER e NOBLE, 1999).

A goma xantana funciona muito bem como estabilizante em produtos à base de água, já que é uma goma solúvel e altamente higroscópica. É também capaz de manter estáveis o pH, a maciez e a estética visual do produto (KATZBAUER, 1998). Assim, é utilizada como agente estabilizante em diversos produtos cosméticos e farmacêuticos, pois não apresenta efeitos tóxicos, não induz reações alérgicas e ainda, por sua compatibilidade com sais minerais (COTTRELL, KANG E KOVACS, 1980), fornece excelente estabilidade para cremes e loções, melhora as propriedades dos “shampoos” e de sabonetes líquidos, suspende pigmentos insolúveis e produz creme de limpeza estável (BAIRD e PETTIT, 1991; DIZIEZAK, 1991). Este biopolímero representa 90% do volume total de vendas dos polímeros bacterianos (KATZBAUER, 1998).

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

Na indústria de alimentos a xantana é considerada multifuncional, atuando como estabilizantes, espessantes, gelificantes e crioprotetores, sendo muitas vezes os principais responsáveis pela textura (corpo, viscosidade e consistência) dos alimentos processados (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2005). O desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos demonstra a necessidade de ingredientes funcionais, em particular de macromoléculas formadoras de estrutura nos alimentos de baixas calorias, que apresentam função espessante, gelificante, emulsificante ou ainda evitar a sinerese (exudação espontânea).

A aplicação do polissacarídeo na indústria do petróleo está ligada às propriedades de estabilidade em soluções salinas, reologia e tolerância à ampla faixa de temperatura. Devido a essas propriedades, a xantana é extensivamente utilizada na perfuração de novos poços e na recuperação secundária do petróleo, resultando num processo de menor custo e maior eficiência para indústria petroquímica (KENNEDY, JONES e BARKER, 1982). A xantana é o polissacarídeo mais utilizado na recuperação terciária de petróleo (EOR – Enhanced Oil Recovery), não tendo até o momento nenhum outro em escala comercial que

supere sua qualidade. Este biopolímero tem sido usado junto com hidróxido de sódio e surfactantes na técnica conhecida como APS (álcali-polímero-surfactante) (NAVARRETE et al., 2001; NAVARRETE e SHAH, 2001).

Quando aplicada na agropecuária, esta goma é utilizada como agente de suspensão de vitaminas e minerais na alimentação dos animais em forma de suplementos líquidos, especificamente para suspender proteínas nos substituintes de leite para bezerros (BETZ, 1979). Apresenta a capacidade de dispersão das suspensões fungicidas, herbicidas e inseticidas possuindo a capacidade de aderência à vegetação (COTTRELL, 1978) de forma que tais propriedades se devem a sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, sua massa molecular média e sua distribuição (SOUZA e GARCIA-CRUZ, 2004; BERWANGER, 2005).

Observa-se avanço nas pesquisas sobre sinergismo. Polissacarídeos convencionais são associados aos biopolímeros, mesmo em baixas concentrações, visando intensificar as propriedades funcionais (NISHINARI e DOI, 1993).

2.4.4. Produção do biopolímero

2.4.4.1. Matéria prima e aspectos nutricionais

As etapas de produção e separação de goma xantana são descritas na Figura 5 a seguir.

A grande versatilidade nutricional de *Xanthomonas campestris* é um dos fatores que torna a produção de goma xantana de grande interesse industrial. Entretanto, a variação da massa molecular da goma sintetizada utilizando diferentes substratos interfere na qualidade desta (SUTHERLAND, 1993). Várias pesquisas indicam que a composição do meio interfere diretamente na qualidade, ou seja, viscosidade do polímero, e foi comprovado que quando os biopolímeros são sintetizados nos meios convencionais apresentam maior viscosidade que aqueles que utilizam meios de cultura alternativos como, por exemplo, acrescido de soro de queijo (ANTUNES, 2000). De acordo com Garcia-Ochoa e colaboradores (1992), vários nutrientes influenciam na produção da goma e crescimento de *Xanthomonas campestris*: nitrogênio, fósforo e magnésio para o crescimento, e nitrogênio, fósforo e enxofre para produção do biopolímero. Quando utilizados uma alta concentração, o nitrogênio e o fósforo causam efeito contrário, inibindo o crescimento celular e a produção da goma xantana. De acordo com Silman e Rogovin (1970), o nitrogênio é considerado

componente limitante para o crescimento celular da linhagem NRRL-B-1459 de *Xanthomonas campestris*.

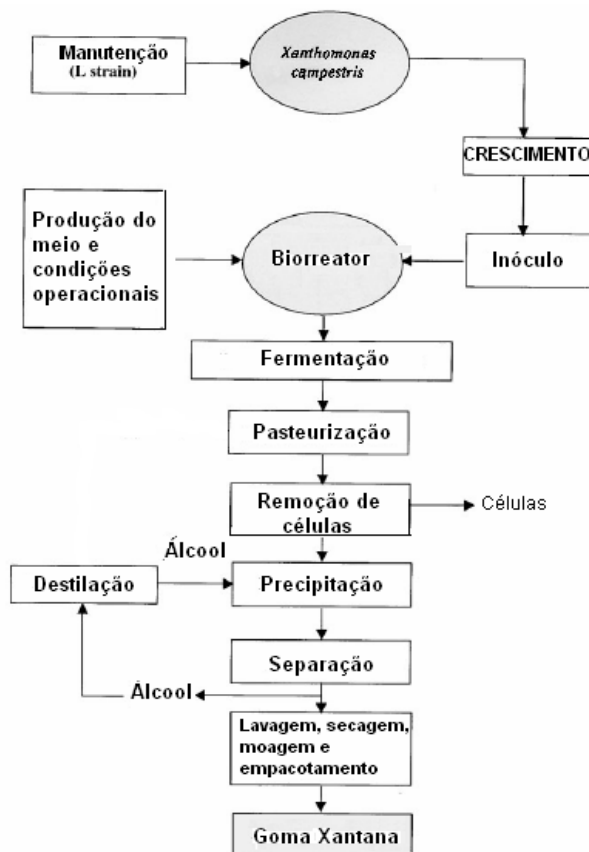


Figura 5: Fluxograma das etapas de produção e separação da goma xantana. (Adaptado de GARCIA-OCHOA, et al., 2000)

O meio de cultura consiste geralmente de 2 a 4% de glicose ou sacarose como fonte de carbono, 0,05% a 0,1% de nitrogênio (extrato de levedura, peptona extrato de amônio ou uréia), fósforo e traços de outros minerais. O pH deve ser mantido próximo ao da neutralidade (SILMAN e ROGOVIN, 1970).

Alguns pesquisadores observaram que somente 3% a 5% da glicose poderiam ser utilizados no meio de fermentação para obter maior rendimento e eficiência de goma, devido a alta viscosidade presente no meio de cultura (SMILEY, 1966; MORAINÉ e ROGOVIN, 1966). Foi visto que o crescimento microbiano cessava quando a viscosidade do meio alcançava cerca de 2000 cP (Brookfield LVT, 28°C e 30 rpm), na maioria das fermentações. A concentração baixa de açúcar no meio de produção (até 2%) também interfere na produtividade da goma se o nível de nitrogênio for acima de 0,06%.

Dentre as matérias-primas disponíveis para a produção de xantana, a cana de açúcar possui um dos melhores perfis para aproveitamento como fonte de carbono em relação à beterraba, por exemplo. A cana de açúcar alcança valores superiores a 60 t/ha, resultando em 7,2 t açúcar/ha, enquanto o rendimento da beterraba é em torno de 32 t beterraba/hectare, resultando em 3,5 t açúcar/hectare. A mandioca e o milho, dois materiais amiláceos que podem ser convertidos em glicose, também possuem boa rentabilidade agrícola, da ordem de 20 t mandioca/hectare e 6 t milho/hectare, respectivamente. Entretanto, a quantidade de fibras lignocelulósicas encontradas na cana-de-açúcar representada pelo bagaço e pela palha, dá a ela uma vantagem competitiva inigualável em relação às outras fontes de carbono, uma vez que este subproduto pode ser utilizado para geração de energia que será utilizada na operação da planta de produção (PRADELLA, 2006).

2.4.4.2. Condições de produção

A Figura 6 mostra um esquema do processo fermentativo para produção de goma xantana.

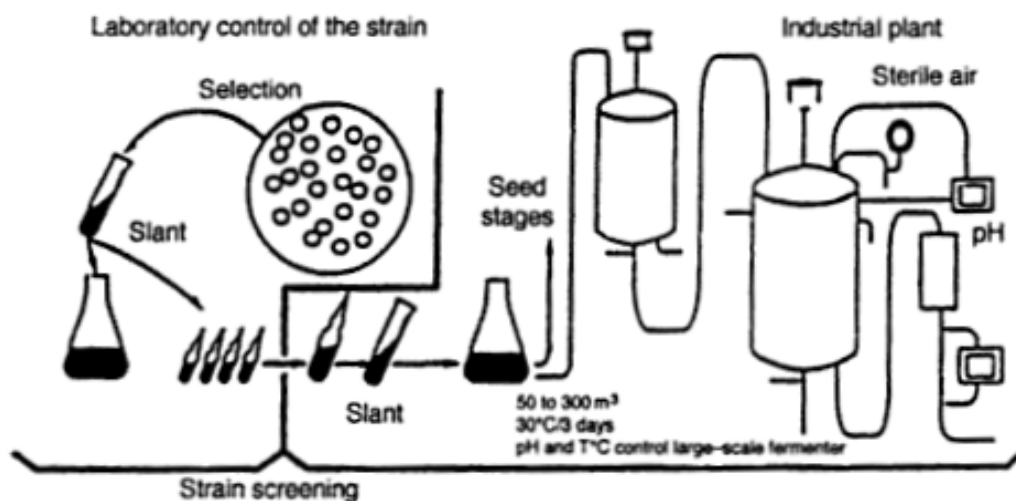


Figura 6: Esboço do processo de produção de xantana. (URLACHER e NOBLE, 1999).

A linhagem microbiana selecionada é preservada por métodos comprovados para manter as propriedades desejadas. Uma pequena quantidade da cultura preservada é multiplicada pelo crescimento em meio de cultura sólido ou líquido para obter o inóculo para grandes fermentadores. O crescimento do microrganismo e a produção da xantana são

influenciados por fatores como o tipo de bioreator utilizado, o modo de aeração, a composição do meio e as condições de cultura (temperatura, pH, oxigênio dissolvido).

A produção industrial de xantana é feita convencionalmente em modo de batelada, utilizando-se elevadas aeração e agitação. O meio de cultivo é elaborado com uma fonte de carbono (sacarose ou glicose) utilizado como substrato para produção da goma, uma fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, nitrato de amônia ou uréia) para o crescimento do microrganismo e sais (MAUGERI-FILHO, 2001; PAPAGIANNI et al., 2001).

As condições ótimas para o crescimento celular e a síntese de xantana são diferentes. A fim de conseguir alta taxa na síntese do biopolímero e rendimento, é necessário regular tanto o crescimento celular, como a produção de xantana através da fermentação. Um processo de fermentação em dois estágios que utilize dois conjuntos de condições, um para aperfeiçoar o crescimento celular e outro para a produção de polissacarídeo é recomendado (SHU E YANG 1990 e 1991; DE VUYST, LOO e VANDAME, 1987).

Esgalhado e colaboradores (1995) em estudo do efeito de pH e temperatura no crescimento e produção de goma xantana avaliaram que as duas variáveis mostraram ser bastante importantes para a concentração celular, concentração de xantana e índice de consistência da goma. Os pesquisadores afirmaram ainda que a temperatura influencia fortemente a composição macromolecular da célula, em especial o conteúdo do RNA, enquanto que o pH mostra pequeno intervalo ótimo para desenvolvimento microbiano.

Segundo Padilha e colaboradores (1997), a temperatura de fermentação tem influência direta sobre as características reológicas do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp.

Oliveira (2007) conseguiu um biopolímero de melhor viscosidade quando foi produzido em temperatura diferente da proposta por muitos autores (SOUW e DEMAINE, 1979; SHU e YANG, 1990; ESGALHADO, ROSEIRO e COLLAÇO, 1995), embora esse resultado não tenha coincidido com a maior concentração de goma no caldo. O acúmulo de goma é muito dependente da velocidade de agitação aplicada e maior velocidade de agitação facilita a difusão de nutrientes e oxigênio, que é muito importante para a biossíntese deste heteropolissacarídeo. Lindblom e Patton (1967) afirmam que quando a linhagem de *Xanthomonas* NRRL-B-1459 é colocada em processo de multiestágios, no qual as células crescem em meio pobre em carboidrato (0,2%) ocorrem dois fatos: a) no primeiro momento há o crescimento celular do microrganismo, mas não há produção do biopolímero e b) no

segundo momento pode-se obter um incremento na produção do polissacarídeo quando há aumento de concentração de carboidrato.

Casas e colaboradores (2000) avaliaram a influência da temperatura, agitação e concentração inicial da fonte de nitrogênio na produção de goma xantana e relataram que todas as variáveis afetam taxa e rendimento de produção da goma. A biomassa e a goma xantana são máximas quando a produção ocorre a 28°C. A produção de goma xantana é um processo estritamente aeróbico e os autores relataram ser necessário aumentar a agitação para controlar a concentração de oxigênio e evitar condições anaeróbias. A mudança de agitação foi diferente em cada temperatura testada

Amanullah e colaboradores (1998a) demonstraram que a produção de xantana não foi influenciada pelas mudanças da tensão de cisalhamento ao redor dos microrganismos devido a mudanças de velocidade agitação. Neste estudo foi determinada a concentração de oxigênio crítica (6 a 10%), então, abaixo desse valor, a velocidade de produção de xantana bem como a taxa de transferência de oxigênio diminuem significativamente.

Psomas e colaboradores (2007) relataram que concentrações maiores de xantana e biomassa podem ser conseguidas em valores crescentes de agitação. Conseqüentemente a produtividade foi mais alta, pois o tempo de produção foi de 72 horas. Esses mesmos pesquisadores conseguiram maiores concentrações de goma xantana em temperaturas entre 30 e 33°C, concordando com Shu e Yang (1990 e 1991). Psomas e colaboradores (2007) afirmam ainda que concentrações maiores podem ser obtidas aumentando o tempo de cultivo.

Sutherland (1993) levantou dados de produção de xantana por batelada simples e por fermentação contínua. Na produção por batelada simples, a estrutura do polissacarídeo formado é independente do substrato usado, mas deve haver diferenças nos substituintes acila, nas propriedades físicas do produto e nos valores de rendimento. A taxa específica de produção de xantana por *X. campestris* está intimamente relacionada à taxa de crescimento em culturas em batelada; é máxima durante a fase exponencial e mínima durante a fase estacionária. Nesse aspecto, a produção de xantana comporta-se como a síntese de muitos outros exopolissacarídeos bacterianos. Entretanto, podem ser vistas diferenças na viscosidade e grau de acetilação da xantana sintetizada em meios com limite de nutrientes em várias fases do ciclo de crescimento. Os conteúdos de piruvato e acetato no polissacarídeo são altos imediatamente depois do fim da fase exponencial de crescimento (72h), enquanto que os conteúdos do grupo acila são geralmente baixos durante a fase exponencial de crescimento.

Assim, a goma produzida por batelada simples representa o produto de todas as fases de crescimento, tratando-se de uma mistura de tipos moleculares.

Sutherland (1993) relatou ainda que a cultura contínua fornece um grande número de vantagens sobre a batelada simples no estudo da produção de exopolissacarídeo. Isso fornece alta produtividade no fermentador e o polímero formado pode ser obtido em condições padronizadas e suas características físicas e químicas devem ser muito mais uniformes. Um problema em utilizar cultura contínua para a produção de polissacarídeos é a agitação ineficiente no vaso de reação. “Espaços mortos” tendem a acumular concentrações altas de polissacarídeos que se tornam estagnadas. A coleta de amostras, a manutenção da cultura de alta viscosidade e a pureza da cultura também pode ser difícil. A capacidade do fermentador pode ser muito menor do que seria necessário para um lote cedendo a mesma quantidade de polissacarídeo. A conversão de substrato em xantana na cultura contínua pode ser muito alta. Foram obtidos valores entre 50 e 60% em meio sintético sob limitação de nitrogênio.

Werneau (1981) apresentou, para a batelada alimentada, rendimentos acima de 70% e concentração final de xantana de 51 g L^{-1} . Marquet e colaboradores (1989) obtiveram rendimentos de 80% com linhagens melhoradas.

