



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

ASPECTOS NUTRICIONAIS NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DA GOMA
XANTANA PRODUZIDA POR *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

CÍNTIA REGINA RODRIGUES CARIGNATTO

ORIENTADOR: PEDRO DE OLIVA NETO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área de concentração: Microbiologia Aplicada).

Dedico esse trabalho:
Ao meu marido Denilson Carignatto e à minha filha Bárbara Rodrigues
Carignatto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Barbara Rodrigues Carignatto que apareceu na minha vida em um período que tinha tudo para ser bastante conturbado, no fim do meu doutorado. No entanto, minha filha Babi me ensinou a ser mãe e pesquisadora de forma comprometida e ao mesmo tempo suave e harmoniosa.

Ao meu marido Denilson Carignatto por seu carinho, companheirismo e sempre confiar em mim. A sua presença em minha vida é fundamental para concretização de todas minhas realizações profissionais e pessoais.

À minha mãe Claudia Regina Rodrigues da Silva que viajou várias vezes 800 Km pra olhar a neta pra que eu pudesse escrever minha tese.

Ao meu pai que ainda não conseguiu entender muito bem o que é um doutorado, mas mesmo assim se orgulha da filha.

Ao Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto pela orientação e amizade que já faz oito anos. Muito obrigada por todo crescimento profissional.

À todos do laboratório de Bioquímica da UNESP de Presidente Prudente em especial às professoras Ana Flora e Maria de Lourdes pela orientação nas análises químicas do meu material.

Às professoras Valéria Marta Gomes de Lima e Ivanise Branco por estarem sempre dispostas a ajudar.

À todos os amigos do laboratório de Biotecnologia Industrial, em especial o grande companheiro nos estudos de xantana, Victor Hugo Magon.

RESUMO

Xanthomonas são bactérias que produzem o biopolímero denominado xantana que apresenta grande aplicabilidade em vários setores industriais. Essas bactérias não apresentam grandes exigências nutricionais, mas os nutrientes disponíveis no meio interferem no processo de biossíntese da xantana. Assim, o presente trabalho objetivou estudar a influência da composição do meio de produção sobre a composição química, massa molecular e qualidade da goma produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Também foram avaliados alguns parâmetros do processo de obtenção desse biopolímero como: modos de extração, temperatura e a comparação entre incubadora orbital e fermentador para produção da xantana. A fermentação foi conduzida em duas etapas, crescimento da biomassa inoculante e produção do biopolímero através de meios formulados por delineamento experimental e citados na literatura. Verificou-se que os nutrientes utilizados no meio de produção interferem na composição química e massa molecular da goma produzida. A ausência da fonte de nitrogênio e a presença de pouco citrato (0,1%) e de lecitina de soja (0,001%) favoreceram a formação da goma xantana mais viscosa que a produzida em meio descrito na literatura. Esta goma de qualidade superior apresentou massa molecular dez vezes maior ($1,17 \times 10^6$ g/mol), e em sua estrutura havia mais acetil e menos piruvil que a goma produzida no meio já citado. O uso de sais (NaCl e KCl) e formaldeído na etapa de extração da goma permitiu a precipitação de uma maior quantidade de xantana. No entanto, ambos interferiram negativamente em sua viscosidade. A adição de sais durante a solubilização da goma não provocou alterações significativas na viscosidade da mesma. Em relação à temperatura, a produção realizada a 25°C favoreceu o crescimento celular e a produção de goma, mas foi a 30°C que se formou xantana de melhor qualidade. O estudo comparativo entre produção em incubadora orbital com 300 ml e o fermentador com 4 L de meio revelou que o segundo foi mais eficiente produzindo 3 vezes mais gomas e com rendimento 3,6 vezes superior.

Palavras-chave: produção, goma xantana, *Xanthomonas campestris*, meio de cultivo.

ABSTRACT

Xanthomonas are producer bacteria of biopolymer denominated xanthan gum that has great applicability in several industrial sections. Those bacteria do not present great nutritional demands, but the available nutrients in the medium interfere in the process of xanthan biosynthesis. The present work aimed to study the influence of the composition of production medium on the chemical structure, molecular mass and quality of the gum produced by *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Other parameters that involve xanthan production also were studied as: extraction, temperature and the use of shaker incubator or reactor. The fermentation was carried out in two stages, biomass growing and biopolymer production using media formulated by experimental design and media mentioned in the literature. It was verified that the nutrients used in the production medium interfere in the chemical composition and molecular mass of the produced gum. The absence of the nutrient nitrogen and the presence of little citrate (0.1%) and lecithin (0.001%) favored the formation of the xanthan more viscous than the gum produced in medium described by Garcia-Ochoa et al. (1992). This better gum presented molecular mass ten times larger (1.17×10^6 g/mol), and structure with more acetate and less piruvate than the gum produced in the last medium mentioned. The use of salts (NaCl and KCl) and formaldehyde in extraction of the gum allowed the precipitation of a larger amount of xanthan, however, both interfered negatively in her viscosity. The salts addition during the gum solubilization did not provide significant alterations in the viscosity. In relation to the temperature, the production conduced at 25°C favored the cellular growth and the gum production, but at 30°C the xanthan of better quality was formed. The comparative study among production in orbital incubator with 300 ml of medium and the bioreactor with 4 L of medium revealed that the second was more efficient, producing 3 times more gums and with yield 3.6 times superior.

Key-words: production, xanthan gum, *Xanthomonas campestris*, production medium.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 <i>Xanthomonas campestris</i>.....	3
2.1.1 Metabolismo.....	4
2.2 Goma Xantana.....	6
2.2.1 Importância econômica.....	6
2.2.2 Estrutura.....	7
2.2.3 Biossíntese.....	10
2.2.4 Massa molecular.....	10
2.3 Aspectos nutricionais.....	12
2.3.1 Influência dos nutrientes sobre a produção de xantana.....	12
2.3.1.1 Fonte de carbono.....	13
2.3.1.2 Fonte de nitrogênio.....	13
2.3.1.3 Citrato e outros ácidos orgânicos.....	15
2.3.1.4 Micronutrientes.....	15
2.3.1.5 Fontes alternativas de carbono e nitrogênio.....	16
2.3.2 Influência dos nutrientes sobre a composição química da xantana.....	17
2.4 Extração da xantana	19
2.5 Produção de xantana em fermentadores.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Geral.....	22
3.2 Específicos.....	23

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Micro-organismo.....	23
4.2 Produção da Biomassa.....	24
4.3 Meios de Produção.....	24
4.3.1 Comparação entre os meios descritos por Souw e Demain e Garcia- Ochoa.....	24
4.3.2 Delineamento Experimental.....	25
4.3.2.1 Otimização dos nutrientes.....	25
4.3.2.2 Otimização do Extrato de Levedura, Sulfato de Amônio e Citrato..	27
4.3.3 Comparação entre o melhor meio da literatura e o meio proposto.....	28
4.4 Produção de xantana em fermentador.....	28
4.5 Análises físicas e químicas.....	30
4.5.1 Determinação de Biomassa.....	30
4.5.2 Extração do Biopolímero.....	30
4.5.3 Análise dos açúcares redutores totais.....	31
4.5.4 Viscosidades e pH.....	31
4.5.5 Determinação da viscosidade intrínseca e massa molecular.....	31
4.6 Determinação da composição química da xantana.....	32
4.6.1 Preparo das amostras para análises.....	33
4.6.2 Determinação de açúcares totais.....	33
4.6.3 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica (HPAEC).....	33
4.6.4 Determinação do teor de ácido urônico.....	34
4.6.5 Determinação do teor de ácido pirúvico.....	34
4.6.6 Determinação do teor de acetato.....	35
4.7 Análise da homogeneidade da goma por Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC).....	35
4.8 Forma de análise dos resultados.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1 Aspectos nutricionais de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	37
5.1.1 Comparação entre os meios descritos por Souw e Demain e Garcia Ochoa.....	37
5.1.2 Delineamento Experimental.....	41