Funahashi e colaboradores (1987) estudaram o efeito da concentração de glicose no crescimento celular e na produção de goma xantana e relataram crescimento limitado acompanhado por grande redução na produção de goma com concentrações iniciais acima de 50 g L^{-1} . Através da manutenção da concentração de glicose entre 30 e 40 g L^{-1} e evitando a alta concentração inicial, eles obtiveram concentrações de goma acima de 43 g L^{-1} comparado a 30 g L^{-1} em processos em batelada. Contudo, uma vez que o tempo de fermentação foi de 120 horas, resultou em baixa produtividade global de $0,36 \text{ g/(L}\cdot\text{h)}$. Zhao e colaboradores (1991) mostraram que 18 g L^{-1} de xantana puderam ser obtidas a partir de 24 g L^{-1} de glicose em batelada simples de mais de 100 horas. Altas concentrações de goma (mais de 27 g L^{-1}) foram obtidas usando adição de glicose em dois passos (24 g L^{-1} adicionados inicialmente seguido por 5 g L^{-1} depois que a glicose caiu para 5 g L^{-1}). Além disso, a troca do tipo de agitador aumentou a homogeneidade do caldo reduzindo o tempo de fermentação para aproximadamente 72 horas.

Azuaje e Sánchez (1999), utilizando várias fontes de carboidrato e diferentes espécies de *Xanthomonas*, verificaram que concentrações acima de 5% de açúcares totais são inibidoras para o crescimento celular e para a produção de goma xantana. Ao longo da etapa de produção, a concentração de goma xantana aumenta junto com sua viscosidade

enquanto os valores de pH caem. Os autores acusaram a presença de zonas mortas (não agitadas) na base e parede do fermentador. Nelas as bactérias estão expostas a condições desfavoráveis à produção do biopolímero. Esse trabalho também evidenciou que a velocidade de produção de xantana teve sua maior expressão a 30°C quando comparado à produção a 28°C ou 32°C. Na produção a 28°C as quantidades de xantana, biomassa e açúcares consumidos são maiores.

Robinson e Wang (1988) obtiveram 35 g L⁻¹ de xantana controlando a glicose no caldo entre 30 e 40 g L⁻¹. Usando células imobilizadas, eles produziram concentrações de goma acima de 55 g L⁻¹. No entanto, a fermentação em ambos os casos foi relativamente longa. Ju e Zhao (1993) usaram dispersão água/óleo para cultivar *Xanthomonas campestris*. Confinando a goma em partículas no interior do óleo, uma grande área de superfície para transferência de oxigênio e nutrientes pode ser obtida. Usando o método de batelada alimentada, eles obtiveram concentrações de xantana de 35 g L⁻¹. O tempo de fermentação foi longo (200 horas), resultando em uma produtividade típica de outros estudos com 0,33 g/(L·h). Nenhum desses estudos, no entanto, apresentou os problemas que podem ser encontrados nos processos de purificação na extração da goma.

Muitos trabalhos (DE VUYST, LOO e VANDAME, 1987; FUNAHASHI et al., 1987; ZHAO et al., 1991; LO, YANG e MIN, 1997) sugerem que concentrações maiores de xantana podem ser obtidas controlando a razão carbono:nitrogênio (C:N) nas fases de crescimento e produção. Uma vez que o nitrogênio é essencial para o crescimento celular e não para a produção de goma, é possível limitar sua disponibilidade na fase de produção e como resultado aumentar o fluxo metabólico rumo à produção de xantana em vez da síntese celular. É geralmente considerado que baixa razão C:N é necessária na trofófase (fase de crescimento celular) para alcançar tanto alta concentração celular assim como altas taxas de crescimento específico, que pode resultar em altas taxas de produção de xantana. Por outro lado a biossíntese de xantana é favorecida por alta razão C:N. De Vuyst e colaboradores (1987) usaram fermentação em duas fases com baixa razão C:N na fase inicial de propagação e alta razão C:N na fase de produção para produzir concentrações de goma acima de 30 g L⁻¹. Lo e colaboradores (1997) mostraram que aumentando a razão glicose:extrato de levedura em culturas em batelada resulta em rendimento celular e taxa específica de crescimento mais baixos, considerando que o rendimento de xantana e a taxa específica de produção aumentaram. No entanto além de controlar os níveis da razão C:N na trofófase, é também necessário aperfeiçoar o nível inicial de nitrogênio para alcançar alta concentração de biomassa antes da fase estacionária sem comprometer o fornecimento de oxigênio às células.

A massa molecular não é o único parâmetro que determina a qualidade do biopolímero, embora tenha recebido prioridade na pesquisa científica. O grau de piruvilação pode ter influência sobre a eficácia em certas aplicações (PARENTE et al., 1998). Sabe-se que o conteúdo de piruvato depende, sobretudo, da escolha adequada da linhagem e do meio (PACE, 1991). Peters e colaboradores (1989) demonstraram que existe forte relação entre a demanda de oxigênio e o grau de piruvilação.

Tait e colaboradores (1986) concluíram que os conteúdos de acetato e piruvato da xantana foram influenciados pela exaustão de nutriente, sendo que o biopolímero isolado do meio no qual a amônia foi exaurida continha menos substituintes piruvil (2,2%) e mais acetil (4,4%). Os conteúdos de acetato e piruvato da xantana, consistência e pseudoplasticidade foram influenciados pelo tempo de fermentação na cultura em batelada. Os autores verificaram que o exopolissacarídeo isolado em taxas de diluições mais altas apresentava maior conteúdo de acetil e menor conteúdo de piruvil.

Faria e colaboradores (2009) compararam as mesmas condições de produção (batelada simples a 28°C, em meio contendo 27 g L⁻¹ de sacarose) em agitador orbital e em fermentador e relataram resultados melhores em fermentador (em agitador orbital 9 g L⁻¹ de goma xantana, produtividade de 0,34 g xantana/g sacarose; em fermentador 19 g L⁻¹ de goma xantana e produtividade de 0,63 g xantana/g sacarose).

2.4.5. Extração do biopolímero

No final da fermentação o caldo contém entre 10 e 30 g L⁻¹ de goma xantana, entre 1 e 10 g L⁻¹ de células e entre 3 a 10 g L⁻¹ de nutrientes (GARCIA-OCHOA, 1993).

As principais etapas do processo de recuperação Os principais Para a extração da goma xantana, as células são normalmente removidas por filtração ou centrifugação. Uma purificação adicional pode incluir a precipitação com solventes miscíveis em água (isopropanol, etanol, acetona), além de certos sais e ajustes de pH (FLORES CANDIA e DECKWER, 1999).

Os regulamentos da FDA (Food and Drug Administration - EUA) para qualidade alimentar prescrevem o uso de isopropanol para separação de goma xantana. Após a precipitação, o produto é seco, moído e embalado em recipientes com baixa permeabilidade à água.

As etapas de extração do biopolímero envolvem a remoção de células microbianas, precipitação do biopolímero, secagem e moagem. O método específico de purificação a ser utilizado é determinado pelo uso final do polissacarídeo (GALINDO, 1994). A precipitação do biopolímero ocorre ao diminuir a solubilidade do colóide dissolvido utilizando métodos como adição de sais, recuperação com solventes e concentração por evaporação (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

A extração de xantana do caldo fermentado constitui uma das operações unitárias que determinam os custos de produção. Estima-se que mais de 50% dos custos de produção estejam associados com as etapas de recuperação (GALINDO, 1994).

Após a fermentação, o caldo pode ser esterilizado para eliminação das células e para melhorar as características da goma em solução. Após a eliminação das células, a goma xantana é extraída com álcool ou sais quaternários de amônio ou separada por ultrafiltração. O polissacarídeo pode passar por tratamento físico, químico ou biológico durante sua separação a fim de se obter características especiais no produto final. Assim, para aumentar sua dispersibilidade e viscosidade é tratado com dialdeídos e formaldeído, respectivamente (MAUGERI-FILHO, 2001).

O polímero pode ser prontamente precipitado do caldo de cultura com solventes polares como etanol ou isopropanol. A quantidade de solvente necessário para a completa precipitação depende da força iônica e da composição do polímero, mas não depende da concentração deste. A precipitação com solventes resulta também em purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis no solvente (PACE, 1991).

O método mais usado para a precipitação da goma xantana consiste na adição de solventes ao caldo de fermentação, podendo variar do metanol ao t-butanol. Posteriormente, a goma precipitada pode ser removida através de métodos convencionais como centrifugação e filtração.

Em escala industrial, o “downstream” pode ser iniciado com pasteurização sobre o caldo fermentado para desativar as enzimas. Em seguida, utiliza-se grande quantidade de álcool para precipitar a goma xantana. O precipitado é então pulverizado em spray-drier ou ressuspenso em água e, em seguida, reprecipitado. Quando goma xantana livre de células é exigida, a centrifugação é facilitada pela diluição do caldo fermentado para melhorar a separação celular. Em escala industrial, o solvente residual pode ser reciclado após sua reconcentração e purificação em coluna de destilação (ROSALAM e ENGLAND, 2006). Em escala comercial a precipitação da goma é feita com isopropanol, principalmente de acordo

com as exigências da FDA (EUA). Em laboratório, os solventes mais usados são o etanol e a acetona (GODET, 1973).

Estudos indicam que a xantana precipita-se com menor quantidade de reagentes quando etanol e sais são usados em combinação (GARCIA-OCHOA, CASAS e MOHEDANO, 1993). O volume de etanol utilizado na separação é reduzido quando sais monovalentes são utilizados, mas a redução do volume é maior com sais divalentes. Segundo Garcia-Ochoa e colaboradores (1992) a quantidade de etanol necessária para precipitar o polímero é reduzida pela metade quando 0,1% de cloreto de sódio é empregado. No entanto, diferentes concentrações de sais têm sido utilizadas na literatura, principalmente 1% de KCl (LÓPEZ, 2001) e 2% de KCl (SÁNCHEZ, et al., 1997; TORRES et al., 1993). Medeiros e colaboradores (2000) mostraram que a adição de NaCl a 1% ao etanol reduz a quantidade de solvente necessária para a recuperação e é obtido um biopolímero com valor de viscosidade aparente superior ao recuperado somente com etanol.

Borges e colaboradores (2001) avaliaram a influência de diferentes solventes (etanol:acetona; etanol:acetato de etila e etanol:isobutanol 75:25 v/v) e a adição de sais (NaCl, KCl, CaCl_2 1 e 2%) na separação de xantana. A adição de sais diminui o volume total de etanol necessário. NaCl e KCl reduziram o volume padrão de 4 para 2,5 volumes, no entanto, não foi verificado a possível influência destes sais na qualidade da goma. A centrifugação é dificultada quando se trabalha com caldos viscosos e, de acordo com Borges e colaboradores (2008), o tratamento térmico auxilia na eliminação de células e influencia a concentração de proteína bruta no biopolímero.

Borowski e colaboradores (2007) avaliaram a produção de goma xantana por três meios diferentes e os caldos produzidos foram tratados termicamente (121°C, 15 minutos) e mostraram que, de modo geral, o tratamento térmico degrada os radicais acético e pirúvico da molécula de xantana independente do meio de produção utilizado. O tratamento térmico também aumentou a viscosidade do polímero produzido nos diferentes meios. Segundo Tako e Nakamura (1984) através da desacetilação do polímero, a viscosidade da solução é aumentada pela maior associação intermolecular.

Stark e colaboradores (2008) trabalharam com tratamento térmico do caldo fermentativo (121°C por 15 minutos ou 100°C por 30 minutos) seguido da extração da goma xantana pelo acréscimo de etanol 96°GL, mistura de etanol e acetona (75:25 v/v) ou a mesma mistura de etanol e acetona acrescida de 1% de NaCl. Nessas condições os tratamentos térmicos aumentaram a viscosidade do caldo, entretanto os métodos alternativos de precipitação reduziram a viscosidade das amostras tratadas termicamente, se comparadas à

amostra recuperada com álcool 90°GL. A utilização dos métodos alternativos de precipitação reduziu em até 50% o volume de solvente necessário, sem reduzir o rendimento. O tratamento térmico a 121°C juntamente com o método de recuperação que utiliza etanol 96°GL:acetona 75:25 (v/v) na proporção de 2,5:1 em relação ao caldo fermentado, demonstrou a melhor relação entre rendimento, viscosidade e volume de solvente gasto, que pode refletir benéficamente no custo da recuperação.

Não há na literatura estudos relacionados à adição de sais no caldo fermentativo para extração e sua influência na concentração de goma extraída ou sua qualidade.

2.4.6. Influência dos eletrólitos na viscosidade da goma xantana

As propriedades soluções de xantana são dependentes de qualquer eletrólito adicionado. Nos estudos da adição de sais nas soluções de xantana os efeitos na viscosidade apresentam resultados contraditórios. Em alguns casos, a viscosidade de soluções diluídas de xantana aumenta na presença de cloreto de sódio, em outros a viscosidade tem moderada diminuição (MOREIRA, 2002).

Soluções de xantana não somente mostram boa compatibilidade com sais, como também podem apresentar incremento na viscosidade com a adição de 0,1% de NaCl ou KCl, para concentrações de polímero entre 0,2% e 0,5% (JEANES; PITTSLEY e SENTI, 1961 apud DIAZ, VENDRUSCOLO e VENDRUSCOLO, 2004). Isso é resultado da estabilização da estrutura ordenada da xantana, gerando aumento na associação intermolecular. O estado de transição da estrutura da xantana depende do nível e da natureza dos sais na solução e do conteúdo de piruvato e acetato das cadeias laterais (CAPRON; BRIGANDT e MULLER, 1997 apud DIAZ, VENDRUSCOLO e VENDRUSCOLO, 2004).

A adição de eletrólito reduz o valor do módulo elástico, comparando com medidas de solução de xantana em água destilada. Este comportamento é típico de polieletrólitos e pode ser atribuído ao resultado de mudança na conformação, decrescendo assim os valores dos parâmetros reológicos. Acima da concentração crítica, a adição de eletrólito pode induzir aumento nos valores dos parâmetros reológicos por associações intermoleculares, facilitadas pela redução das repulsões eletrostáticas e ordenação das cadeias, conduzindo a uma rede tridimensional. Em solução 1% (m/v) a 25°C, a xantana adquire conformação ordenada igual à conformação na ausência de eletrólito. Contudo, a concentração do eletrólito presente influenciará a temperatura da transição ordem-desordem

da xantana, uma vez no estado ordenado, as características estruturais e propriedades reológicas da solução de xantana são basicamente insensíveis à concentração do eletrólito (PELLETIER et al., 2001 apud DIAZ, VENDRUSCOLO e VENDRUSCOLO, 2004).

Diaz (2002) estudou a adição de cloreto de potássio e de sódio em soluções de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 24, verificando que a maior viscosidade aparente apresentada pela solução foi com a adição de cloreto de potássio na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (0,74%).

O incremento no valor da viscosidade aparente devido à adição de sais também foi relatado por Pinto e colaboradores (2000) estudando soluções aquosas de biopolímeros produzidos por *Beijerinckia* sp 7070 e T32A. Nelas o uso de 1% de KCl nas soluções proporcionou acentuado aumento de viscosidade das soluções de goma da cepa 7070, enquanto para a cepa T32A provavelmente não apresenta comportamento distinto frente à adição de íons.

2.4.7. Reologia

Reologia pode ser genericamente definida como o estudo da deformação da matéria, ou, ainda, o estudo da mobilidade dos fluidos. A reologia dos fluidos é estudada, principalmente, através da medida da viscosidade ou seu inverso, a fluidez. A medida da viscosidade é a medida da resistência ao movimento das várias camadas ideais paralelas de um fluido, quando sob a ação de tensão deformante. Durante o movimento as camadas se mantêm paralelas sem turbilhonamento (BOBBIO e BOBBIO, 2001).

Matematicamente, a viscosidade (η) é a derivada do gráfico da força de cisalhamento por unidade de área entre dois planos paralelos de líquido em movimento relativo (tensão de cisalhamento, τ) versus o gradiente de velocidade dv/dt (taxa de cisalhamento, γ) entre os planos, isto é, $\eta = \tau/\gamma$, onde:

$$\gamma = \frac{dv}{dx} = \frac{(\text{velocidade diferencial})}{(\text{espessura diferencial})} \quad (1)$$

$$\tau = \frac{F}{A} = \frac{(\text{força})}{(\text{área})} \quad (2)$$

$$\eta = \frac{d\tau}{d\gamma} = \frac{F/A}{dv/dx} \quad (3)$$

A unidade SI de viscosidade é:

$$[\eta] = \frac{N/m^2}{m \cdot s^{-1}} = \frac{N/m^2}{s^{-1}} = Pa \cdot s \quad (Pascal \cdot segundo) \quad (4)$$

As equações 1, 2 e 3 representam, respectivamente, a taxa de cisalhamento, tensão de cisalhamento e viscosidade. Também são utilizados outros sistemas de unidades para expressar viscosidade, tais como o Sistema Britânico (lb·s/pies² ; Slug/pie·s), Sistema Imperial (lbf·ft²) e o sistema CGS (P, dyn·s·cm⁻²). A relação entre a unidade SI e a unidade CGS é 1 mPa·s = 1cP (MOTT, 1996).

Soluções de biopolímeros com propriedades reológicas importantes no setor industrial geralmente apresentam propriedades viscoelásticas, pseudoplásticas e elevada tensão residual. Mas o parâmetro mais simples e utilizado para avaliar o potencial de aplicação de um biopolímero é a viscosidade aparente (SILVA e RAO, 1999). Tradicionalmente, a viscosidade de soluções poliméricas é avaliada por viscosímetros simples, como o Brookfield e pipetas de fluxo, que resultam em valores relativos e altamente influenciados pelas condições de medida. No entanto, viscosímetros com dispositivos cilíndricos do tipo Couette e cone-placa, como Haake e Shirley-Ferranti, têm se tornado mais populares. Estes caracterizam o sistema em termo de curvas de fluxo: tensão de cisalhamento em função da taxa de deformação, podendo também quantificar o comportamento em função do tempo e da temperatura (RAO, 1986).

Viscosidade é a característica funcional determinante para seleção de cepas produtoras de gomas, embora seja importante também a quantidade produzida do biopolímero devido ao fator econômico requerido na produção em grandes escalas. Na indústria, o maior interesse é por gomas que, adicionadas em concentrações mínimas (0,01 a 3%), sejam capazes de promover altas viscosidades (PASQUEL, 1999). As características reológicas do biopolímero dependem da bactéria utilizada, do processo de fermentação e recuperação. O conhecimento da viscosidade é fator de fundamental importância para os cálculos de engenharia, que envolvem a seleção de equipamentos e dimensionamento de bombas e tubulações, assim como para implementar efetivo controle dos processos e garantia de qualidade do produto final (GRATAO, BERTO e SILVEIRA JUNIOR, 2004).

Para os fluidos Não-Newtonianos, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento dando origem ao que é conhecido como pseudoplasticidade ou comportamento pseudoplástico. Soluções de goma xantana possuem comportamento

pseudoplástico, onde a viscosidade aparente diminui enquanto o cisalhamento aumenta (RAO, 1977, BARNES, HUTTON e WALTERS, 1989). Esta é uma característica muito desejada em diversas situações. Do ponto de vista sensorial, os polissacarídeos que possuem comportamento pseudoplástico provocam menor sensação de gomosidade na boca do que aqueles com comportamento newtoniano. A taxa de cisalhamento da mastigação é considerada como entre 50 e 200s^{-1} (MORRIS, 1984). A xantana exibe viscosidades muito baixas nesta faixa de taxa de cisalhamento, fazendo com que o produto alimentício no qual foi utilizada pareça menos viscoso ao paladar e o sabor seja mais bem percebido (CHALLEN, 1993). O comportamento pseudoplástico das soluções de goma xantana pode ser interpretado pela conformação das moléculas do polímero (MOSCHAKIS, MURRAY e DICKINSON, 2005). Durante as medidas reológicas ainda podem-se detectar alguns efeitos na viscosidade da xantana ocasionados pelo cisalhamento provocado na estrutura como: a orientação das moléculas, o estiramento, a deformação das estruturas, efeitos que fazem com que a viscosidade diminua, dependendo da taxa de cisalhamento aplicada. Pode ainda ocorrer a destruição dos agregados, o que faz aumentar a viscosidade pelo aumento da superfície de contato (RAO, 1999).

Como representado esquematicamente na Figura 7 a seguir (a), as longas moléculas goma xantana formam agregados pelas pontes de hidrogênio e o entrelaçamento das cadeias, resultando em alta viscosidade em baixas taxas de cisalhamento ou em repouso. Sob a influência de altas taxas de cisalhamento, a viscosidade aparente de soluções de goma xantana diminui devido à desarticulação da rede de polímero e do alinhamento parcial das macromoléculas individuais na direção do fluxo de cisalhamento (b), resultando em baixa viscosidade. Após a remoção de cisalhamento, a estrutura de rede se refaz rapidamente e, conseqüentemente, a viscosidade é recuperada quase que instantaneamente (KI-WON, YONG-SEOK e GAP-SHIK, 2006).

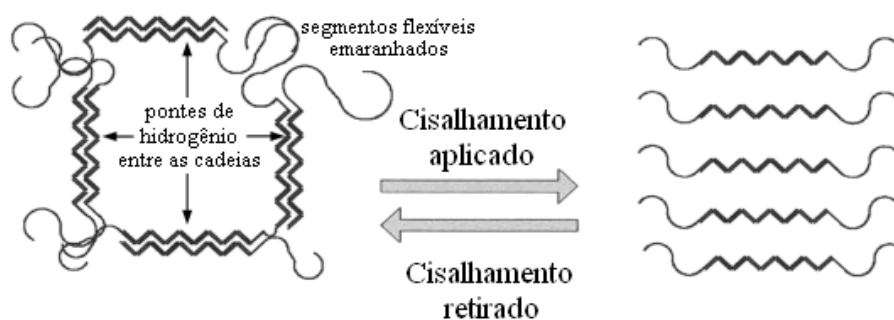


Figura 7: Representação esquemática do efeito do cisalhamento na rede do polímero goma xantana. (Adaptado de KI-WON, YONG-SEOK e GAP-SHIK, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Industrial da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Campus da Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho.

3.1. Estudo comparativo da produção de goma xantana por batelada simples e batelada alimentada com dois pulsos de sacarose em incubadora com agitação orbital

A cepa utilizada para todos os ensaios foi a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* FCLA 26, isolada por Oliveira (2002), da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Industrial da Faculdade de Ciências e Letras de Assis.

O meio utilizado para isolamento, manutenção e crescimento do microorganismo foi o meio descrito por Silva (2007) contendo 0,5% de extrato de levedura; 2,5% de sacarose; 0,01% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,15% de K_2HPO_4 ; 0,15% de glutamato de sódio e 0,05% de citrato de sódio. Na obtenção de culturas recentes foi utilizado o método de estrias por esgotamento, como descrito por Muro e Luchi (1989).

Para produção do biopolímero o meio utilizado foi o descrito por Souw e Demain (1979) contendo concentração variável de sacarose (de acordo com Tabela 1); 0,5% de KH_2PO_4 ; 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,2% de citrato de sódio; 0,002% de CaCO_3 ; 0,0006% de H_3BO_3 ; 0,006% de ZnO e 0,00024% de FeCl_3 . Neste trabalho convencionou-se denominar o meio de crescimento de meio formulado e o meio de produção de meio SD.

No estudo em agitador orbital foram utilizados 75 mL do meio formulado em Erlenmeyers de 250 mL e 300 mL do meio SD em Erlenmeyers de 1 litro. No estudo em fermentador de 7,5L foram utilizados 300 mL do meio formulado em Erlenmeyers de 1L. Os pHs dos meios foram ajustados para 6 (no caso do meio formulado) e para 7 (no caso do meio SD).

As linhagens congeladas em nitrogênio líquido foram transferidas para placas de ágar com meio formulado e incubadas a 28°C por 48 horas, visando obter culturas ativas. Três alçadas foram transferidas da cultura em placa para os Erlenmeyers de crescimento e estes colocados em incubadora com agitação orbital com controle a 28°C e 160 rpm por 24 horas. Passado o período de multiplicação celular, uma amostra de cada frasco foi

coletada assepticamente. Essa amostra foi diluída para contagem celular em câmara de Neubauer visando padronização do inóculo. Com a concentração celular no meio de crescimento calculou-se o volume do meio necessário para o inóculo no meio SD, de maneira que a concentração celular neste frasco fosse 10^7 células/mL. A produção do polímero para os quatro tratamentos foi testada a 25 e 30 ° C e permaneceram nessas condições por 72 horas, sob agitação de 180 rpm.

Para avaliar a concentração e qualidade da goma produzida por batelada simples ou pela adição de sacarose em pulsos foram propostas quatro tratamentos diferentes. A quantidade de sacarose em cada tratamento e nas “alimentações” está descrita na Tabela 1. Todos os frascos continham 300 mL de meio SD. Cabe aqui ressaltar que TRAT 2 corresponde ao protocolo atualmente utilizado. Depois da fase de multiplicação celular e padronização para inóculo, os Erlenmeyers receberam a mesma quantidade de células.

Foram coletadas amostras em 10 momentos ao longo da produção para leitura de pH e para análise (nas amostras do início e fim da fermentação) de concentração celular, de goma, viscosidade de goma e açúcares redutores totais (métodos de análise descritos em 3.5).

Tabela 1: Estratégias de alimentação de sacarose durante a fase de produção de goma xantana.

Tratamento	Condição	Sacarose ofertada ao longo da produção (% em 0h, 24h e 48h)	Sacarose total ofertada (%)
1	2% Batelada simples	2	2
2	4% Batelada simples	4	4
3	4% Batelada alimentada	2+1+1	4
4	4% Batelada alimentada	1+2+1	4

3.2. Estudo comparativo da produção de goma xantana por batelada simples e batelada alimentada com dois pulsos de sacarose em fermentador de 7,5 litros

As condições nos quais foram produzidos os melhores biopolímeros foram testadas em fermentador de 7,5 L (TECBIO-TECNAL Piracicaba, SP). A Figura 8 apresenta seu esquema (a), o agitador tipo turbina de Rushton (b) onde $W_i/D_i=0,26$ e as dimensões do equipamento (c). O vaso de reação possui também e quatro defletores (“chicanas”) radiais igualmente espaçados.

Foram utilizados 3,7L do meio de produção SD e 300mL do meio formulado com cultura de 24 horas como inóculo.

O inóculo foi preparado como descrito no item 3.1. A temperatura de produção foi mantida a $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ou a $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ de acordo com o protocolo escolhido. Em todos os ensaios a velocidade de agitação das turbinas foi controlada de maneira a manter a mais alta concentração de oxigênio possível, sem que o cisalhamento sobre o caldo fosse excessivo. Em todos os ensaios a concentração de oxigênio ficou acima de 20%.

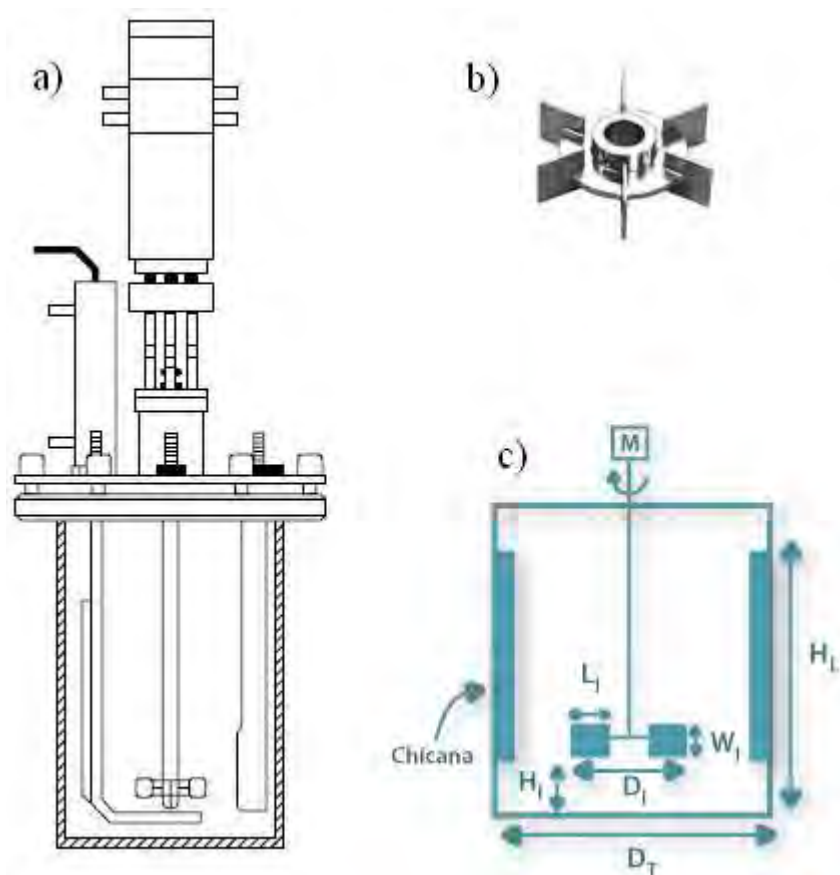


Figura 8: Esquema do fermentador TECBIO – TECNAL, suas dimensões e foto do agitador tipo turbina de Rushton.

Sendo D_T (diâmetro do tanque) = 16,8cm; H_L (altura da coluna líquida) = 18,0cm; D_i (diâmetro do agitador) = 5,8cm; W_i (altura das turbinas do agitador) = 1,3cm; L_i (largura das turbinas do agitador) = 1,5cm; W_b (largura das chicanas) = 1,5cm.

Os dados de oxigênio dissolvido, temperatura, rotação, nível e pressão no interior do vaso de reação foram coletados a cada 30 segundos durante a produção do biopolímero. Além desses dados, foram coletadas 12 amostras ao longo das 72 horas de

produção, nas quais foram avaliados pH, concentração celular (g L^{-1}), viscosidade de caldo (cP), concentração de goma seca (g L^{-1}), viscosidade de goma (cP), açúcares redutores totais (g) (métodos de análise descritos em 3.5).

A concentração de oxigênio no vaso de reação foi monitorada através de eletrodo (InPro6800/12/320 Mettler Toledo) situado a 5cm da parede do vaso de reação, na altura da turbina agitadora. O eletrodo foi calibrado no instante inicial, antes de se fazer a inoculação do reator, saturando-se o meio de cultura com nitrogênio (para o ponto 0%) e oxigênio (para o ponto 100%). O controle da concentração de oxigênio no meio de cultura foi feito com aeração e agitação. A velocidade de agitação da turbina foi mantida em 500 rpm do início da fermentação até que a concentração de oxigênio fosse próxima aos níveis críticos (20%). Nesse momento a velocidade de agitação era aumentada para 800 rpm. Caso a concentração de oxigênio voltasse a cair, a agitação era aumentada para 1000 rpm (capacidade máxima de agitação do equipamento).

A determinação da temperatura foi feita por sensor (PT-100) localizado em poço externo ao vaso de reação.

O nível de espuma foi controlado por sensor condutivo. Caso houvesse formação de espuma o programa de controle ordenava a injeção de solução aquosa de anti-espumante no meio de reação. Nesse trabalho utilizou-se anti-espumante industrial (Aratrop).

O sistema de controle de pressão no interior do vaso de reação é composto por sensor de pressão Piezo-Resistivo e linha de alívio de pressão comandada por válvula, que permite a despressurização quando o interior do vaso atinge um limite de segurança pré-estabelecido.

As leituras de rotação foram feitas por sensor ótico acoplado ao equipamento.

3.3. Estudo da extração de goma xantana

3.3.1. Efeito do acréscimo de sais no etanol ou caldo para extração de xantana

Terminado o período de produção da goma, o caldo (produzido em incubadora de agitação orbital de acordo com o item 3.1) foi centrifugado, homogeneizado e armazenado em refrigerador.

Para avaliar a qualidade e quantidade da goma xantana extraída foram acrescentados sais ao etanol (comparado à extração com etanol puro) ou ao caldo (comparado

à extração com caldo sem a adição de sais). Sempre foram utilizadas as proporções de 1 volume de caldo para 5 volumes de etanol. Foram acrescentados os sais NaCl, KCl e CaCl_2 nas concentrações 0,1; 0,05; 0,01 e 0,001% (w/v). Para cada tratamento foram feitas quadruplicatas e os dados apresentados correspondem à média desses valores.

3.3.2. Estudo da concentração e viscosidade da goma em função do tratamento térmico do caldo

Com um lote de caldo de fermentação produzido como descrito no item 3.1 foi executado o teste de esterilização do caldo. Foram avaliadas a concentração de goma extraída e viscosidade da solução 1% da goma (viscosímetro Brookfield, LVDV II+, spindle 31, acoplado com banho termostático para controle da temperatura da amostra) em função do tipo de separação: extração do polímero com o caldo esterilizado (121°C por 15 minutos) ou com o caldo não esterilizado. Para cada amostra foram feitas 9 replicatas.

3.4. Estudo da adição de sais ou surfactantes na ressuspensão da goma

Um mesmo lote do biopolímero produzido foi ressuspendido em água destilada contendo Cloreto de Cetil Trimetil Amônio (CCTA), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), Tween 80 (TW) e Tripolifosfato de Sódio (TPF), nas concentrações de 0,1; 0,01 e 0,001% (w/v). O CCTA é um sal orgânico classificado como tensoativo catiônico utilizado como agente anti-estático. O Dodecil Sulfato de Sódio (SDS ou NaDS) ou lauril sulfato de sódio ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}$) tem caráter de surfactante aniônico e o Tween 80 surfactante não-iônico. O Tripolifosfato de Sódio ($\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) é utilizado como agente de flotação, dispersante, emulsificante e sequestrante.