5.1.2.1 Influência dos nutrientes na produção de xantana.....	41
5.1.2.2 Otimização de Extrato de Levedura, Sulfato de Amônio e Citrato.....	47
5.2 Comparação entre os resultados obtidos com a produção de xantana em fermentador e incubadora orbital.....	57
5.3 Influência da temperatura na produção de goma xantana em fermentador.....	60
5.4 Influência dos modos de extração e solubilização na qualidade da xantana.....	62
5.5 Composição química da xantana comercial e produzida em meios de produção diferentes.....	66
5.5.1 Quantificação de açúcar total e monossacarídeos neutros.....	67
5.5.2 Quantificação do ácido glicurônico e dos radicais piruvato e acetato.....	69
5.6 Análise da homogeneidade da xantana.....	72
5.7 Massa molecular da xantana comercial e produzida em diferentes meios de produção.....	74
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	77

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão (x 12000) da <i>Xanthomonas campestris</i>	3
Figura 2: Características morfológicas de <i>Xanthomonas campestris</i> com aspecto gomoso e amarelado em meio de cultivo com ágar.....	4
Figura 3: Via metabólica de síntese de xantana e metabolismo da glicose em <i>Xanthomonas campestris</i> NRRL-1459.....	5
Figura 4: Estrutura unitária (monômero) do polissacarídeo de goma xantana...8	
Figura 5: Conformação molecular da xantana.....	9
Figura 6: Esquema da produção comercial da goma xantana.....	21
Figura 7: Esquema do fermentador utilizado para produção da xantana por <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	28
Figura 8: Fermentador de 7 litros utilizado pra produção de xantana por <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	29
Figura 9: Rendimento celular obtido usando os meios SD e GO.....	38
Figura 10: Rendimento do biopolímero usando os meios SD e GO.....	39
Figura 11: Viscosidade do caldo de fermentação e da goma xantana (solução 1%) produzida nos meios de produção SD e GO.....	40
Figura 12: Valor do pH final do caldo de fermentação utilizando diferentes meios de produção.....	45

Figura 13: Rendimento celular obtido utilizando diferentes meios de produção.....	46
Figura 14: Rendimento do biopolímero nos diferentes meios de produção.....	47
Figura 15: Curvas de contorno para produção de goma xantana em função das concentrações de sulfato de amônio, extrato de levedura e citrato.....	50
Figura 16: Superfície de resposta para produção de goma xantana em função das concentrações de sulfato de amônio, extrato de levedura e citrato.....	51
Figura17: Curvas de contorno para viscosidade da goma xantana solubilizada a 1% em função das concentrações de sulfato de amônio, extrato de levedura e citrato.....	53
Figura 18: Superfície de resposta para viscosidade da goma xantana solubilizada a 1% em função das concentrações de sulfato de amônio, extrato de levedura e citrato.....	54
Figura 19: Aspecto das gomas obtidas nos diferentes meios de produção.....	56
Figura 20: Aspecto viscoso da goma xantana produzida em meio 1 por <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	57
Figura 21: Biomassa e goma formadas em fermentador usando o meio 1.....	59
Figura 22: Caldo de fermentação e goma sendo extraída com a adição de álcool.....	62
Figura 23: Influência da presença do formaldeído em diferentes concentrações no caldo de fermentação sobre a quantidade de xantana extraída.....	65

Figura 24: Influência do uso de formaldeído no processo de extração da xantana sobre a sua viscosidade.....	66
Figura 25: Goma xantana após diálise e liofilização.....	67
Figura 26: Análise dos monossacarídeos obtidos por hidrólise ácida da goma produzida nos meios M1, GO e goma comercial por HPAEC/PAD.....	68
Figura 27: Perfil de eluição para a xantana produzida nos meios M1e GO e xantana comercial (C) por HPSEC equipado com um detector de índice de refração diferencial.....	73
Figura 28: Viscosidade e massa molecular das gomas produzidas em meio GO e em meio proposto e da goma comercial	75

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Composição dos meios descritos por Garcia-Ochoa e colaboradores (1992) e Souw e Demain (1979).....	25
Tabela 2: Variáveis do primeiro planejamento experimental e seus valores reais e codificados.....	26
Tabela 3: Variáveis do segundo planejamento experimental e seus valores reais e codificados.....	27
Tabela 4: Comparação entre os valores médios obtidos utilizando os meios de produção SD e GO para produção de xantana por <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	37
Tabela 5: Valores reais e respostas do planejamento experimental	41
Tabela 6: Estimativa dos efeitos para produção e viscosidade da goma.....	42
Tabela 7: Fatores e respostas de planejamento experimental com 4 pontos centrais para produção de xantana por <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	48
Tabela 8: Estimativas dos coeficientes de regressão para a resposta produção de goma (Y_1).....	49
Tabela 9: Estimativas dos coeficientes de regressão para a resposta viscosidade da goma (Y_2).....	52
Tabela 10: Produção de xantana por <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> utilizando meio formulado M1 em fermentador e incubadora orbital.....	58
Tabela 11: Quantidade de biomassa obtida no decorrer da fermentação.....	60

Tabela 12: Goma xantana obtida no decorrer da fermentação.....	61
Tabela 13: Comparação entre os resultados obtidos para produção de xantana por <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> nas temperaturas 25 e 30 °C.....	61
Tabela 14: Quantidade e viscosidade de xantana extraída de diferentes formas e solubilizada em sais.....	64
Tabela 15: Valores médios do acetato e piruvato e viscosidade da goma comercial e produzida por <i>X. campestris pv. campestris</i> nos meios M1 e GO da goma comercial.....	71
Tabela 16: Valores médios das massas moleculares e viscosidade da xantana produzidas por <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> nos meios M1 e GO e da goma comercial.....	74

1. INTRODUÇÃO

Xantana é um polissacarídeo extracelular produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas* que apresenta grande importância em vários setores industriais por apresentar, entre outras propriedades, ação espessante e gelificante.

As características da xantana são dependentes da sua estrutura química e massa molecular que, por sua vez, dependem de vários outros fatores.

A estrutura normalmente apresentada pela xantana é composta por repetidas unidades pentassacarídicas de glicose, manose e ácido glicurônico (2:2:1). A cadeia principal é formada por unidades de 1,4-β-D-glicose e a cadeia lateral trissacarídica por unidades de β-D-manose-1,4-β-D-ácido glicurônico-1,2-α-D-manose. Pode apresentar os grupos acetil, presente como um éster, e ácido pirúvico condensado como um acetal com unidades de manose terminal. A massa molecular da xantana pode variar de 5×10^5 a $4,7 \times 10^7$ g/mol dependendo do micro-organismo produtor e das condições operacionais aplicadas durante a fermentação (CASAS et al. 2000; PAPAGIANNI, et al. 2001; NERY et al. 2008).

Alguns estudos têm mostrado a importância da massa molecular e composição química da xantana em suas características reológicas. Observa-se certo consenso na literatura entre massa molecular e viscosidade, sendo maior a viscosidade quanto maior a massa molecular. No entanto, o papel dos grupamentos químicos acetil e piruvil sobre a viscosidade da goma ainda não está claro. Há muita controvérsia entre os autores quanto a real relação entre esses substituintes e sua influência direta na qualidade do biopolímero.

Apesar da *Xanthomonas campestris* não ser um micro-organismo com grandes exigências nutricionais, sabe-se que a composição do meio de cultivo influencia nas características da goma produzida por esta bactéria e há meios com diferentes formulações descritos na literatura para esse fim. Dois meios bastante utilizados são os meios formulados por Souw e Demain (1979) e Garcia-Ochoa e colaboradores (1992).

A principal diferença entre esses meios está na concentração de açúcar e na fonte de nitrogênio. O primeiro meio proposto contém 4% sacarose e sulfato de amônio, enquanto o outro meio contém a metade de sacarose e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. A presença ou ausência de alguns sais também diferenciam esses meios. A fim de se compreender a influência do fator nutricional de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* na qualidade da xantana produzida por ela, os meios citados acima foram comparados e o melhor serviu de parâmetro para o desenvolvimento de novos meios.

Sabendo que o modo de produção influencia nos resultados obtidos e considerando a necessidade da ampliação de escala de projetos de pesquisa que apresentam aplicação industrial, foram realizadas fermentações em escala maior utilizando fermentador de 7 litros para compará-las às fermentações ocorridas em incubadora orbital.

Dessa forma, foi realizado um estudo cujo enfoque principal era o efeito dos nutrientes sobre a massa molecular, composição química e qualidade da xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Paralelamente a esse estudo, outros fatores, não menos importantes, também foram avaliados como: temperatura, produção em incubadora orbital ou fermentador e extração e solubilização da goma.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Xanthomonas campestris*

A goma xantana é um importante biopolímero sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Estas são bactérias (Figura 1) pertencentes à família Pseudomonadaceae, quimiorganotróficas, aeróbias, móveis, Gram-negativas, catalase-positiva, oxidase-negativas, formadoras de colônias amareladas e fitopatogênicas (BRADBURY, 1984).

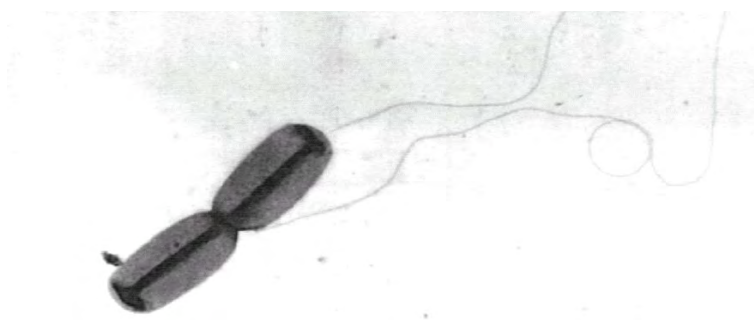


Figura 1. Micrografia eletrônica de transmissão (x12000) de *Xanthomonas campestris* (GARCIA-OCHOA et al. , 2000).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* causam grande prejuízo a agricultura por infectarem vários tipos de lavouras como cana-de-acúcar, tomate, algodão, berinjela, brócolis, couve-flor, maracujá, mostarda, pimenta, rabanete, repolho, alface entre outras.

Todos os organismos deste gênero são fitopatogênicos, com exceção de *Xanthomonas maltophilia*, patógeno oportunista de humanos (HOLT et al., 1993).

Esses micro-organismos são divididos em vários grupos, denominados patovares, conforme o tipo de planta que parasitam. Existem cerca de 141 patovares da espécie *Xanthomonas campestris* (VAUTERIN; SWING, 1997).

Xanthomonas campestris pv. *campestris* é um patógeno que infecta plantações de cana-de-açúcar, couve, brócolis, couve-flor e repolho pela parte aérea e se transloca até as raízes pelos vasos do xilema (SOUSA, 2003). Após a infecção, essas bactérias produzem o biopolímero e bloqueiam o fornecimento dos nutrientes à planta causando doença vascular, gomose, necrose e doenças parenquimatosas em folhas, ramos ou frutos (HAYWARD, 1993).

As *Xanthomonas* produzem um pigmento amarelo, insolúvel, denominado xantomonadina apresentando suas colônias usualmente amarelas, lisas e mucóides (Figura 2). O pigmento amarelo, que é quimicamente o aril-poliene brominado, pode variar de acordo com a espécie e o meio de cultivo utilizado e pode estar ausente indicando degradação da linhagem (GARCIA-OCHOA et al., 2000).



Figura 2. Características morfológicas de *Xanthomonas campestris* com aspecto gomoso e amarelado em meio de cultivo com ágar.

2.1.1 Metabolismo

O metabolismo de açúcares em *Xanthomonas campestris* ocorre por uma via central, na qual atuam enzimas da via Entner-Doudoroff. O transporte de glicose é feito por uma permease e a fosforilação, pela glicose quinase até formar glicose-6-fosfato. Nesta fase, o fluxo metabólico se divide em dois caminhos para produção de polímero via fosfoglucomutase e via desidrogenase de glicose-6-fosfato (Figura 3).

Na via catabólica, há produção equimolar de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato, os quais podem ser reciclados pela via glicogênica para produção de glicose-fosfato e o restante é oxidado pela glicólise (CHIA-HUA, MARTIN, 2003).

A biossíntese da goma xantana ocorre em condições de glicose residual alta e envolve a produção de KDPG via caminho das pentoses. Esta via, também denominada

via fosfogluconato, gera NADPH e uma síntese não oxidativa das pentoses (OLIVANETO et al., 2011).

Na via Entner-Doudoroff o gluconato é fosforilado para 6-fosfogluconato e estes são metabolizados. Nessa condição, há um rendimento diminuído de xantana, visto que este metabolismo não gera glicose-6-fosfato (LETISSE et al., 2001).

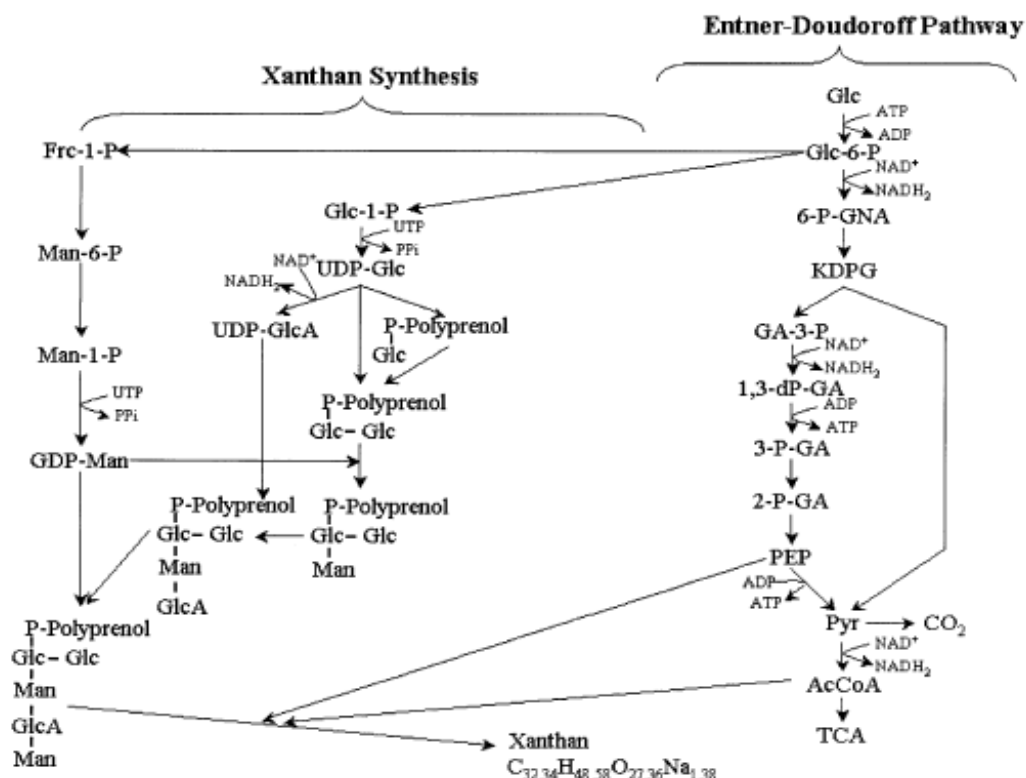


Figura 3: Via metabólica de síntese de xantana e metabolismo da glicose em *Xanthomonas campestris* NRRL-1459 (CHIA-HUA, MARTIN, 2003).

2.2 Goma Xantana

2.2.1 Importância Econômica

A xantana está conquistando cada vez mais o mercado e substituindo os polissacarídeos de origem vegetal e de algas marinhas por apresentar vantagens como ter lotes mais homogêneos e não ser suscetíveis às condições climáticas (MAUGERI, 2001).

Vários setores industriais, como indústria petrolífera, alimentícia, farmacêutica, de mineração, têxtil, termoquímica, de tintas, cosméticos e de produtos agropecuários, utilizam a goma xantana (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011).