Nesse teste foi avaliada a influência da presença desses aditivos na viscosidade da solução de biopolímero (viscosímetro Brookfield, LVDV II+, spindle 31).

3.5. Procedimentos analíticos

Biomassa foi estimada por leituras de densidade ótica usando curva de calibração com determinação de biomassa seca em estufa a 105°C até peso constante. Alíquotas de caldo foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos. As amostras foram diluídas conforme necessidade. O precipitado foi ressuspendido em água destilada e

novamente centrifugado nas mesmas condições. Esse novo centrifugado foi suspenso em volume conhecido de água destilada para leitura a 600nm (LETISSE et al., 2002).

Para a avaliação da quantidade de goma xantana em cada tratamento procedeu-se a partir da extração pelo acréscimo de etanol absoluto (ou soluções salinas em etanol, nos testes descritos no item 3.3.1) ao caldo fermentativo na proporção de 1:5 ($V_{\text{caldo}} / V_{\text{álcool}}$). A massa de polímero foi recolhida com bastão de vidro e seca em estufa de ar forçado (40°C) até peso constante (VENDRUSCOLO, 1995). A goma xantana foi, em seguida, triturada e guardada em vidros vedados. A produção de goma xantana foi avaliada pela massa do produto seco em relação ao volume de caldo, sendo expressa em gramas por litro.

Depois da adição de etanol ao caldo e da retirada da goma, a solução hidroalcoólica foi filtrada (filtro de abertura 0,210 mm) e armazenada. Essa solução foi concentrada por evaporação ao volume inicial do caldo. Desse concentrado foi feita análise de quantidade de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1945) adaptado por Nelson (1944), sendo feita hidrólise ácida (HCl 1N) prévia por 10 minutos seguida de neutralização com NaOH (1N). A glicose foi utilizada como padrão.

O rendimento de produto ($Y_{P/S}$) foi calculado pela razão da concentração de goma sobre a concentração de açúcares consumidos.

A qualidade da goma foi determinada pela avaliação da viscosidade de soluções 1% do biopolímero em água destilada (w/v) utilizando viscosímetro de cilindros concêntricos (Brookfield, modelo LVDV II+) com adaptador de pequenas amostras, acoplado a um banho termostático para controle da temperatura da amostra durante a leitura (25°C). As taxas de cisalhamento correspondentes às leituras estavam sempre entre 6,8 e 10,6 s⁻¹, de acordo com o “spindle” mais adequado. Este foi escolhido de acordo com a porcentagem de tensão de cisalhamento (entre 10 e 100%) conforme fabricante. Os “spindles” utilizados nesse trabalho foram os de número 18 (cuja geometria é 17,48 mm de diâmetro e 31,72 mm de comprimento) 31 (11,76 mm de diâmetro e 25,15 mm de comprimento) e 34 (9,39 mm de diâmetro e 24,23 mm de comprimento). A viscosidade do caldo foi avaliada no mesmo equipamento.

3.6. Análises estatísticas

Das replicatas obtidas dos tratamentos foram calculados a média e o desvio padrão. O teste ANOVA (análise de variância de amostras paramétricas) foi calculado pelo

programa estatístico Bioestat 5.0. Esse teste foi seguido pelo Teste de Tukey de comparação das médias amostrais com nível de significância (α) de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo em agitador orbital da produção de goma xantana por batelada simples e batelada alimentada com dois pulsos de sacarose

A variação do pH ao longo da produção de goma xantana em cada temperatura está ilustrada nas Figuras 9 (25°C) e 10 (30°C). A mesma escala foi utilizada nos gráficos.

Na produção a 25°C o pH evoluiu uniformemente em todos os tratamentos. Foi observada a manutenção do pH entre 6,9 e 7,1 até 32 horas quando o pH começou a cair em níveis de 6,5.

Na produção de goma xantana a 30°C (Figura 10) os tratamentos produzidos em batelada simples (TRAT 1 e TRAT 2) tiveram o mesmo perfil de pH, aumentando até 44 horas seguido de queda até o fim da produção. O pH final ficou em torno de 6,6. Nos tratamentos produzidos em batelada alimentada (TRAT 3 e TRAT 4), ao contrário, aumentaram seu pH até 24 horas, seguindo queda mais acentuada, com valores finais entre 5,8 e 6,1.

Mesmo sem controle de pH, os níveis permaneceram próximos da neutralidade, que é apontado como condição ótima (SILMAN e ROGOVIN, 1970). A captação do substrato pela bactéria é dependente do meio de cultivo e, um controle adequado do pH tanto na fermentação contínua como na descontínua é essencial para a síntese de exopolissacarídeo (SUTHERLAND, 1979).

Oliveira (2002) reportou pH de caldo fermentativo entre 5,5 e 6,5 para linhagens selvagens produzindo a 29°C e 30°C. A mesma linhagem utilizada neste trabalho, apresentou pH caldo fermentativo de pH igual a 6,4. A queda do pH ao longo da produção pode ser explicada pelo aumento da produção de ácidos produtos do metabolismo celular.

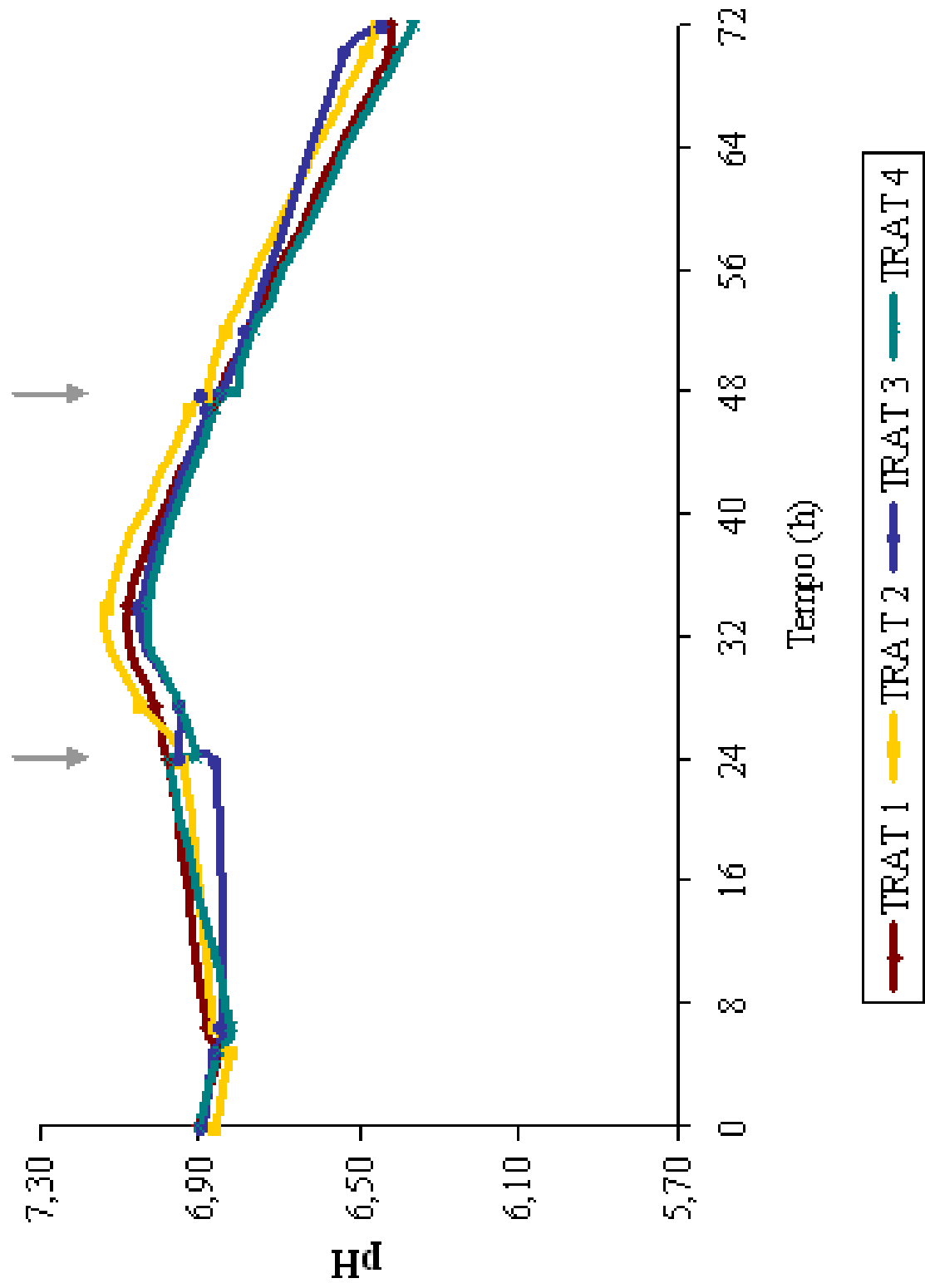


Figura 9: pH em função do tempo de produção de goma xantana a 25°C.

Setas indicam o momento da alimentação (24 e 48 horas) para TRAT 3 e 4.

TRAT 1: 2 + 0 + 0 = 2% ART; **TRAT 2:** 4 + 0 + 0 = 4% ART;

TRAT 3: 2 + 1 + 1 = 4% ART; **TRAT 4:** 1 + 2 + 1 = 4% ART.

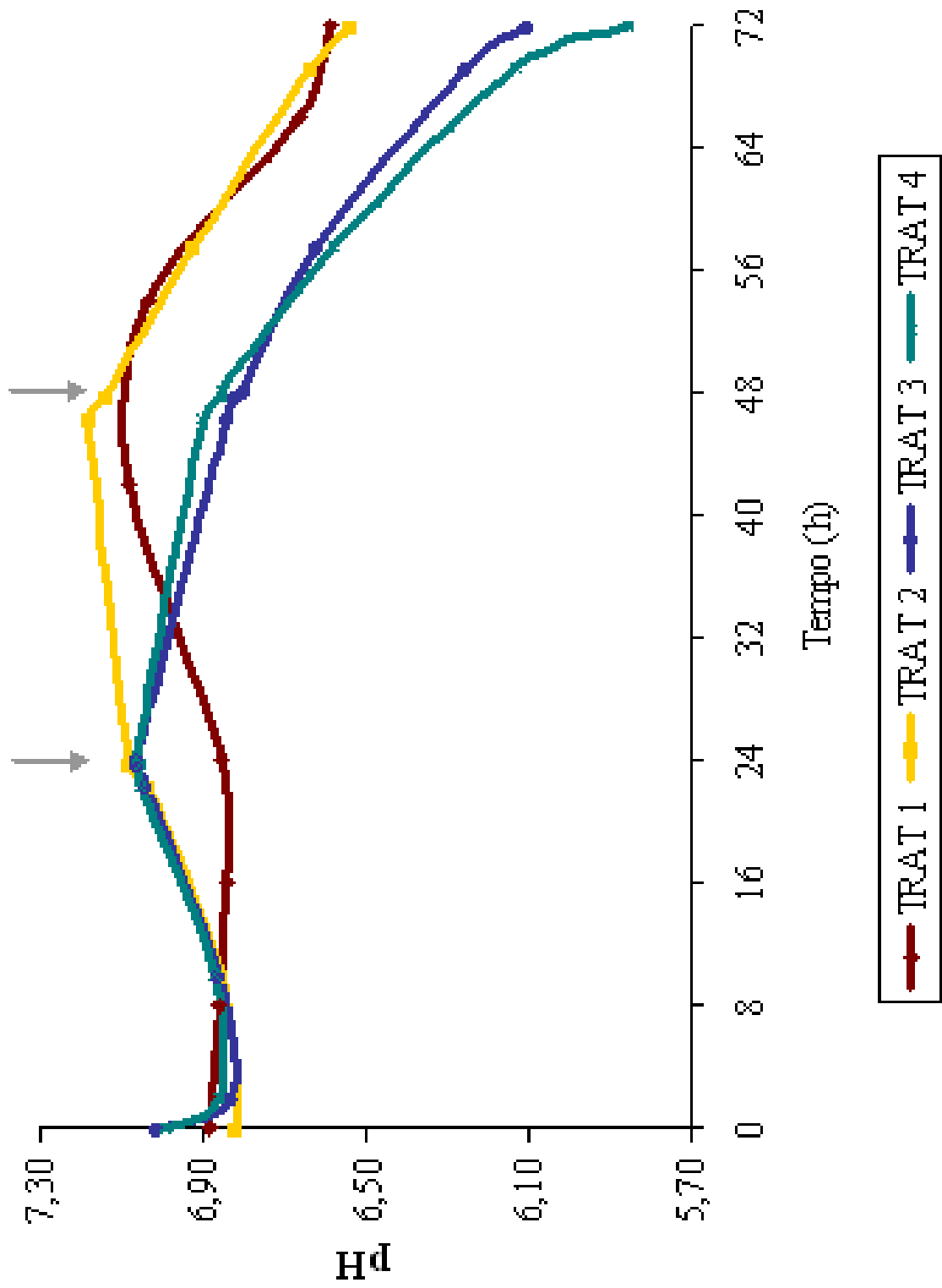


Figura 10: pH em função do tempo de produção de goma a 30°C.

Setas indicam o momento da alimentação (24 e 48 horas) para TRAT 3 e 4.

TRAT 1: 2 + 0 + 0 = 2% ART; TRAT 2: 4 + 0 + 0 = 4% ART;

TRAT 3: 2 + 1 + 1 = 4% ART; TRAT 4: 1 + 2 + 1 = 4% ART.

As médias das biomassas secas no tempo final de produção de goma xantana em todos os tratamentos e temperaturas estão mostradas na Tabela 3.

A temperatura de produção a 30°C favoreceu a concentração de biomassa seca em todos os ensaios. A biomassa seca dos tratamentos contendo 4% de açúcares redutores totais (TRAT 2, 3 e 4) foi semelhante em todas as temperaturas. Nota-se também que uma menor razão C/N estimulou o crescimento celular. Isso pode ser explicado por uma possível inibição inicial ao crescimento celular pelo oferecimento de toda a sacarose no início na produção. Muitos trabalhos (DE VUYST, LOO e VANDAME, 1987; FUNAHASHI et al., 1987; ZHAO et al., 1991; LO et al., 1997) apontam que altas pressões osmóticas inibem o crescimento celular de *Xanthomonas campestris*. Oliveira (2002), testando diferentes temperaturas e concentrações iniciais de sacarose na produção de goma xantana em batelada simples, verificou que a média da biomassa seca estava em torno de 3 gramas, estando, portanto, de acordo com os dados deste trabalho.

Entre os tratamentos 3 e 4 notou-se maior produção de biomassa no TRAT 3, sugerindo que 2% de sacarose no início da fase de produção e adição correspondente a 1% de sacarose estimulam a síntese celular.

Tabela 2: Biomassa seca do tempo 72h de produção em função do tratamento de adição de sacarose e em diferentes temperaturas.

TRATAMENTO	Biomassa seca (g L ⁻¹)			
	25°C		30°C	
	$\bar{x}$	F	$\bar{x}$	F
1	2.01±0.38 ^a	8.86	2.77±0.27 ^a	15.58
2	0.97±0.30 ^b		1.39±0.40 ^b	
3	1.38±0.37 ^{a,b}		1.52±0.25 ^b	
4	0.82±0.06 ^b		1.29±0.33 ^b	

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Sendo $\bar{x}$ média aritmética; e F o valor calculado no teste de Tukey.

TRAT 1: 2 + 0 + 0 = 2% ART; TRAT 2: 4 + 0 + 0 = 4% ART;

TRAT 3: 2 + 1 + 1 = 4% ART; TRAT 4: 1 + 2 + 1 = 4% ART.

A Tabela 3 mostra os dados de quantidade de goma xantana extraída nos tratamentos de batelada simples e alimentada.

O tratamento que favoreceu a produção de maior quantidade de goma xantana foi o TRAT 4 a 25°C (18,1 gL⁻¹). Entre os tratamentos de batelada alimentada na temperatura de produção 30°C, a maior concentração de goma xantana foi produzida também

pelo TRAT 4 (14,0 gL⁻¹). A goma produzida por batelada simples apresentou melhores resultados quando produzida com 4% de sacarose a 25°C (TRAT 2; 16,7 gL⁻¹) ou com 2% de sacarose a 30°C (12,4gL⁻¹).

Tabela 3: Goma xantana do tempo 72h de produção em função do tratamento de adição de sacarose e em diferentes temperaturas.