Esse biopolímero é extensivamente utilizado por apresentar inúmeras aplicações como: agente de suspensão, espessante, emulsificante, floculante, formador de filmes, lubrificante e redutor de fricção (SUTHERLAND; KENNEDY 1996). São encontrados em produtos como tintas, pigmentos e corante, explosivos, formulações de pesticidas, abrasivos, polidores, cerâmicas, detergentes (PSOMAS et al., 2007).

De toda xantana produzida no mundo, 65% é utilizado na indústria de alimentos, 15% na indústria de petróleo e 20% em aplicações diversas. A demanda vem aumentando e estima-se um crescimento anual de 5-10%. Na indústria alimentícia essa goma é bastante apreciada e utilizada em produtos da linha *light* por não acrescentar valor calórico aos alimentos. A indústria petrolífera utiliza goma xantana para lubrificação das brocas de perfuração e recuperação secundária do petróleo. (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Devido à imensa aplicabilidade comercial da xantana, o processo para sua produção tem sido muito estudado. No processo original, a xantana era sintetizada em uma fermentação de 96 horas, recuperada e purificada pela precipitação do caldo de fermentação com um solvente miscível em água. (MORAINE; ROGOVIN, 1971). Atualmente, os estudos visam melhorar o processo e diminuir o custo da produção, pois o consumo do produto é menor que o desejável devido ao seu preço ainda elevado, em média US\$ 5,5/Kg (CARIGNATTO et al., 2011).

2.2.2 Estrutura

A xantana é um polímero constituído por unidades pentassacarídicas que apresenta uma cadeia principal com unidades D-glicose e cadeias laterais trissacarídicas contendo ácido glicurônico entre duas unidades de manose (Figura 4).

Em sua estrutura pode ocorrer também a presença de radicais acetil e piruvil, sendo que o primeiro está presente como um éster na posição 6 da manose não

terminal e o segundo condensado como um acetal nas posições 4 e 6 na manose terminal.

A molécula de xantana apresenta uma regularidade quanto à presença de ramificações em uma glicose a cada duas, no entanto, nem todas as cadeias laterais são acetiladas ou piruvatadas, o grau de acetilação e piruvatação depende da cepa utilizada e das condições de cultivo (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Kang e Pettit (1993) obteve goma contendo cerca de 4,7% de grupos O-acetil e 3,0 a 3,5% de resíduos de ácido pirúvico.

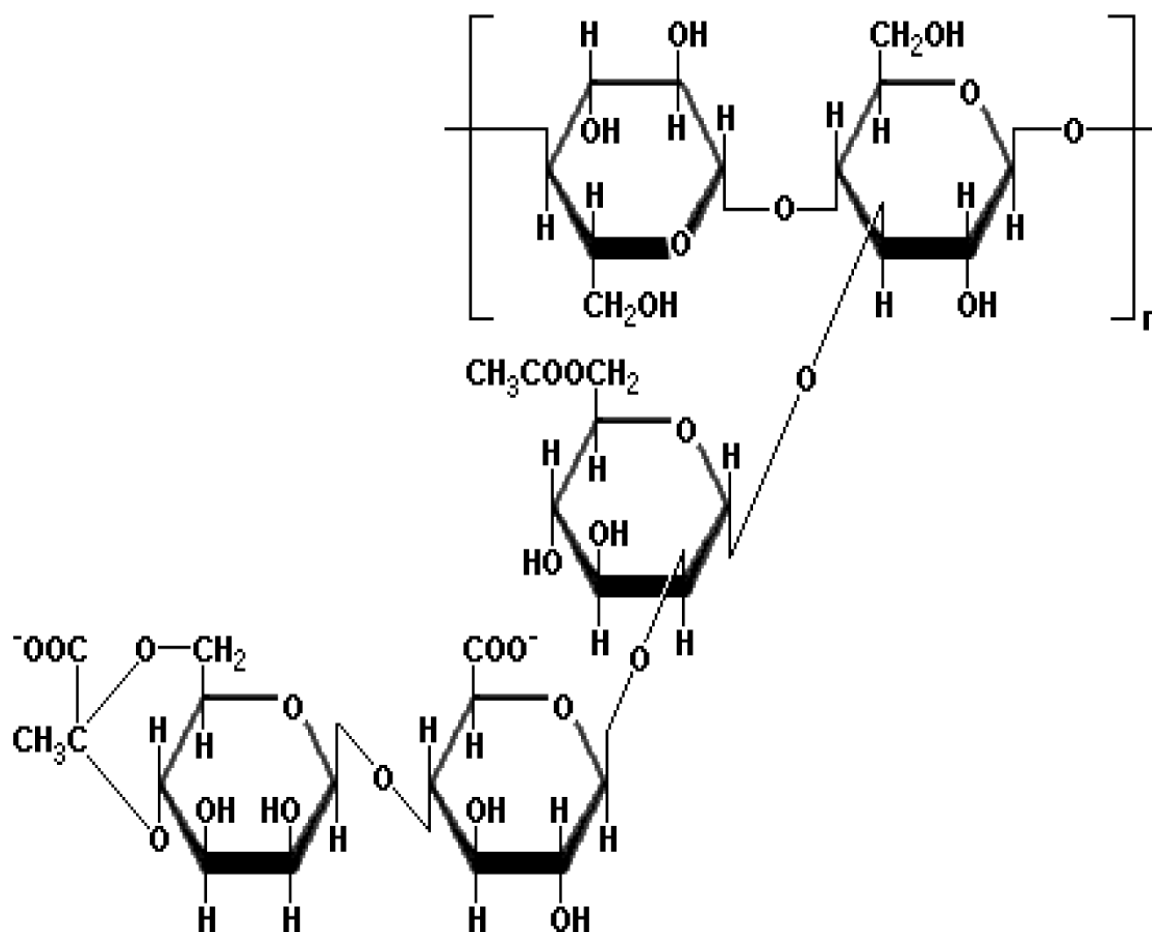


Figura 4. Estrutura unitária (monômero) do polissacarídeo de goma xantana (NERY et al., 2008).

Os radicais acetil e piruvil conferem carga aniônica ao exopolissacarídeo podendo alterar as suas propriedades físicas e influenciar na transição entre estabilização ou desestabilização da conformação ordenada (SUTHERLAND, 1997).

O primeiro estudo que indicou a conformação molecular da xantana (Figura 5) foi realizado através de difração de raio-X e modelagem molecular (MOORHOUSE et al.,1977).

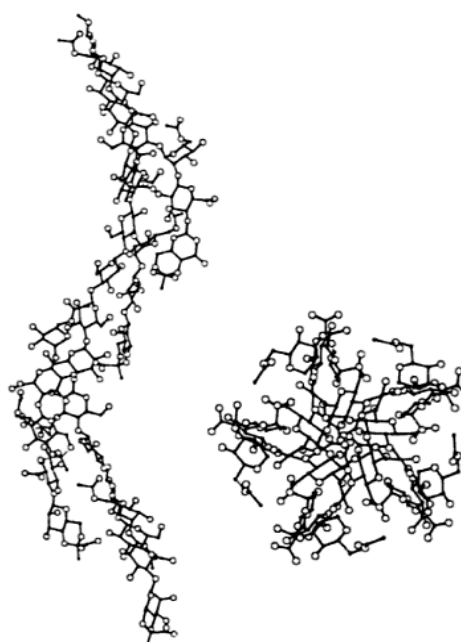


Figura 5: Conformação molecular da xantana (MOORHOUSE et al.,1977).

Segundo Morris (1977), a estrutura da xantana é estabilizada com o aumento da força iônica que possibilita uma melhor disposição das cadeias laterais ao longo das cadeias principais.

As pontes de hidrogênio formadas entre as cadeias laterais conferem estabilidade intramolecular e são as responsáveis pela viscosidade da goma mesmo a altas temperaturas e força iônica (MILAS; RINAUDO, 1979; PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011)

A cadeia lateral trissacarídica alinha-se com a cadeia celulósica principal, estabilizando a conformação por interações não covalentes (SUTHERLAND, 1998).