TRATAMENTO	Goma Xantana (gL ⁻¹)			
	25°C		30°C	
	$\bar{x}$	F	$\bar{x}$	F
1	12.7±0.45 ^a	63.11	12.4±0.97 ^{a,b}	4.40
2	16.7±0.26 ^b		11.5±0.52 ^a	
3	14.8±0.19 ^c		12.5±0.65 ^{a,b}	
4	18.1±0.85 ^d		14.0 ±1.15 ^b	

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Sendo $\bar{x}$ média aritmética; e F o valor calculado no teste de Tukey.

TRAT 1: 2 + 0 + 0 = 2% ART; TRAT 2: 4 + 0 + 0 = 4% ART;

TRAT 3: 2 + 1 + 1 = 4% ART; TRAT 4: 1 + 2 + 1 = 4% ART.

A viscosidade da solução 1% de goma xantana produzida em cada tratamento e temperatura é mostrada na Figura 11.

A goma produzida a 25 °C apresentou, no geral, viscosidades superiores às gomas produzidas a 30°C. Esse resultado está de acordo com Oliveira (2007).

Das gomas produzidas a 25°C, TRAT 2 originou goma de melhor qualidade (644,4 cP) embora não haja diferença estatística entre essa e as gomas produzidas em TRAT 1 e TRAT 3 (593,4 cP e 559,4 cP respectivamente).

O tratamento que produziu goma mais viscosa na fermentação a 30°C foi o TRAT 1 (593,0 cP). As viscosidades das gomas produzidas nos outros tratamentos foram estatisticamente iguais (TRAT 2= 319,0 cP; TRAT 3= 248,4 cP e TRAT4= 341,4 cP).

Em qualquer temperatura, as maiores viscosidades correspondem às gomas produzidas em batelada simples (25°C, TRAT 2= 644,4 cP e 30°C, TRAT 1= 593 cP).

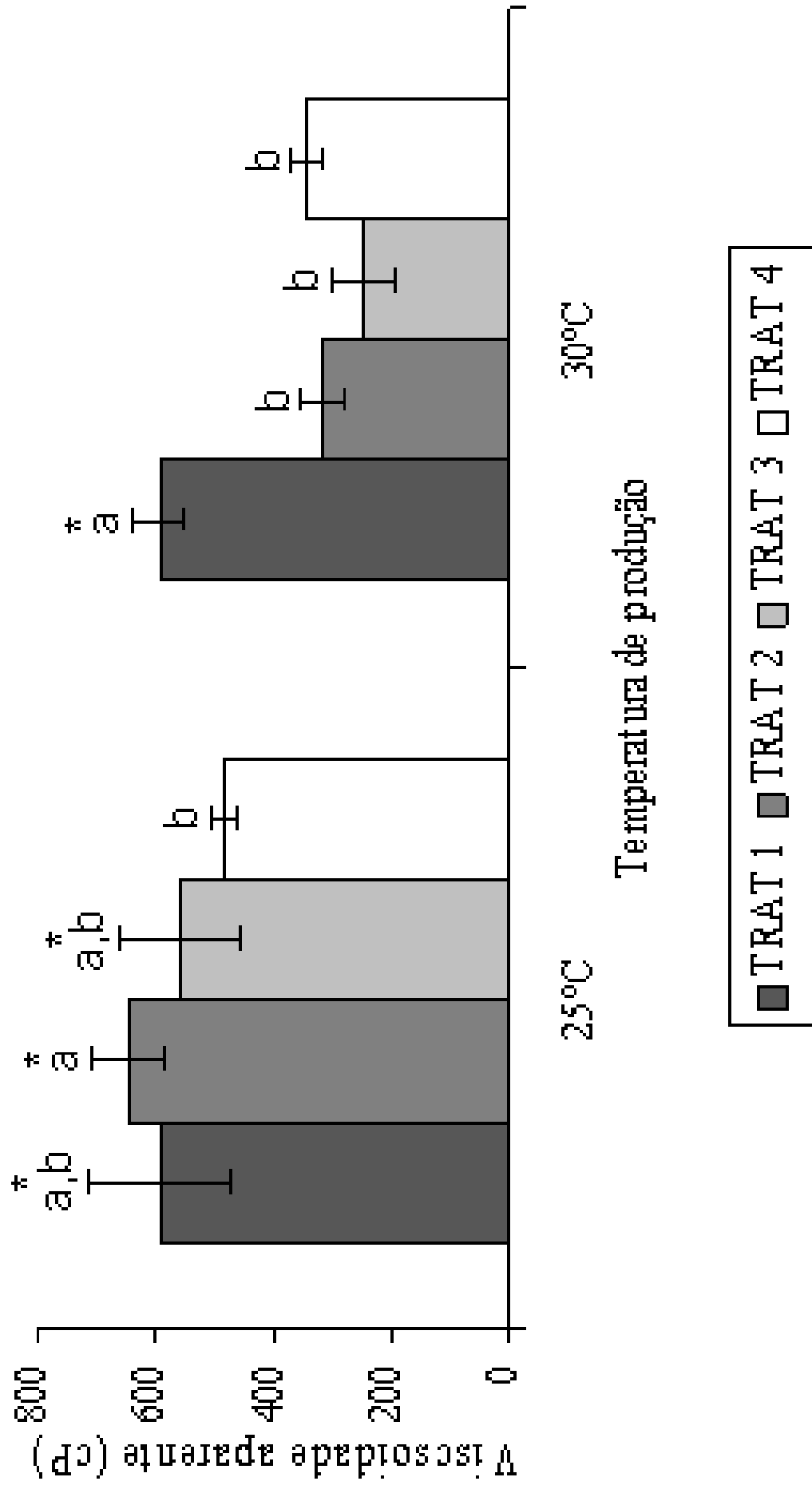


Figura 11: Média da viscosidade da solução 1% de goma xantana em função do protocolo de adição de sacarose.

F_{25°C} = 7,30 e F_{30°C} = 9,50.

TRAT 1: 2 + 0 + 0 = 2% ART; TRAT 2: 4 + 0 + 0 = 4% ART;

TRAT 3: 2 + 1 + 1 = 4% ART; TRAT 4: 1 + 2 + 1 = 4% ART.

A seguir a Tabela 4 mostra o rendimento de goma xantana em função da massa de sacarose consumida.

Nos tratamentos que foram oferecidos 2% de sacarose no meio de cultura (TRAT 1) o maior rendimento corresponde à temperatura de produção de 30°C (0,78).

Nos outros tratamentos (TRAT 2, TRAT 3 e TRAT 4) o rendimento foi melhor quando a temperatura de fermentação era de 25°C. Oliveira (2002) reportou rendimento de 0,42 g xantana/g sacarose na produção a 30°C em meio contendo 4% de sacarose.

Verificou-se que o processo de produção em batelada alimentada apresenta rendimentos estatisticamente iguais aos produzidos em batelada simples com mesma concentração de sacarose.

Tabela 4: Rendimento de goma xantana em função do tratamento de adição de sacarose e em diferentes temperaturas.

TRATAMENTO	Y _{P/S} (g xantana/g sacarose)			
	25°C		30°C	
	$\bar{x}$	F	$\bar{x}$	F
1	0.69±0.14 ^a	9.57	0.78±0.02 ^a	29.02
2	0.47±0.06 ^b		0.35±0.01 ^b	
3	0.42±0.02 ^b		0.38±0.02 ^b	
4	0.48±0.03 ^b		0.36 ±0.13 ^b	

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Sendo $\bar{x}$ média aritmética; e F o valor calculado no teste de Tukey.

TRAT 1: 2 + 0 + 0 = 2% ART; TRAT 2: 4 + 0 + 0 = 4% ART;

TRAT 3: 2 + 1 + 1 = 4% ART; TRAT 4: 1 + 2 + 1 = 4% ART.

4.2. Estudo da produção de goma xantana por batelada simples em fermentador de 7,5 litros

Dos protocolos testados em incubadora com agitação orbital, dois foram testados em fermentador, a produção a 25°C por batelada simples em meio contendo 4% de sacarose e a produção a 30°C por batelada simples em meio contendo 2% de sacarose. Esses protocolos foram escolhidos, pois produziram goma de melhor qualidade, comparado aos outros tratamentos.

Em todos os protocolos a concentração de oxigênio dissolvido não foi inferior a 40%.

A concentração de oxigênio dissolvido diminuiu ao longo da fermentação. A viscosidade do caldo foi crescente, dificultando a transferência de oxigênio para o interior celular. Essa dificuldade foi mencionada em trabalhos utilizando fermentadores (PETERS, et al., 1992, AMANULLAH, TUTTIETT e NIENOW, 1998a; AZUAJE e SANCHEZ, 1999 e GARCIA-OCHOA et al., 2000).

A Figura 12 ilustra a variação de sacarose, biomassa seca e goma durante a fase de produção de goma xantana na produção a 25°C em meio contendo 4% de sacarose.

O consumo de açúcares apresentou ritmo constante desde o começo da produção até 46 horas, quando a concentração de sacarose estava em torno de 8 g L⁻¹. Essa desaceleração pode ser explicada pela dificuldade do microrganismo em alcançar o substrato para consumo em caldo fermentativo com viscosidade crescente (de 369,7 cP para 799,8 cP entre 44 e 48 horas). A sacarose foi consumida até restarem 2 g L⁻¹.

Na fermentação à 25°C a biomassa estabilizou-se em 0,2 g L⁻¹ entre 24 e 40 horas, voltando a crescer até 1,25 g L⁻¹ quando a fermentação foi interrompida.

A demanda de oxigênio foi tal que a rotação do fermentador foi mantida a 800 rpm a partir de 44 horas e a 1000 rpm a partir de 62 horas.

A concentração de goma xantana aumentou até 72 horas atingindo 23,8 g L⁻¹, o que indica que as células estariam ainda consumindo a sacarose disponível. O rendimento e a concentração de goma foram melhores que aqueles testados, nas mesmas condições, em agitador orbital. O mesmo foi relatado por Faria e colaboradores (2009).

O rendimento nesse protocolo foi de 0,62 g xantana/g sacarose, porém melhor rendimento foi obtido na produção a 30°C em meio contendo 2% de sacarose, descrito a seguir.

O pH ao longo da produção variou entre 6,8 a 6,9 com máxima de 7,5 em 27 horas de fermentação.

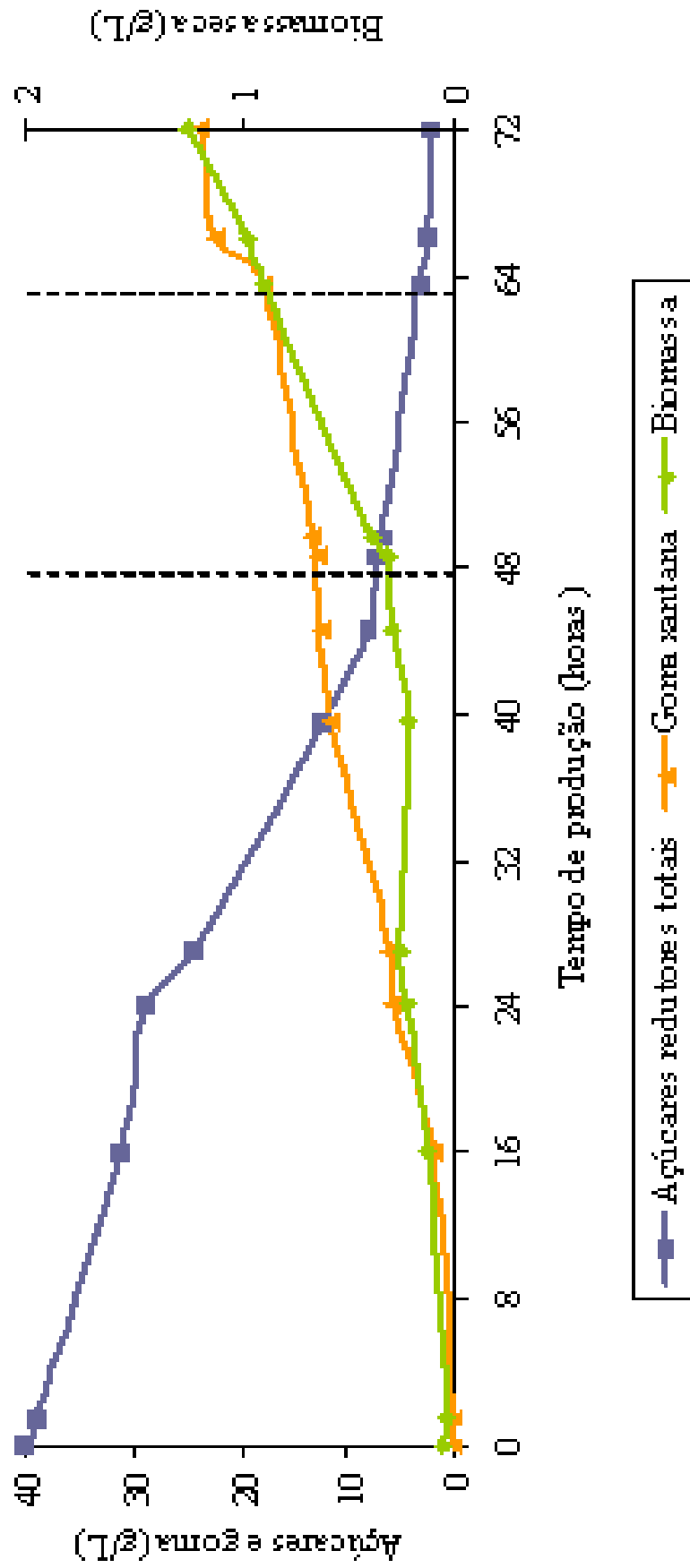


Figura 12: Produção de goma xantana por batelada simples a 25°C em meio contendo 4% de sacarose. As retas tracejadas indicam o momento a partir do qual o agitador passou a trabalhar de 500 rpm a 800 rpm (primeira reta) e de 800 rpm a 1000 rpm (segunda reta).

A viscosidade da goma em solução 1% e do caldo ao longo do tempo de fermentação é mostrada na Figura 13

A viscosidade da solução 1% de goma xantana produzida em 72 horas (220,5 cP) não foi a goma de melhor qualidade. Das amostras lidas, a goma com maior viscosidade foi a produzida até 39 horas (365,9 cP). A viscosidade do caldo alcançou 4161 cP (na taxa de cisalhamento correspondente a $10,6 \text{ s}^{-1}$).

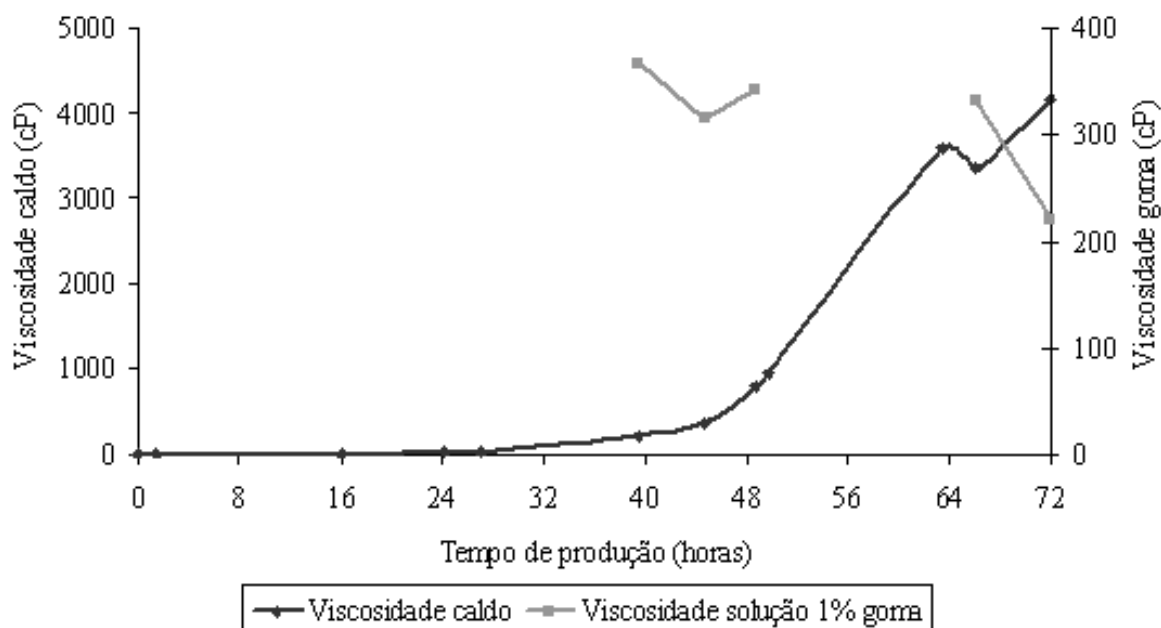


Figura 13: Viscosidade do caldo e da goma xantana produzidos em batelada simples a 25°C em meio contendo 4% de sacarose.