Os radicais acetil e piruvil são os responsáveis pela estabilização da estrutura da goma, mas o piruvil exerce uma influência maior (TAKO, 1992).

2.2.3 Biossíntese

A formação do biopolímero xantana pode ser dividida em três etapas, segundo Palaniraj e Jayaraman (2011):

1. Captura de açúcares simples e conversão a derivados uridil: os monossacarídeos são ativados e denominados açúcares nucleotídeos, GDP-manose, UDP-glicose e UDP-ácido glicurônico.

2. Formação das subunidades de pentassacarídeo e carregamento de isopentilpirofosfato: os açúcares nucleotídeos doam seus resíduos de açúcares para o acceptor lipídico isoprenilfosfato C-55 para formar uma unidade de pentassacarídeo-P-P-lipídeo.

3. Polimerização e excreção: as unidades de pentassacarídeos são polimerizadas, em uma seqüência correta garantida pelos carregadores fosfato-álcool-isoprenóides e lipídeos-isoprenóides. Nesse último estágio da síntese são introduzidos os grupos acetil e piruvil e a goma é excretada para o meio extracelular.

A síntese de xantana requer cofatores, nicotinamida e ATP e está relacionada com via caminho das pentoses. Esta via também chamada via fosfogluconato é um processo que gera NADPH e uma síntese não oxidativa das pentoses. Este caminho é alternativo à glicólise, e tem função preferencialmente de biossíntese (LETISSE et al. 2001; OLIVA-NETO et al, 2011).

2.2.4 Massa molecular

A massa molecular da xantana pode variar de 5×10^5 a $4,7 \times 10^7$ g/mol. Essa variação pode ocorrer devido ao micro-organismo produtor e as condições operacionais utilizadas durante a fermentação, como tempo, temperatura, oxigênio e nutrientes disponíveis.

Dependendo do patovar de *Xanthomonas campestris*, gomas de diferentes massas moleculares são produzidas (SHATWELL et al., 1990).

Durante o processo de fermentação em batelada, gomas com diferentes massas moleculares são produzidas e valores máximos são obtidos na fase de crescimento (SUH et al., 1992; FLORES CANDIA; DECKWER, 1999). Segundo Casas e colaboradores (2000), o tempo de fermentação além de interferir na massa molecular da xantana, também influencia no seu grau de acetilação e piruvitação, sendo que ambos aumentam com o tempo.

Alguns autores estudaram a influência da temperatura na massa molecular da xantana. Temperaturas menores parecem favorecer a formação de gomas com maior massa molecular. Segundo Pace (1987), são obtidas gomas com massas moleculares maiores em temperatura de 30°C do que a 35°C. Casas e colaboradores (2000) também obteve moléculas de xantana produzida por *Xanthomonas campestris pv. campestris* (NRRL B-1459) com a média mais alta de massa molecular a 25°C, menor temperatura testada.

A quantidade de oxigênio dissolvida no caldo de fermentação também é um fator que deve ser considerado, pois estudos indicam que o aumento da massa molecular ocorre quando não há limitação desse gás (PETERS et al., 1989 e FLORES et al., 1994).

Flores Candia e Deckwer (1999) observaram o efeito do NH_4Cl sobre a massa molecular e verificaram que este nutriente, quando utilizado em altas concentrações, a diminui. O valor máximo e mínimo de massa molecular obtido por esses autores foi de 7×10^6 e 6×10^6 g/mol utilizando 1 e 8,6 g/L de NH_4Cl , respectivamente. Casas e colaboradores (2000) também estudou a concentração inicial de nitrogênio utilizado no meio de cultivo de *Xanthomonas campestris*. Entretanto, não observou nenhum efeito claro dessa variável sobre a massa molecular da xantana.

Juntamente com a estrutura e composição química, a massa molecular determina as propriedades reológicas do biopolímero (PAPAGIANNI et al., 2001). A relação massa molecular e viscosidade tem sido relatada, sendo maior a última quanto maior a primeira (FLORES CANDIA; DECKWER, 1999; CASAS et al., 2000).

A mensuração da massa molecular pode ser feita por cromatografia de exclusão por tamanho, espalhamento de luz e viscosidade intrínseca (SUTHERLAND,1992; CASAS et al., 2000; PAPAGIANNI et al., 2001).

Segundo Kiosseoglou et al. (2003) a goma xantana com massa molecular média, como a obtida em laboratório, resulta em géis mais aceitos pelos consumidores comparados àqueles preparados com a goma xantana comercial, pois apresentam baixa elasticidade, coesividade e mastigabilidade.

2.3 Aspectos nutricionais

2.3.1 Influência dos nutrientes sobre a produção de xantana

A produção industrial da 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 micro-organismo, íons fosfato e magnésio e alguns elementos traços (MAUGERI, 2001; PAPAGIANNI et al., 2001). Os gastos com meios de cultivo correspondem cerca de 20 a 30% do total gasto no processo de produção de xantana (BORN et al., 2002).

O crescimento de micro-organismos ocorre tanto em meios definidos como em meios complexos. Enquanto meios definidos apresentam quantidade dos nutrientes específicas e conhecidas, meios complexos possuem composição variável dependentes do lote e fornecedor. Estes podem conter extrato de levedura, de carne ou de planta como fonte protéica (SCHMIDELL, 2001; TORTORA et al., 2004).

Alguns estudos têm sido relatados sobre a influência da composição do meio sobre a xantana produzida por *Xanthomonas campestris*.

No início da descoberta desse biopolímero, foi observado que as espécies de *Xanthomonas* podiam crescer em meio contendo apenas 0,5% de glicose; 0,1% de NH_4Cl ; 0,2% de KH_2PO_4 e 0,02% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (STARR,1946).

Rogovin e colaboradores (1961) relataram a formação de goma xantana por *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459, utilizando meio contendo 2% de glicose, 0,02% de nitrogênio e 0,2% de fosfato de potássio.

2.3.1.1 Fonte de carbono

A concentração de açúcar é um fator que influencia no rendimento de xantana e as principais fontes de carbono utilizadas são glicose e sacarose. Concentrações de 2 a 4% são as mais utilizadas (SOUW e DEMAIN, 1980; DE VUYST et al., 1987; FUNAHASHI et al., 1987).

Smiley (1966) e Moraine e Rogovin (1966), observaram que devido à alta viscosidade desenvolvida no fluido da cultura, somente 3 a 5% de glicose poderiam ser usados no meio de fermentação para alcançar maior rendimento e eficiência. Na maioria das fermentações, o crescimento microbiano parava quando a viscosidade do meio alcançava cerca de 2000cP (Brookfield LVT, 28°C, 30rpm).

Cruz (1983), estudando alguns fatores envolvidos na produção de goma xantana por uma linhagem de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*, concluiu que a sacarose a 4% foi a melhor fonte de carbono.

Tait e colaboradores (1986) constataram que a produção de xantana é maior em meio que contém relações mais altas entre carbono e nitrogênio. O rendimento do polissacarídeo foi maior (6,7g l⁻¹) em culturas na qual a amônia foi exaurida e menor (3,0 g l⁻¹) sob esgotamento de carbono.

Salah e colaboradores (2010) verificaram um aumento do rendimento da goma proporcional ao aumento da fonte de carbono de 40 para 80g/L. Esses autores determinaram o consumo de glicose ao longo da fermentação que foi de 49% para 77% após 24 horas, de 55% para 97% após 48 horas e de 59% para 98% após 72h horas.

2.3.1.2 Fonte de nitrogênio

Silman e Rogovin (1970) produziram goma xantana usando a bactéria *X. campestris* NRRL-B-1459 em fermentações contínuas em meio contendo glicose, uréia, sais minerais e resíduos solúveis de destilarias, por um período de 20 dias sem

reciclagem de nutrientes. Determinou-se nesse estudo que o componente limitante para o crescimento celular da bactéria foi o nitrogênio. A produção de xantana ocorreu com um rendimento de 68% em relação à glicose consumida.

Moraine e Rogovin (1973) estudaram o efeito de fontes de nitrogênio no crescimento celular e na produção do polissacarídeo e concluíram que a biomassa aumenta com o aumento da concentração da fonte de nitrogênio, porém, é inibida na medida em que a quantidade de xantana aumenta.

Cadmus et al. (1976) estudaram um meio contendo 0,01% de $MgSO_4$; 0,1% de fosfato de diamônio e 2,6% de glicose utilizando *X. campestris* NRRL-B-1459 como inóculo. Nesse trabalho concluíram que baixos teores de nitrogênio (0,1%) favorecem a formação de goma xantana com baixo teor de piruvil. Com o aumento dos níveis de nitrogênio (0,15%) e adição concomitante de K_2HPO_4 , a formação de goma com alto teor de piruvil foi favorecida. Ambos os processos deram rendimentos de 50 a 60% de goma xantana.

Cadmus et al. (1978) relataram que fonte inorgânica de nitrogênio (fosfato de amônio) proporciona goma com melhor viscosidade e maior teor de piruvil (acima de 4%).

Kennedy et al. (1982) estudando fontes de nitrogênio verificaram que concentrações mais altas resultavam em maior rendimento e reduzido tempo de fermentação, mas o produto obtido era menos viscoso.

Segundo Cruz (1983), a limitação de nitrogênio favorece a produção de goma e quantidades acima de 25mM/L de fosfato inorgânico no caldo de fermentação causam uma diminuição da goma produzida.

Garcia-Ochoa et al. (1992) estudaram a influência da composição do meio na produção de goma xantana e verificaram que nitrogênio e fósforo em altas concentrações inibem tanto o crescimento de *X. campestris* como a produção de xantana.

Gupte e Kamat (1997) avaliaram a influência de diferentes fontes nitrogênio - ausência, extrato de levedura, peptona, uréia, água de maceração de milho, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 e extrato de levedura + peptona - na produção e viscosidade da xantana produzida por *Xanthomonas campestris* ICa-125. Maior quantidade de goma (7,2 /L) foi obtida quando utilizaram o extrato de levedura (3g/L) e a peptona (5g/L) juntos como fonte de nitrogênio.

2.3.1.3 Citrato e outros ácidos orgânicos

Souw e Demain (1979) estudaram o efeito da concentração do citrato na produção de xantana por *X. campestris* NRRL-B-1459 e concluíram que este componente, nas concentrações de 4,7 a 9,4 mmol/L estimula a produção da goma quando o pH não é controlado. Estudaram também outros ácidos orgânicos e a maior produção de xantana foi observada em meio contendo 0,3 a 1% (m/v) de piruvato, 0,6% (m/v) de alfa-cetoglutarato, e 0,5 a 1% (m/v) de succinato. Concentrações maiores desses ácidos inibiram a produção de xantana e reduziram ligeiramente o crescimento celular.

Segundo Jana e Ghosh (1999), o ácido cítrico (2,6g/L) melhora a viabilidade celular e o rendimento do biopolímero quando há limitação de oxigênio.

De acordo com Borowski et al. (2006) a influência do ácido cítrico na produção da goma depende da cepa e a presença do ácido influencia negativamente os resultados de viscosidade.

O ácido cítrico pode ser usado como um agente seqüestrante para prevenir a precipitação de sais durante a esterilização (PETERS et al., 1993).

Cruz (1983), observou que a adição de ácidos orgânicos no meio de produção estimula a síntese de xantana. A adição de 0,25% de ácido succínico contribuiu também para o aumento da viscosidade do caldo fermentado.

2.3.1.4 Micronutrientes

Tait et al. (1986) constataram que os nutrientes enxofre, magnésio, fósforo e ferro influenciam na produção e rendimento da goma xantana.

Segundo Pielken et al. (1987), a adição de metionina no meio de fermentação reduz em cerca de 40% a produção de goma xantana por *X. campestris* e a adição do aminoácido lisina aumenta a produção de xantana em 25%.

Garcia-Ochoa et al. (1992) observaram a influência positiva do magnésio sobre o crescimento da bactéria e negativa do enxofre na produção da xantana quando utilizados em altas concentrações. Os melhores resultados, tanto para o crescimento de *Xanthomonas campestris* como para a produção de goma xantana, foram obtidos utilizando o meio contendo: 2,1g de ácido cítrico; 1,44g de NH_4NO_3 ; 2,866g de K_2HPO_4 ; 0,507g de MgCl_2 ; 0,089g de Na_2SO_4 ; 0,006g de H_3BO_3 ; 0,006g de ZnO ; 0,0024g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,02g CaCO_3 ; 0,13mL de HCl e 1000mL de água destilada.

Segundo Letisse et al. (2002) a limitação de fosfato exerce um efeito positivo no rendimento de goma xantana.

2.3.1.5 Fontes alternativas de carbono e nitrogênio

Apesar das principais fontes de carbono utilizadas no processo de formação de xantana serem glicose e sacarose, há estudos de outras fontes. A produção de xantana pela espécie *X. campestris pv. ocumo* ocorreu em fontes de carbono não convencionais, sendo a maior produção (23g/L) e viscosidade (7000cP) do biopolímero verificada na presença de xarope de glicose (FAVEPRO). Esta linhagem foi capaz também de sintetizar a goma (10g/L) e aumentar a viscosidade (até 1500 cP) em um meio baseado em extrato ácido de casca de mandioca (AZUAJE ; SÁNCHEZ, 1999).

Há ainda trabalhos que utilizam fontes alternativas de carbono e nitrogênio a partir de resíduos agroindustriais como soro de leite (ANTUNES et al., 2000; NITSCHKE et al., 2001), resíduos cítricos (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007), resíduos de polpa de beterraba (YOO; HARCUM, 1999), de azeitona (LOPEZ et al. 2001) e melado (KALOGIANNIS, 2003).

Nitschke et al. (2001) utilizaram meio de cultura a base de soro de leite para obter xantana a partir de *Xanthomonas campestris C7L* e obtiveram um rendimento de 55% e viscosidade da goma, solubilizada a 1%, de 180000cP (spindle n.3). Observaram que no início do processo, o uso do soro integral (0,35% proteína) favoreceu o

crescimento celular e a adição de soro filtrado contendo menor concentração de proteínas (0,18%) favoreceu o acúmulo de xantana na segunda fase.

Antunes et al. (2000) também utilizaram meios à base de soro de leite. Testaram três meios diferentes denominados MPA, MPB e MPC que apresentavam a seguinte composição: MPA) 900mL de soro de leite.L⁻¹; 100mL de solução de sacarose contendo 50g. L⁻¹;MPB) 900mL de soro de leite. L⁻¹; 100mL de solução de sacarose contendo 50g. L⁻¹; 0,2g de MgSO₄.7H₂O. L⁻¹; 6g de farelo de arroz. L⁻¹e MPC) 900mL de soro de leite. L⁻¹; 100mL de solução de sacarose contendo 50g. L⁻¹; 0,2g de MgSO₄.7H₂O. L⁻¹; 6g de farelo de trigo. L⁻¹. O valor máximo de viscosidade da xantana a 1% foi de 1275 cP a 6rpm utilizando o meio MPA.

López et al. (2001) avaliaram o resíduo da azeitona como nutriente para quatro diferentes linhagens de *X. campestris* (B-1459, B-1459 S4LII, T646 e 1706) e verificaram que apenas as linhagens T646 e B-1459 S4LII foram capazes de crescer em meio contendo apenas esse nutriente. A maior produção de xantana (50 a 60%) foi alcançada com a linhagem B-1459 S4LII, a qual provavelmente tinha maior tolerância aos componentes fenólicos presente nesse tipo de resíduo.

Druzian e Pagiarini (2007) utilizaram o resíduo do suco de maçã Fuji como fonte alternativa de carbono e em meio contendo 0,05% uréia, 0,5% de KH₂PO₄ e 70% de resíduo obtiveram um rendimento de 45g/L, 10 vezes maior do que o obtido com 15% de sacarose no meio.