A Figura 14 mostra a produtividade da fermentação a 25°C em meio contendo 4% de sacarose. A produtividade máxima ocorreu em 66 horas (0,34 g xantana L⁻¹·h⁻¹) e a produtividade final foi 0,33 g L⁻¹·h⁻¹. Essa produtividade é próxima às relatadas por Ju e Zhao (1993) (0,33 g L⁻¹·h⁻¹ usando batelada alimentada de 200 horas e dispersão água/óleo) e Funahashi e colaboradores (1987) (0,36 g L⁻¹·h⁻¹ em batelada alimentada de 120 horas).

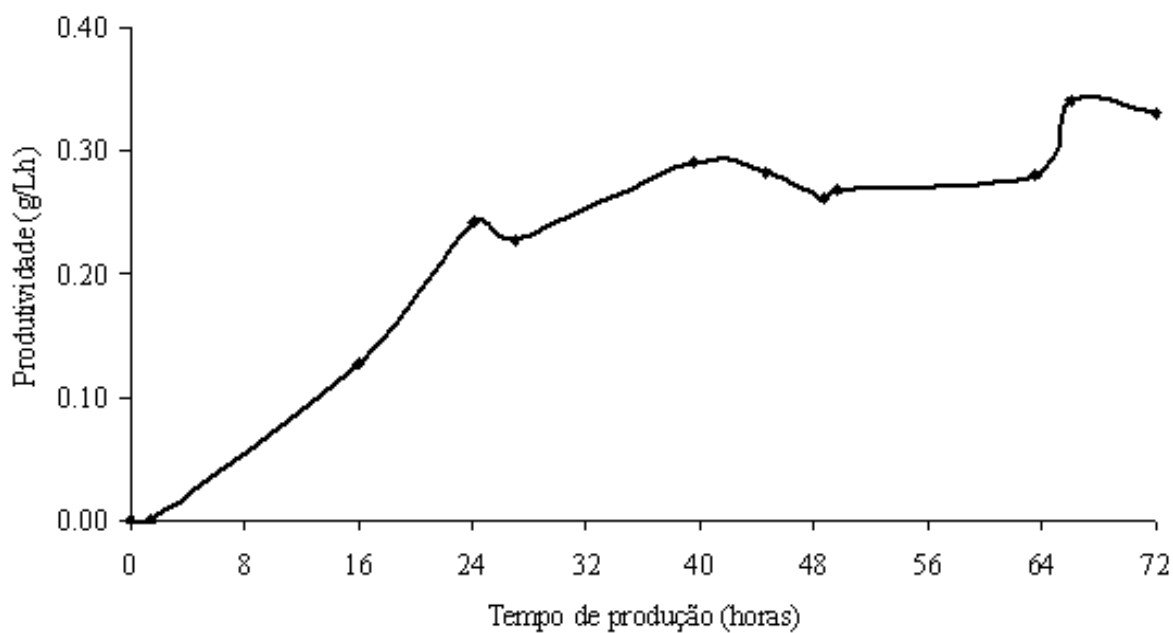


Figura 14: Produtividade (g xantana L⁻¹·h⁻¹) na produção de goma xantana em batelada simples a 25°C em meio contendo 4% de sacarose.

Na Figura 15 a seguir está ilustrada a variação da concentração de sacarose, biomassa seca e goma ao longo das 72 horas de fermentação a 30°C em meio contendo 2% de sacarose.

Os dados mostram que houve consumo mais acelerado de sacarose entre 24 e 48 horas, período esse que coincidiu com a fase log de crescimento bacteriano.

Pode-se notar que o crescimento celular nessa fermentação chegou até a fase de declínio, quando a taxa de morte celular é maior que a de crescimento. A concentração celular na fase estacionária foi em torno de 1,8 g L⁻¹. Maior concentração de biomassa foi obtida nesse protocolo, comparada à produção a 25°C em meio contendo 4% de sacarose.

A concentração de goma foi constante nas últimas 48 horas de produção (em torno de 15 g L⁻¹), sugerindo que a produção nessas condições poderia ser interrompida antes das 72 horas. Uma fermentação com aproximadamente 40 horas (quando haveria 15 g L⁻¹ de goma xantana com viscosidade de 235 cP) seria mais interessante uma vez que os valores em 72 horas são similares (16,0 g L⁻¹ e 200 cP). Também nestas condições a concentração de xantana e o Y_{p/s} foram superiores nos experimentos em fermentador do que em agitador orbital.

A demanda de oxigênio foi bastante acelerada, uma vez que, para manter a concentração de oxigênio a rotação foi aumentada para 800 rpm com 24 horas de fermentação e para 1000 rpm (agitação máxima do equipamento) em 48 horas.

O rendimento nesse protocolo foi de 0,88 g xantana/ L.h. Esses dados são superiores a trabalhos com linhagens melhoradas (0,80 g xantana/ L.h reportado por MARQUET et al., 1989) ou com bateladas alimentadas (0,70 g xantana/ L.h relatado por WERNEAU, 1981; 0,82 g xantana/ L.h de acordo com AMANULLAH, TUTTIETT e NIENOW, 1998a).

O pH ao longo da produção variou de 6,8 a 5,4, com máximo de 7,22.

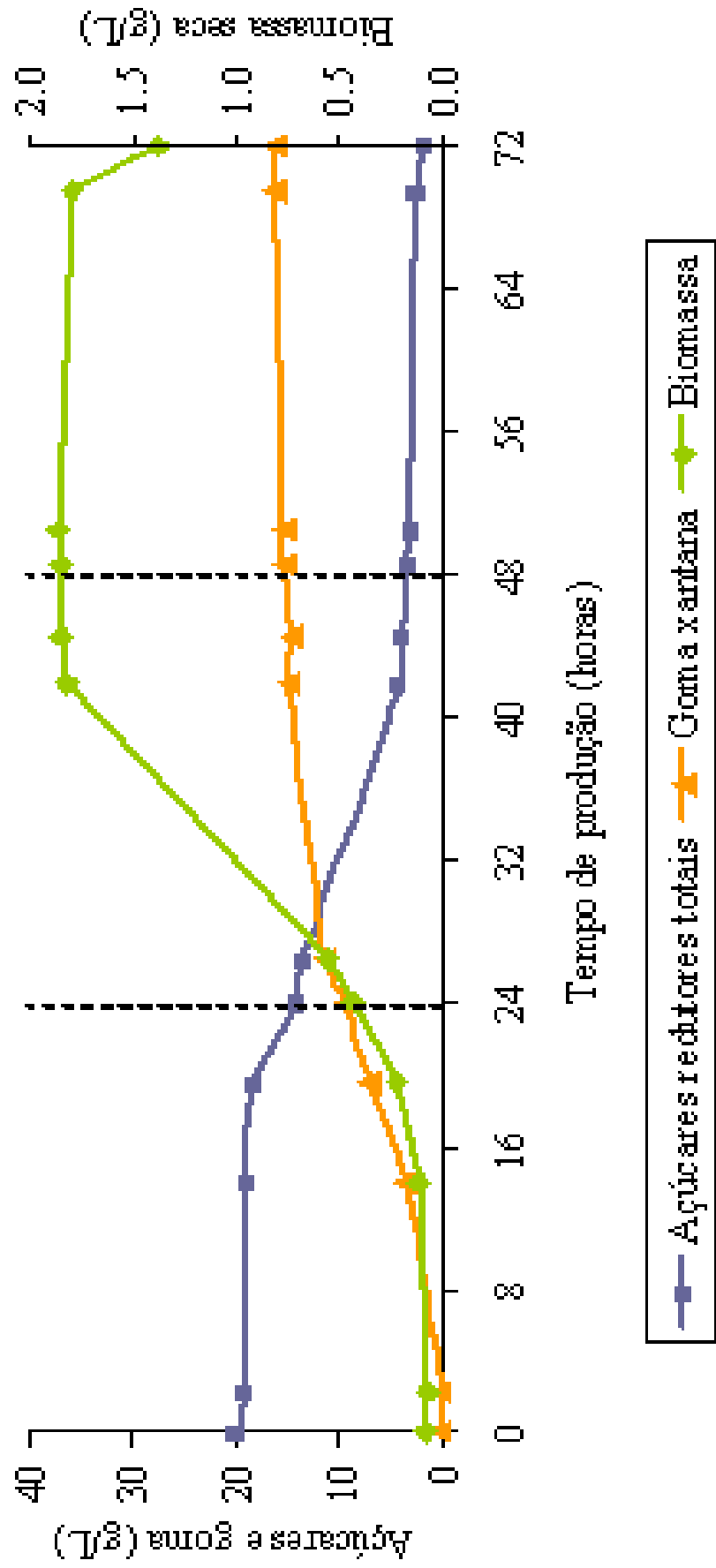


Figura 15: Produção de goma xantana por batelada simples a 30°C em meio contendo 2% de sacarose. As retas tracejadas indicam o momento a partir do qual o agitador passou a trabalhar de 500 rpm a 800 rpm (primeira reta) e de 800 rpm a 1000 rpm (segunda reta).

A Figura 16 a seguir apresenta a viscosidade da goma e do caldo ao longo da produção de goma xantana, quando foi utilizado meio contendo 2% de sacarose e temperatura de fermentação de 25°C.

Nessas condições a qualidade da goma foi maior em tempo anterior ao tempo final da fermentação (quando a viscosidade da solução 1% de goma xantana foi de 204,0 cP), sendo máxima em 44 horas de fermentação (235,4 cP).

A viscosidade do caldo alcançou 1974 cP no fim da fermentação.

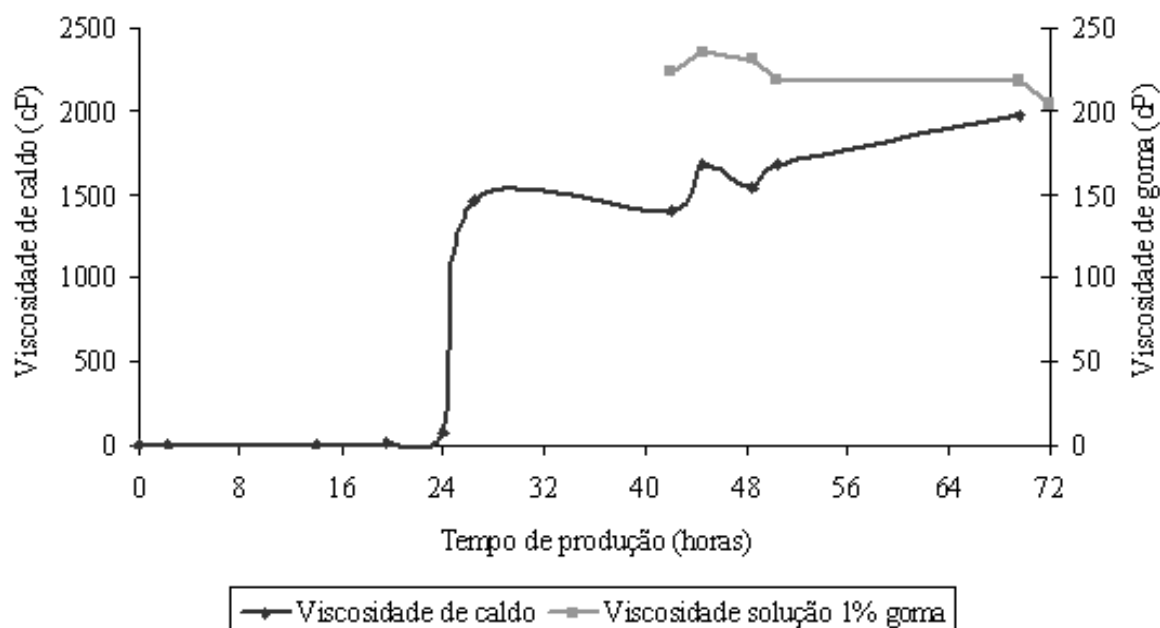


Figura 16: Viscosidade do caldo e da goma xantana produzidos por batelada simples a 30°C em meio contendo 2% de sacarose.

A produtividade da fermentação a 30°C em meio contendo 2% de sacarose ao longo do tempo de fermentação é apresentada na Figura 17.

Notou-se que a produtividade máxima foi de 0,42 g L⁻¹·h⁻¹ em 26 horas de fermentação e a produtividade em 72 horas de produção foi de 0,22 g L⁻¹·h⁻¹. Essa produtividade foi inferior à produtividade em meio contendo 4% de sacarose a 25°C, mas superior à conseguida por Zhao e colaboradores (1991) pelo processo de batelada simples de mais de 100 horas (0,18 g L⁻¹·h⁻¹). De acordo com Amanullah e colaboradores (1998b) já foram descritas em fermentadores produtividades entre 0,12 e 0,43 g L⁻¹·h⁻¹.

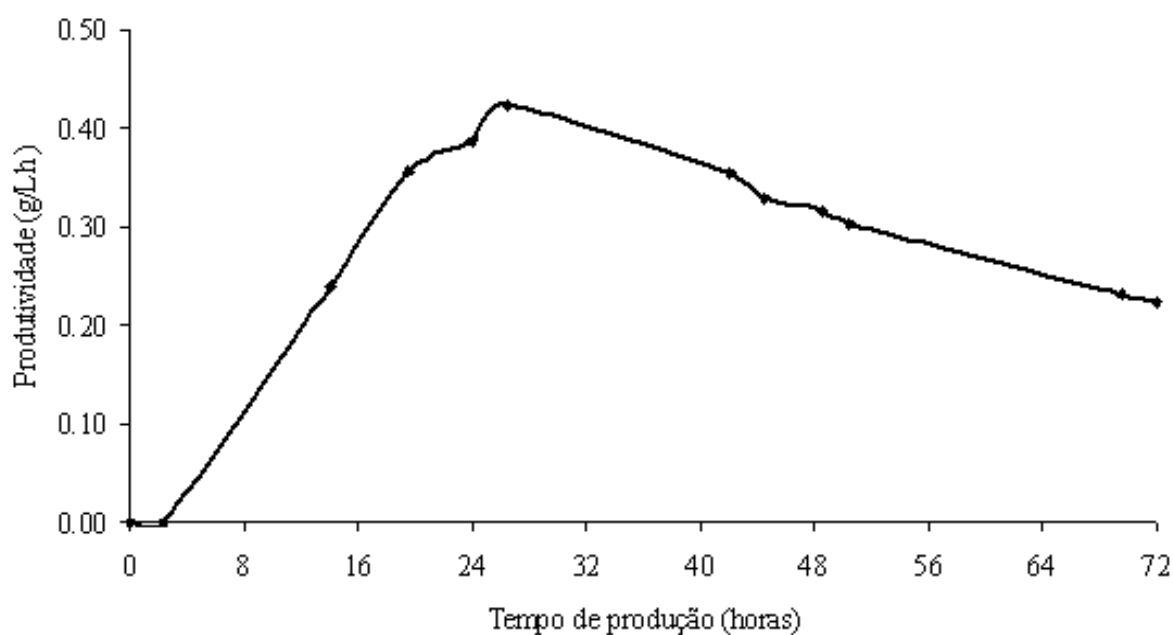


Figura 17: Produtividade (g L⁻¹·h⁻¹) na produção de goma xantana por batelada simples a 30°C em meio contendo 2% de sacarose.

4.3. Estudo da extração de goma xantana

4.3.1. Efeito do acréscimo de sais ao etanol utilizado para extração da goma xantana

A Tabela 5 mostra os dados de concentração da goma extraída com soluções etanólicas salinas.

Utilizaram-se concentrações de sais menores que aquelas comumente investigadas (PINTO et al., 2000; STARK, et al., 2008).

Os tratamentos que se destacaram na quantidade de goma extraída do caldo foram os tratamentos com KCl a 0,1% (10,4 g xantana L⁻¹), 0,05% de NaCl (9,9 g xantana L⁻¹) e 0,05% de CaCl₂ (10,7 g xantana L⁻¹). Nesses tratamentos poderiam ser economizados, respectivamente, 14%, 10% e 16% do solvente sem que isso ocasionasse prejuízo à concentração de xantana recuperada.

Stark e colaboradores (2008) relataram a redução de 50% de etanol necessário para recuperação quando utilizaram 1% de NaCl e acetona (etanol:acetona na proporção 75:25) para recuperação de xantana.

Tabela 5: Concentração da goma xantana extraída com adição de sais ao etanol.

Sais	Goma Xantana extraída (g L ⁻¹)					F
	0%	0,001%	0,01%	0,05%	0,1%	
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	
KCl	9.0 ^a ±0.23	9.6 ^b ±0.18	8.8 ^{b,c} 0.17	9.8 ^d ±0.26	10.4 ^a 0.09	31.22
NaCl	9.0 ^{a,b} ±0.23	9.2 ^{a,b} ±0.79	8.5 ^a ±0.15	9.9 ^b ±0.36	9.5 ^{a,b} 0.15	4.11
CaCl ₂	9.0 ^a ±0.23	10.0 ^b ±0.23	10.2 ^b ±0.13	10.7 ^b 0.73	9.3 ^{a,b} ±0.20	10.33

Sendo $\bar{x}$ média aritmética; e F o valor calculado no teste de Tukey.

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Os dados de viscosidade da goma extraída por etanol acrescido de sais estão na Figura 18.

A adição dos diferentes sais (KCl, NaCl, CaCl₂) ao etanol no momento de extração da xantana influenciou na viscosidade do biopolímero (p<0,05). Os tratamentos que se destacaram foram 0,01% de KCl (554,4 cP) e 0,01% de NaCl (754,6 cP), respectivamente 16% e 58% melhores que a viscosidade da goma extraída acréscimo de sais ao etanol (477,4 cP). Stark e colaboradores conseguiram viscosidades aproximadamente 40% maiores quando a xantana era recuperada com acréscimo de 1% de NaCl. No presente trabalho, quantidades

menores de NaCl (0,01%) apresentaram viscosidades quase 60% superiores às aquelas extraídas sem a adição de nenhum sal ao etanol no momento da extração.

O acréscimo de CaCl_2 diminuiu a viscosidade da solução aquosa a 1% de goma.

Todos os sais utilizados eram cloretos, indicando que a diferença na viscosidade entre os tratamentos está provavelmente relacionada à influência do cátion na conformação da xantana em solução.

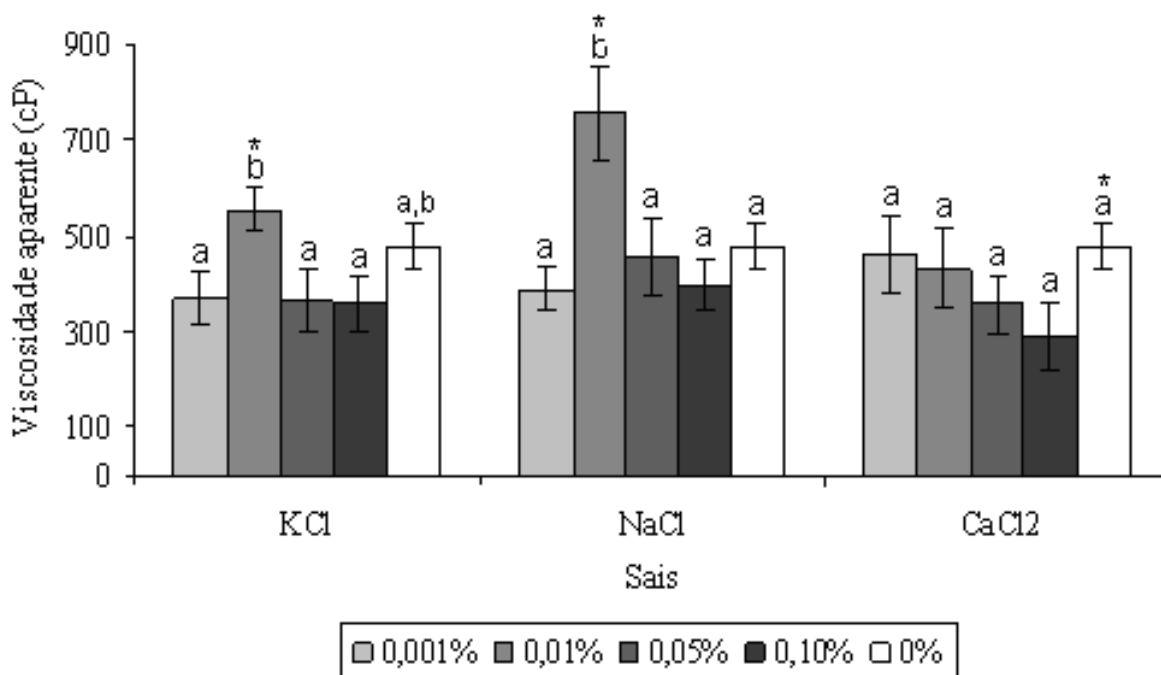


Figura: 18: Viscosidade da goma xantana extraída com a adição de sais ao etanol.

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.3.2. Efeito da adição de sais no caldo fermentativo na extração da goma xantana

Na segunda etapa do teste de extração de goma xantana foram verificadas a concentração e viscosidade da solução de goma xantana extraída com o acréscimo de sais no caldo de fermentação. Foi utilizado outro lote de caldo para este teste.

Os dados de concentração de goma extraída com adição de sais ao caldo são apresentados na Tabela 6.

A massa seca de goma extraída é dependente da adição de sais ao caldo de fermentação ($p < 0,05$). Os tratamentos que se destacaram em quantidade de goma xantana extraída com adição de sais ao caldo no momento da extração foram KCl a 0,001% (16,0 g xantana L^{-1}), NaCl a 0,001% (18,1 g xantana L^{-1}) e CaCl_2 a 0,05% (20,2 g xantana L^{-1}). Esses

resultados indicam que a adição de sais ao caldo permite uma economia de, respectivamente, 5%, 12% e 25% no volume de solvente utilizado sem que ocorra prejuízo na quantidade de xantana extraída.

Tabela 6: Concentração da goma xantana extraída com adição de sais no caldo fermentativo.

Sais	Goma Xantana extraída (g L ⁻¹)					F
	0%	0,001%	0,01%	0,05%	0,1%	
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	
KCl	15.3±1.09 ^a	16.0±0.93 ^a	15.0±0.41 ^a	14.97±0.34 ^a	13.0±0. ^b	7.93
NaCl	15.3±1.09 ^a	18.1±1.06 ^b	16.3±0.73 ^a	15.7±0.30 ^a	14.7±1.18 ^a	8.04
CaCl ₂	15.3±1.09 ^a	19.6±2.22 ^{b,c}	19.6±3.0 ^a	20.2±0.51 ^{b,c}	19.35±1.48 ^{a,c}	4.04

Sendo $\bar{x}$ média aritmética; e F o valor calculado no teste de Tukey.

Letras diferentes indicam diferença estatística.

Os dados da viscosidade em função da adição de sais no caldo estão na Tabela 7. Na análise notou-se que a adição do sal no caldo influencia na viscosidade da solução de goma xantana ($p < 0,05$).

Apesar da economia de solvente que se pode fazer utilizando a adição de sais no caldo antes da extração, qualquer quantidade de sal adicionado em qualquer concentração diminuiu a viscosidade da goma xantana extraída. O uso de sais no caldo antes da extração de goma xantana não é viável pois o produto tem qualidade inferior.

Tabela 7: Viscosidade da goma xantana extraída com a adição de sais no caldo.

Sais	Viscosidade da goma xantana extraída (cP)					F
	0%	0,001%	0,01%	0,05%	0,1%	
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	
KCl	526.8±54.3 ^a	300.7±52.5 ^a	340.0±29.3 ^a	377.3±38.1 ^a	398.2±45.1. ^b	14.33
NaCl	526.8±54.3 ^a	282.7±22.1 ^b	310.4±29.3 ^a	355.0±40.30 ^a	299.2±32.43 ^a	28.59
CaCl ₂	526.8±54.3 ^a	314.9±44.3 ^{b,c}	334.4±40.9 ^{a,c}	309.4±4.8 ^{b,c}	305.4±56.5 ^{a,c}	17.19

Sendo $\bar{x}$ média aritmética; e F o valor calculado no teste de Tukey.

Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.3.3. Efeito do tratamento térmico do caldo fermentativo na extração de goma xantana

De acordo com a Figura 19, o tratamento térmico do caldo (121°C por 15 minutos) influencia a quantidade e a qualidade da goma xantana extraída ($p < 0,05$).

A quantidade de goma xantana extraída do caldo fermentativo sem tratamento térmico foi 13,64 g L⁻¹ e com o tratamento térmico foi 16,03 g L⁻¹. A extração é mais efetiva quando o caldo fermentativo é tratado termicamente nas condições citadas.

A qualidade da solução de goma xantana também foi superior àquela extraída sem o tratamento térmico. A viscosidade da xantana obtida a partir do caldo fermentativo sem tratamento térmico foi de 528,9 cP enquanto que a goma com tratamento térmico apresentou viscosidade 18% superior (625,3 cP).

Outros trabalhos também relataram o aumento da viscosidade da xantana quando o caldo passava pro tratamento térmico (BOROWSKI, BORGES e VENDRUSCOLO, 2007; STARK, et al., 2008).

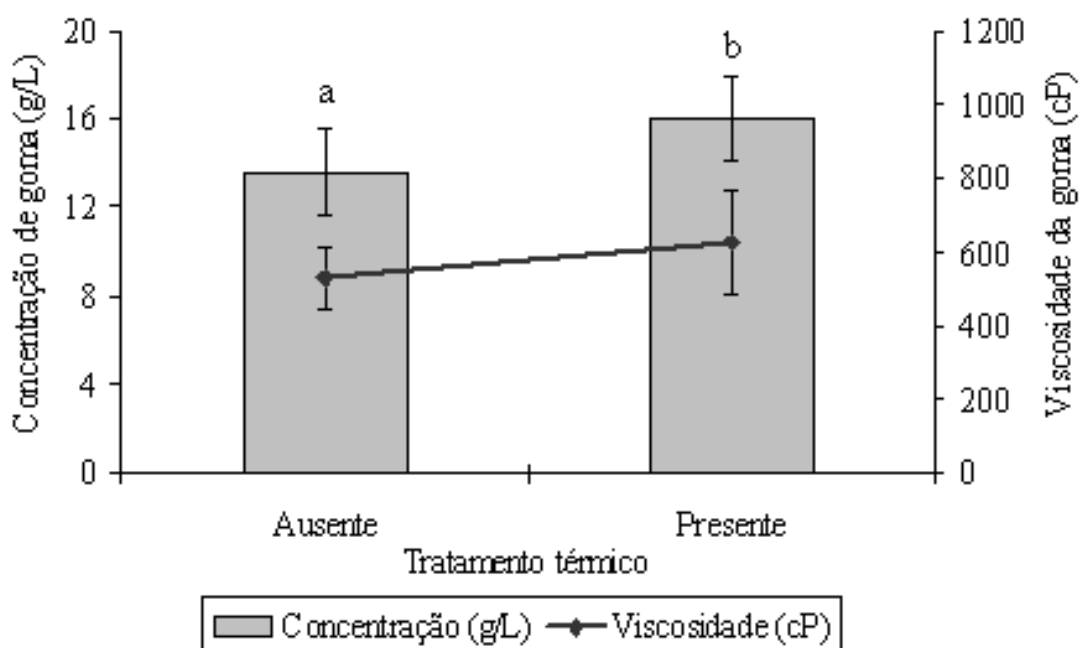


Figura 19: Quantidade e viscosidade de goma xantana extraída em função do tratamento térmico de caldo fermentativo.

Sendo $\bar{x}$ média aritmética; e F o valor calculado no teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferença estatística.

4.4. Efeito da adição de sais ou surfactantes na solução aquosa de goma xantana a 1%

A Tabela 8 mostra os dados do estudo da adição de surfactantes/sais na viscosidade da goma.

Tabela 8: Viscosidade em função da adição de sais ou surfactantes à solução aquosa de goma xantana a 1%.

Sal/Surfactantes	Viscosidade da goma xantana extraída (cP)				F
	0%	0,001%	0,01%	0,1%	
	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	
CCTA	436.8±19.8 ^a	417.1±138.9 ^a	497.5±16.8 ^a	445.3±49.5 ^a	0.71
SDS	436.8±19.8 ^a	442.0±52.5 ^{a,b}	505.4±29.3 ^b	409.8±45.1. ^a	6.62
Tween 80	436.8±19.8 ^a	523.8±22.1 ^b	463.0±29.3 ^a	507.9±32.43 ^b	14.4
TPF	436.8±19.8 ^{a,b}	420.7±44.3 ^a	424.4±40.9 ^{a,b}	478.4±56.5 ^b	3.85

Os índices indicam amostras estatisticamente iguais.

A viscosidade da solução 1% de goma xantana com adição de Cloreto de Cetil Trimetil Amônio (CCTA) não é influenciada pelas diferentes concentrações adicionadas ($p=0,11$).

Nas soluções de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) a maior viscosidade corresponde à solução com esse aditivo na concentração 0,01% (505,4 cP), que foi 16% maior que a viscosidade da solução de goma que não recebeu adição de sal.

O Tween 80 apresentou maior viscosidade na concentração de 0,001% (523,8 cP). Esse resultado foi 20% superior àquele sem acréscimo do Tween 80.

O Tripolifosfato de Sódio (TPF) quando adicionado numa concentração 0,1% à solução de xantana, aumentou a viscosidade da solução em 9,6% em relação ao controle (436,8 cP), porém essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa.

5. CONCLUSÕES

A temperatura e a concentração de açúcares no início e ao longo da produção de xantana são fundamentais no processo fermentativo de *Xanthomonas campestris*.

Em agitador orbital a maior quantidade de goma foi obtida quando produzida a 25°C e a viscosidade do biopolímero também foi superior quando a fermentação aconteceu nessa temperatura, independente do método de alimentação. O Yp/s é maior quando se utiliza concentrações relativamente menores de substrato. A alimentação em pulsos pode aumentar a quantidade de goma produzida tanto a 25°C quanto a 30°C, embora a viscosidade não seja superior àquelas produzidas em batelada simples.

Em fermentador de 7,5 litros, a concentração de goma e o rendimento Yp/s foram superiores quando comparados às mesmas condições de fermentação em agitador orbital. A fermentação de *Xanthomonas campestris* a 30°C em meio contendo 2% de sacarose pode ter seu tempo reduzido sem prejuízo na concentração e viscosidade do biopolímero obtido. São necessários mais estudos em fermentador dessa capacidade para que a viscosidade do biopolímero possa ser melhorada.

As biomassas secas produzidas em agitador orbital e em fermentador foram semelhantes, sendo maiores na fermentação a 30°C em meio contendo 2% de sacarose.

O excesso de viscosidade do caldo dificulta o processo de extração da xantana.

A utilização de sais (KCl, NaCl, CaCl₂) na extração da goma a partir do caldo fermentativo permite economia de solvente diminuindo os custos dessa etapa. A eficácia depende do sal utilizado e de sua concentração. Deve-se adicionar o sal no etanol e usá-lo para precipitação da goma e não a adição de sal no caldo, pois neste caso a viscosidade da xantana foi reduzida com qualquer sal adicionado. Destacaram-se a utilização dos sais NaCl na concentração de 0,01% e CaCl₂ a 0,05%. No primeiro caso há um significativo aumento da viscosidade do biopolímero obtido, enquanto que, no segundo, pode-se conseguir redução de 5 para 4,2 volumes de solvente utilizado para extração de cada volume de caldo.

O tratamento térmico aumenta a quantidade e a viscosidade do biopolímero além de eliminar as células.

A adição dos surfactantes Cloreto de Cetil Trimetil Amônio (CCTA), Dodecil Sulfato de Sódio(SDS), Tween 80 numa solução de xantana em meio aquoso pode aumentar sua viscosidade. Destacam-se a adição de 0,01% de SDS e de 0,001% de Tween 80.

6. REFERÊNCIAS

- AMANULLAH, A; TUTTIETT, B.; NIENOW, A W. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57. p. 198-210. 1998a.
- AMANULLAH, A; SATTI, S; NIENOW, A W. Enhancing xanthan fermentations by different modes of glucose feeding, **Biotechnology Progress**, v.14; p.265-269, 1998b.
- ANTUNES, A. E. C. **Produção, Viscosidade e Composição de Xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* em Meios Convencionais e Alternativos**. Pelotas, 2000. 77 p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. UFPEL. 2000.
- ATKINS, P. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. São Paulo: Bookman, 2001. p. 698-701.
- AZUAJE, R. A., SANCHÉZ, J. A. Produccion de xantano por *Xanthomonas campestris* em um médio de cultivo no convencional. **Acta Científica Venezolana**, v. 50, p. 201-209. 1999.
- BAIRD, J. K.; PETTIT, D. J. Biogymys 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.
- BARNES, H. A., HUTTON, J. F., WALTERS, K. Viscosity. In: **An Introduction to rheology**. New York. Elsevier Applied Science. P.11-35. 1989.
- BERWANGER, A. L. S. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingonomas capsulate***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada ao Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2005.
- BETZ, D. A. Xanthan gum, a biosynthetic polysaccharide for the food industry. **Food Technology in Australia**, p 11-16, jan 1979.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do Processamento de Alimentos**. 3a. ed. Revista e Ampliada. 143 p. (2001).

BORGES, C. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Utilização de diferentes de solventes e sais na recuperação de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 06. In.: **10º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPel**, 2001, Pelotas.

BORGES, C. D., de PAULA, R. C. M, FEITOSA, J. P. A, VENDRUSCOLO, C. T. The influence of thermal treatment on xanthan produced by *X. arboricola* pv *pruni* strain 106 under different operational conditions. **Carbohydrates polymers**. 2008.

BOROWSKI, J. M.; BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Influência da composição química no comportamento reológico da xantana. In.: **XVI CIC, IX ENPOS**. N. 9, Pelotas. 2007.

BRADBURY, J. F. *Xanthomonas*. Dowson. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilins, v. 1, 1984.

CADMUS, M.C., ROGOVIN, S. P., BURTON, K. A., PITTSLEY, J. E., KNUTSON, C. A., JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p 942-948, 1976.

CANILHA, L., SILVA, D.V., CARVALHO, W., MANCILHA, I.M. Aditivos Alimentares Produzidos por via Fermentativa. Parte 3: Polissacarídeos e Enzimas. **Revista Analítica**, nº 20, Janeiro 2006.

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

CHALLEN, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: NISHINARI, K.; DOI, E. **Food hydrocolloids**: structures, properties, and functions. New York: Plenum Press, 1993. p. 135-140.

CHIA-HUA, H., Y. MARTIN, L. Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1617-1625, 2003.

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.

COTTRELL, I. W. Industrial potential of fungal and bacterial polysaccharides. **ACS Symposium series 126**. Sandford and Matsuda (ed.), p.251-270, 1978.

COTTRELL, I. W., KANG, K. S.; KOVACS, P. Xanthan gum. In: DAVIDSON, R. **Handbook of water-soluble gums and resins**. New York: Mc Hill, 1980.

CRESCENZI, V. Microbial Polysaccharides of Applied Interest: Ongoing Research Activities in Europe. **Biotechnology Progress**. New York, v.11. p. 251-259. 1995.

CRUZ, C. H. G. **Contribuição ao estudo dos fatores envolvidos na produção da goma xantana por *Xanthomonas manohotis***. Campinas. 41p Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. 1983.

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.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology**, Amsterdam, v. 23, n.2, p.153-177. 1999.

DIAZ, P. S. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p. 15-28, jan./jun. 2004

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

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto. 2005.

ESGALHADO, M. E.; ROSEIRO, J. C.; COLLAÇO, M. T. A. Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 667-671, 1995.

FARIA, S., VIEIRA, P. A., RESENDE, M. M., FRANÇA, F. P., CARDOSO, V. L. A comparison between shaker and bioreactor performances based on the kinetic parameters of xanthan gum production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 156, p. 475-488. 2009.

FLORES CANDIA, J. L.; DECWER, W. D.; Effect of the nitrogen source on private content and rheological properties of xanthan. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 446-452. 1999.

FUNAHASHI, H.; MACHARA, M.; TAGUSHI, H.; YOSHIDA, T. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. **J. Chem. Eng. Jpn.** 1987. V.65, p.603-606.

GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. London: **Institution of Chemical Engineers**, p. 227-237, 1994

GARCIA-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.

GARCIA-OCHOA, F., CASAS, J. A., MOHEDANO, A. F. Precipitation of xanthan gum. **Separation Science and Technology**. V. 28, p. 1303-1313. 1993.

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

GARCIA-OCHÔA, F., SANTOS, V. E., ALCON, A. Chemical structured kinetic model for xanthan production. **Enzyme and Microbial Technology**, 35: 284-292, 2004.

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

GRATAO, A. C. A.; BERTO, M. I.; SILVEIRA JUNIOR, V. Reologia de açúcar líquido invertido: influência da temperatura na viscosidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.24, n.4. p. 652-656. out-dez. 2004.

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 precursors of xanthan gum. **Journal of General Microbiology**, 139: 447-457, 1993.

HARDING, N.E.; CLEARY, J.M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: Hui, Y.H.; Khachatourians, G.G. (Ed.) **Food biotechnology microorganisms**, VCH, p. 495-514, 1994.

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

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

JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v.28, n.5, p. 34-40, 1974.

JU, L.; ZHAO, S. Xanthan Fermentations in Water/Oil Dispersions. **Biotechnology. Tech.**, v. 7, p.463-468. 1993.

KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; COTTRELL, I. W. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. In.: BUSHELL, M. E. (ed.) **Progress in Industrial Microbiology**, v.18, p. 231-257. 1983.

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

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

KI-WON, S., YONG-SEOK, K., GAP-SHIK, C. Rheology of concentrated xanthan gum solutions: steady shear flow behavior. **Fibers and Polymers**, v. 7, n.2, 129-138. 2006.

KÖPLIN, R.; ARNOLD, W.; HÖTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G.E.; PÜHLER, A. Genetics of xanthan production in *X. campestris*: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v.174, n. 1; p. 191-199. 1992.

LEE, P. K., CHANG, H. N. KIM, B. H. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in continuous fermentation. **Biotechnology Letters**, 11 (8), 573-578. 1989.

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

LIMA, U. A. AQUARONI, E. BORZANI, W.; SCMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, v.3, p125-154, 2001.

LINDBLOM, G. P., PATTON, J. T. **Heteropolysaccharide fermentation process**. U. S. Pat., n.3, 232-328, 1967.

LO, Y. M.; YANG, S. T.; MIN, D. B. Effects of yeasts extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Appl. Microbiology. Biotechnology**. V. 47. p. 689-694. 1997.

LOOIJESTEIJN, P. J., TRAPET, L., VRIES, E., ABEE, T., HUGENHOLTZ J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 71-80, 2001.

LÓPEZ M. J. MORENO J. RAMOS-CORMENZANA A. *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Water Research**, v. 35, n. 7, p. 1828-1830. 2001.

MARCOTTE, M.; HOSHAHILI, A. R. T.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, v.34, p. 695-703, 2001.

MARGARITIS A. PACE, G. W. Microbial polysaccharides. **Comprehensive Biotechnology**. Canada: University of Waterloo, 1985. cap 49, p. 1005-1044.

MARIANO, R. L. R., SILVEIRA, E.B; ASSIS, S. M. P., GOMES, A. M. A., OLIVEIRA, I. S. e PEIXOTO, A. R. Diagnose e manejo de fitobacterioses de importância no nordeste brasileiro. In: MICHEREFF, S. J. e BARROS, R. (Orgs.) **Desafios da proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife. UFRPE. 2001. pp.141-169.

MARQUET, M.; MIKOLAJCZAK, M.; THORNE, L.; POLLOCK J. Improved Strains for Production of Xanthan Gum by Fermentation of *Xanthomonas campestris*. **J. Ind. Microb.** V. 4. p. 55-64. 1989.

MAUGERI-FILHO, F. Produção de polissacarídeos, In: Lima, U. A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. **Biotecnologia Industrial**, Ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1ª ed., vol.3, p.593, 2001.

MEDEIROS, I. S.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; CONCEIÇÃO, J. J.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Influência do método de recuperação e purificação de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 06. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza. **Livro de Resumos**. Fortaleza, 2000. p. 9-29.

MISAKI, A. Structural aspects of some functional polysaccharides. In: NISHIARI, K. & DOI, E. (ed.) **Food Hydrocolloids**. New York, Plenum Press, p.147-150. 1993.

MOORHOUSE, R., WALKINSHAW, M. D., ARNOTT, S. In: **Extracellular Microbial Polysaccharides**, SANFORD, P. LASKIN, A (eds) ACS Symp ser. 45., American Chemical Society, Washington, DC, PP. 90-102.1977.

MORAINE, R. A.; ROGOVIN, P. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.8, p.511-524, 1966.

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

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni**. 1998. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

MORRIS, E. R., CUTLER, A. N., ROSS-MURPHY, S. B., REES, D. A. Concentration of shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solution. **Carbohydrate Polymers**, v.13, p.85, 1981.

MORRIS, E. R. Rheology of hydrocolloids. In.: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. (ed.) **Gums and Stabilizers for the Food Industry**. Oxford, Pergamon Press. p. 57-78. 1984.

MORRIS, V. J. Science, Structure and applications of microbial polysaccharides. In.: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. (ed.) **Gums and Stabilizers for the Food Industry** 6. Oxford, IRL Press. p. 315-328. 1992.

MOSCHAKIS, T., MURRAY, B. S. e DICKINSON, E. Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilized by sodium caseinate and xanthan gum. **Journal Colloid Interface Science**, 284, 714-728. 2005.

MOTT, R. L. **Mecânica de fluidos aplicada**. México: Prentice-Hall Hispanoamericana S. A. 1996.

MURO, M. A.; LUCHI, M. R. **Preservação de microorganismos**. Campinas, Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”. 64p. 1989.

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

NAVARRETTE, R. C.; SHAH, S. N. New Biopolymer for coiled tubing applications. **Society of Petroleum Engineers**, USA, p.1-10, 2001.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **J. Bio. Chem.**, v.153, p.375-380, 1944.

NISHINARI, K.; DOI, E. (ed.). **Food Hydrocolloids**. New York, Plenum Press, 1993.

OLIVEIRA, L. H. S. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de goma Xantana**. Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, UNESP. 2002.

OLIVEIRA, K. S. M. **Efeito da temperatura de produção de goma xantana: viscosidade, rendimento e reologia**. 2007. 26p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Faculdade de Ciências e Letras. Universidade Estadual Paulista, Assis. 2007.

PACE, G. W. Polímeros Microbianos. In: BULOOK, J. KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia Básica**, Acríbia, p.449-462, 1991.

PACE, G. W., RIGHELATO, R. C. Production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**. V.37, p73-80. 2001.

PADILHA, F. F.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; DELLAGOSTIN, O. A.; KOETZ, P. R. Influência dos parâmetros de produção na viscosidade aparente de soluções aquosas de biopolímeros obtidos por *Beijerinckia* sp 7070. In: CONGRESSO DE PÓS-

GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UFPEL, 1.,1997, Pelotas. **Anais...** Pelotas: UFPEL, 1997

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

PASQUEL, A. Gomas: Utilização e aspectos reológicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.33, n.1, p. 86-87, 1999.

PARENTE, E, CRUDELE, M. A.; AQUINO, M.; CLEMENTI, F. Alginate production by *Azobacter venelandii* DSM576 in batch fermentations. **Journal of Industrial Microbiology**, v.20, 171-176. 1998.

PETERS, H.U.; HERBS, H.; SCHUMPE, A.; DECKER, W. D. The molecular weight of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. **Biotechnology Bioengineering**. V34. p. 1393-7. 1989.

PETERS, H. U., SUH, I. S. SCHUMPE, A. DECKWER, W. D. Modeling of batch wise xanthan production. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, 70, 742-750. 1992.

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

PINTO, E. P.; VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; MACHADO, M. I.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; BORGES, C. D. **Influência da adição de sais na viscosidade de biopolímeros de *Beijerinckia* sp 7070 e T32A**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza. Livro de Resumos...Fortaleza, 2000. p.9-31.

PORTILHO, M. **Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de *Agrobacterium* sp**. 2002. 86f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. **Relatório Técnico nº 84 396-205**, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos - Laboratório de Biotecnologia Industrial-LBI/CTPP, 2006. Disponível em <http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf>, acesso em 23/11/2007.

PSOMAS, S. K.; LIANOPOULOU-KYSIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 35, p. 273-280. 2007.

RAO, M. A. Rheology of liquid foods – a review. **Journal of Texture Studies**, v. 8, 135-168. 1977.

RAO, M. A. Rheological properties of foods. In.: RAO, M. A.; RISVI, S. S. **Engineering Properties of Foods**. New York, p. 1-47. 1986.

RAO, M. A. **Rheology of Fluid and Semisolid Foods: principles and applications**. New York: Ed. Aspen Publishers, 1999. p.433.

ROBINSON, D. K.; WANG, D. I. C. A Transport Controlled Bioreactor for the Simultaneous Production and Concentration of Xanthan Gum. **Biotechnology. Prog.** v. 4, p. 231-241. 1988.

ROCKS, J. K. Unusual rheological properties and heat, acid, and salt stabilities make glucose-derived hydrocolloid a versatile food additive. **Food Technology**, Chicago, v.25, p.476-484, 1971.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris*. **Enzyme and microbial technology**, v. 39 p 197-207. 2006.

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

SÁNCHEZ, A.; RAMÍREZ, M. E.; TORRES, L. G.; GALINDO, E. Characterization of xanthans from selected *Xanthomonas* strains cultivated under constant dissolved oxygen. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.13, p.443-451, 1997.

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

SANDFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 36. p. 292-296. 1979.

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.

SHU, C. H.; YANG, S. T. Kinetics and modeling of temperature effects on batch gum fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, p.567-574, 1991.

SILMAN, R. W.; ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 12, p.75-83, 1970.

SILMAN, R. W., ROGOVIN, P. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: effect of dilution rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 14, p.23-31, 1972.

SILVA, C. R. R. **Estudo das condições de produção de xantana através de diferentes formulações de meio de cultura**. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista, Assis. 2004.

SILVA, C. R. R. **Efeito da sacarose e ácidos orgânicos no crescimento celular, na produção e viscosidade de goma Xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *campestris***. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista, 60p, 2007.

SILVA, J. A.; RAO, M. A. Role of rheological behavior in sensory assessment of fluid foods. In.: **Rheology of fluid and semisolid foods principles and applications**, RAO, M. A. (ed) Gaithenburng Aspen Publisher, 443p. 1999.

SILVA, M. F., TREINCHEL, H. Aproveitamento de soro de leite para a produção de polissacarídeos. **Vivências**, Erechim, v.1, Ano 2, n.3, p.213-228. 2006.

SILVA, F. R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L. LEITE, A., ARRUDA, P. Fastidian gum: The *Xilella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, n.203, p.165-171. 2001

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

SOMOGYI, N. A new reagent for the determination of sugars. **J. Bio. Chem.**, v.160, p.61-68, 1945.

SOUSA, C. S. Método de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* pelo sistema radicular para avaliação rápida de resistência de repolho à podridão negra. **Biosci**. Uberlândia, v. 19, n. 1, p. 53-56, 2003

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

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.25, n.4, p. 331-340, out/dez, 2004.

STADING, M. **Gel Structure and Rheology In theory and Practice**. Tese de PhD. Dep. Of Food Science, Chalmers University of Technology, Sweden. 119p. 1988.

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

STARK, C. B.; PREICHARDT, L. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Influência de tratamentos pós-fermentativos no rendimento e viscosidade de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. In.: **XVII CIC, X ENPOS**, n. 17, 2008, Pelotas.

SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysaccharides. Control of synthesis and acylation. In: BERKELY, R. C. W., GOODAY, G. W., and ELLWOOD, D. C. (ed.). **Microbial polysaccharides and polysaccharases**. Academic Press, London, 1979. p. 1-34.

SUTHERLAND, I.W. The role of acylation in exopolysaccharides including those for food use. **Food Biotechnology**, 6 (1): 75-86, 1992.

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

SUTHERLAND, I.W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 249-261, 1997.

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

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

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

TAIT, M. I.; SUTHERLAND, I. W.; CLARKE-WEDLOCK, J.; Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1483-1492. 1986.

TANG, J. -L., LIU, Y. -N., BARBER, C. E., DOW, J. M. WOOTTON, J. C., DANIELS M. J. Genetic and molecular analysis of a cluster rpf genes involved in positive regulation of synthesis of extracellular enzymes and polysaccharides in *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. **Molecular and General Genetics** V.226, n.3, p. 409-417. maio 1991.

TORRES, L. G., BRITO, E., GALINDO, E. CHOPIN, L. Viscous behavior of xanthan aqueous solutions from a variant of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, p. 58-64, 1993.

URLACHER, B.; NOBLE, O. Xanthan gum. In.: IMESON, A. **Thickening and gelling agents for food**. Springer, 2nd edition, p.320, 1999.

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.

VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização de biopolímero produzido por *Beijerinckia sp* isolada do solo cultivado com cana-de-açúcar de Ribeirão Preto – São Paulo – Brasil**. Campinas, 1995. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 143p. 1995.

WERNEAU, W. C. **Fermentation process for production of xanthan**. U.S. Patent N° 4, 4,282,321. 1981.

ZHAO, X.; NIENOW, A. W.; CHATWIN, S.; KENT, C. A.; GALINDO, E. Improving Xanthan Fermentation Performance by Changing Agitators. In.: **Proceedings of the 7th European Conference on Mixing**, Brugge, Belgium; Bruxelmane, M., Froment, G., Eds.; p. 277-283. 1991.