Yoo e Harcum (1999) testaram meios contendo apenas sacarose como fonte de carbono e meios adicionados de resíduo de polpa de beterraba e obtiveram maior rendimento (77%) e produção (5,95 g/L) quando este resíduo estava presente.

Kalogiannis et al. (2003) obtiveram produção máxima de xantana (53g/L) utilizando 175 g/L de melado e 4g/L de KH₂PO₄ após 24 horas de fermentação

2.3.2 Influência dos nutrientes na composição química da xantana.

A xantana, por ser um polissacarídeo ramificado, possui uma interação intermolecular, influenciada pela presença ou não dos grupos acetil e piruvil, fundamental para as suas propriedades reológicas. A quantidade desses grupos podem

variar com as condições operacionais (PETERS et al. 1993), com a linhagem *Xanthomonas sp.* utilizada (KENNEDY; BRADSHAW, 1984; TAIT et al., 1986) e ainda com os nutrientes que compõem o meio de cultivo. Alterações do meio de cultivo nas diferentes fases de crescimento do micro-organismo afetam a estrutura química e a massa molecular da xantana sintetizadas, ocasionando uma mistura de cadeias poliméricas de diferentes naturezas produzidas em diferentes fases do processo (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Por essas razões, pesquisas têm sido realizadas para se entender a relação entre a concentração desses radicais presentes na xantana e o tipo, excesso ou falta de alguns nutrientes como o carbono, nitrogênio, citrato e micronutrientes no meio de cultura (CADMUS et al.,1978; DAVIDSON,1978; KENNEDY et al.,1982; TAIT et al.,1986; QADEER; BAIG, 1989; FLORES CANDIA; DECKWER, 1999; CASAS et al., 2000).

Segundo Davidson (1978) obtém-se alto teor de piruvato (8,5%) na presença de magnésio e fósforo e limitação de enxofre. Quando os nutrientes magnésio ou fósforo foram limitantes no cultivo, a porcentagem de piruvato foi aproximadamente de 1%. Evans et al. (1979) também observaram que a limitação de enxofre em cultivo contínuo proporcionou maiores porcentagens de piruvil na molécula.

Em relação ao nitrogênio, alguns autores relataram um aumento de piruvato quando a concentração de nitrogênio também é aumentada (KENNEDY et al.,1982;TAIT et al.,1986). Já em outros trabalhos, o oposto foi observado (FLORES CANDIA; DECKWER, 1999; CASAS et al., 2000).

Segundo Casas et al. (2000) o aumento da concentração de NH_4NO_3 provocou redução da viscosidade da goma, aumento da proporção de acetil e diminuição na proporção de piruvil.

Flores Candia e Deckwer (1999) obtiveram maior taxa de piruvato (7,2%) quando utilizaram menor concentração de fonte de nitrogênio (0,6% NH_4Cl). Para Trilsbach et al. (1984) não há nenhuma relação entre o grau de piruvilação e a composição do meio. Portanto, não se observa na literatura um consenso e uma relação direta entre as concentrações de nitrogênio e piruvato.

Também há controvérsias quanto ao tipo de fonte de nitrogênio. Alguns autores têm reportado que um grau maior de piruvilação ocorre quando a fonte de nitrogênio é orgânica (KENNEDY et al,1982; QADEER; BAIG, 1989), mas Cadmus et al. (1978) indicaram $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ como a melhor fonte de nitrogênio para o aumento do conteúdo de piruvato.

Tait et al. (1986) observaram que o biopolímero isolado do meio no qual a amônia havia sido exaurida continha menos piruvil (2.2%) e mais acetil (4.4%).

Os conteúdos de piruvil e acetil da xantana são afetados também pela fonte de carbono e disponibilidade de oxigênio e citrato na cultura em batelada (CADMUS et al. ,1978; JANA; GHOSH,1999). Segundo Jana e Ghosh (1999), o ácido cítrico é um nutriente que aumenta o conteúdo de ácido pirúvico na molécula de xantana.

2.4 Extração da xantana

A extração da xantana após a eliminação das células do caldo de fermentação é realizada por diminuição da solubilidade do biopolímero e pode ser feita de diversas maneiras.

Métodos como adição de sais e solventes miscíveis em água e ainda solventes orgânicos, tais como a acetona o etanol e o isopropanol ou ainda misturas de álcool e sais são citados na literatura (GIAVASIS et al., 2000; BOZA et al., 2004; VIEIRA, 2008).

Um método mais econômico que vem sendo utilizado é a ultrafiltração do caldo fermentativo (LO et al. 1997, ROSALAM; ENGLAND, 2006).

O polissacarídeo pode também passar por tratamentos físico, químico ou biológico durante a 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, 2001).

A quantidade de solvente necessário para a completa precipitação depende da força iônica e da composição do polímero. A recuperação na presença de solventes

polares pode ser intensificada pela adição de eletrólitos, os quais reduzem o volume de álcool utilizado na recuperação do biopolímero. Segundo García-Ochoa et al. (2000), a quantidade de álcool necessária para precipitar o polímero é reduzida pela metade quando 1g/L de cloreto de sódio é empregado.

As soluções de xantana apresentam boa compatibilidade com sais e de acordo com alguns trabalhos podem ter a viscosidade favorecida na presença deles.

Segundo DIAZ et al. (2004), com a adição de cloreto de potássio em soluções de xantana, a viscosidade aparente desta torna-se maior.

Medeiros et al. (2000) verificaram que a adição de NaCl a 1% reduz a quantidade de etanol necessária para a recuperação e obtiveram um biopolímero com um valor de viscosidade aparente superior ao recuperado somente com etanol. Já Borges et al. (2001) estudando adição de sais (NaCl, KCl, CaCl₂ 1 e 2%) na separação de xantana observaram que os sais NaCl e KCl diminuem o volume total de etanol necessário, no entanto, não influenciam na qualidade da goma.

O sal afeta a estrutura primária da xantana, por aumentar o número de cátions ligados aos grupos ionizados da molécula, ocasionando mudança da carga e subsequente precipitação. Altas concentrações de sal podem resultar em alterações na conformação da xantana, formando fitas flexíveis (VIEIRA, 2008).

2.5 Produção de xantana em fermentadores

A produção de xantana em escala industrial ocorre em fermentadores e segue as etapas demonstradas na Figura 6:

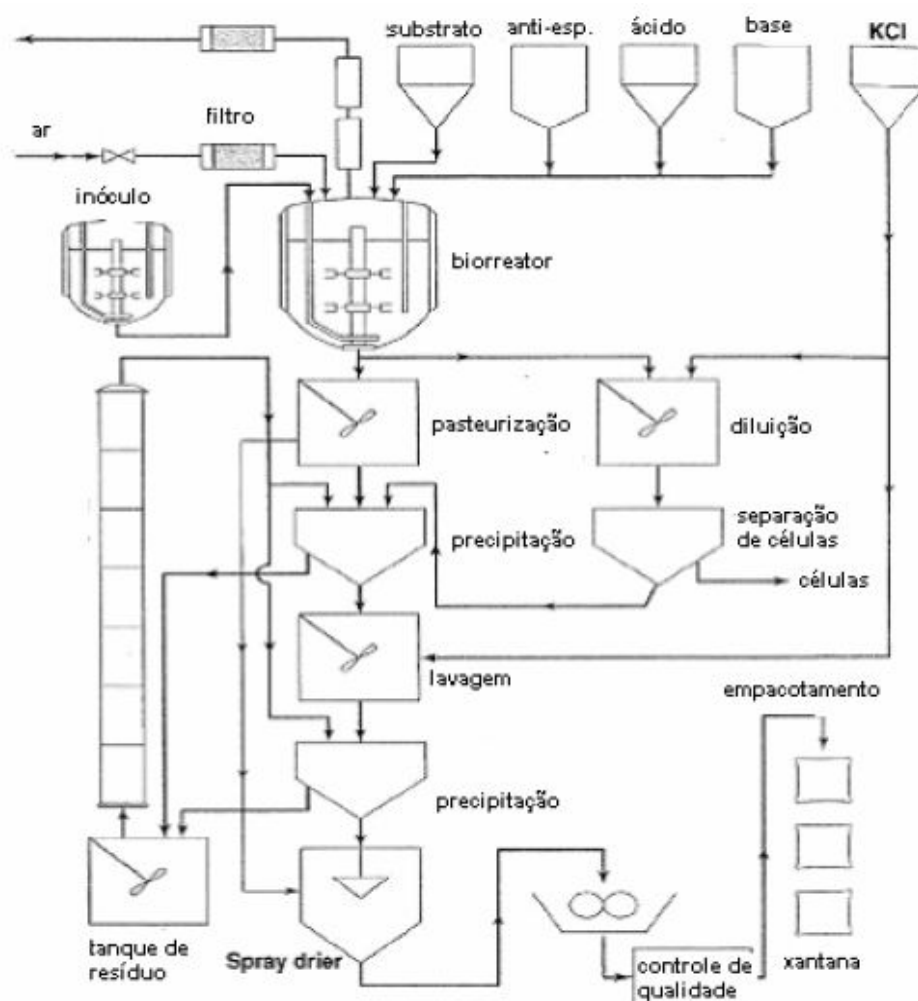


Figura 6: Esquema de produção comercial da goma xantana (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

Para obtenção de bons resultados na produção de xantana em fermentadores os fatores agitação e aeração são de grande relevância para que a transferência de oxigênio seja eficiente, visto que a bactéria *Xanthomonas campestris* é estritamente aeróbica.

A aplicação de uma agitação vigorosa em fermentadores é necessária para manter altas velocidades de crescimento celular juntamente com uma alta concentração de xantana no caldo de fermentação. Aeração e agitação adequadas devem ser aplicadas para se conseguir alta produtividade evitando limitação de oxigênio e a existência de zonas estagnadas (FLORES CANDIA; DECKWER, 1999).

Casas et al. (2000) utilizando fermentador com volume de trabalho de 1,5 L observaram que com o aumento da velocidade de agitação há um aumento na taxa de transferência de massa de oxigênio, mas as células são danificadas. Em velocidades de 800 rpm o crescimento celular e a produção de goma xantana são mais baixos, provavelmente devido a esse dano celular por “stress” hidrodinâmico. Já em velocidades de 100 rpm se observou crescimento celular e produção de goma menores, devido à limitação na transferência de oxigênio. Os melhores resultados foram obtidos quando a agitação foi fixada em 500 rpm.

Também deve ser utilizado um volume adequado de inóculo para a produção de goma xantana no fermentador. Segundo García-Ochoa et al. (2000), a concentração deve ser de 5% a 10% do volume total de caldo fermentado.

O tipo de fermentador e o modo de operação, batelada ou contínuo, também interferem no bioprocesso. O fermentador mais citado na literatura é o de mistura, mas há trabalhos que utilizam fermentadores de coluna de bolha, *air-lift* ou ainda o *plugging jet* (García-Ochoa et al., 2000).

Varela (2008) utilizou fermentador estático para produção de xantana em cultivo semi-sólido e as melhores condições para o cultivo foram na temperatura de 31,2 °C e aeração de 467,5 L/min.

Considerando o exposto, pode-se perceber que estudos têm sido realizados abordando vários aspectos envolvidos na produção de goma xantana. No entanto, há muitas controvérsias sobre a real influência dos grupamentos químicos na viscosidade desse biopolímero e pouco se sabe sobre a influência dos nutrientes nesse parâmetro.

Assim, torna-se interessante um estudo que relacione aspectos nutricionais de *Xanthomonas campestris pv. campestris* com a quantidade, qualidade e composição química da goma xantana produzida por esta bactéria, além de outras variáveis envolvidas na produção de xantana.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo principal estudar a influência da composição do meio de produção sobre a qualidade e composição química da goma produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Além dos aspectos nutricionais, foram estudados também os fatores temperatura, modo de produção e precipitação do biopolímero.

3.2 Específicos

-Comparar os meios para produção de xantana citados por Souw e Demain (1979) e Garcia-Ochoa e col. (1992).

-Formular um meio para produção de xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* que alcance resultados superiores àqueles obtidos pelo meio citado por Garcia-Ochoa e col. (1992).

-Avaliar a influência dos nutrientes: extrato de levedura, sulfato de amônio, citrato e lecitina de soja sobre a viscosidade e quantidade de goma produzida.

-Avaliar a composição química da xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* utilizando meios de produção diferentes e compará-la à composição da goma comercial.

-Comparar a produção de xantana em incubadora orbital e fermentador em relação ao rendimento e viscosidade.

-Determinar a melhor temperatura para produção de xantana em fermentador utilizando o meio citado na literatura por Garcia-Ochoa e col. (1992)

-Avaliar alguns métodos de extração da xantana.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

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

4.1 Micro-organismo

A linhagem utilizada foi a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* FCLA 26, da coleção de cultura da Faculdade da Ciências e Letras de Assis – UNESP, e o seu cultivo ocorreu em meio formulado (SILVA, 2007; CARIGNATTO et al., 2011).

4.2 Produção da Biomassa

Para o crescimento da biomassa de *Xanthomonas campestris* foi utilizado um inóculo estoque, devidamente descongelado e inoculado, em condições assépticas, em uma placa contendo meio de cultivo citado no item 4.1 acrescido de ágar e colocada em estufa de cultura (Fanem-modelo 002 CB) a 27° C por 24-48 horas. Em seguida, foi inoculada uma quantidade de 10^7 células/mL, mensuradas por microscopia em câmara de Neubauer, para frascos Erlenmeyer contendo 75 mL do mesmo meio de cultivo, porém sem ágar, e incubados em incubadora orbital com controle de temperatura (Tecnal-modelo TE-421) a 27° C e 160 rpm, por 24 horas.

4.3 Meios de Produção

4.3.1 Comparação entre os meios descritos por Souw e Demain e Garcia-Ochoa

Foram comparados os meios citados por Souw e Demain (1979) e Garcia-Ochoa e colaboradores (1992), os quais foram denominados neste trabalho como SD e GO, respectivamente. Para formulação desses meios foram utilizados reagentes da marca Vetec (Tabela 1). Os meios foram testados em sextuplicatas e a fermentação ocorreu em incubador orbital com controle de temperatura (Tecnal-modelo TE-421) por 72 horas a 30° C e 160 rpm. O pH foi ajustado a 7,0 com solução de hidróxido de sódio 1M antes da esterilização a 121°C durante 15 minutos em autoclave.

Tabela 1: Composição dos meios descritos por Garcia-Ochoa et al. (GO) e Souw e Demain (SD).

Componentes*	Garcia-Ochoa et al. (1992)	Souw e Demain (1979)
Sacarose	2,0%	4,0%
KH ₂ PO ₄	0,286%	0,5%
MgSO ₄ 7H ₂ O		0,02%
MgCl ₂	0,0507%	
(NH ₄) ₂ SO ₄		0,2%
NH ₄ NO ₃	0,114%	
Citrato	0,21	0,2%
H ₃ BO ₃	0,0006%	0,0006%
ZnO	0,0006%	0,0006%
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,00024%	0,00024%
CaCO ₃	0,002%	0,002%
Na ₂ SO ₄	0,0089%	

* os sais citados foram produzidos pela empresa Labsynth.

4.3.2 Delineamento Experimental

Foi utilizada a técnica de Metodologia de Superfície de Resposta (RODRIGUES; IEMMA, 2009) para verificar a influência de diferentes nutrientes na qualidade e quantidade de goma produzida por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em agitador orbital com controle de temperatura a 30 °C e 160 rpm.

4.3.2.1 Otimização dos nutrientes

Empregou-se um planejamento fatorial incompleto 2⁽⁴⁻¹⁾, com duas repetições no ponto central, totalizando 10 meios, para avaliar o efeito dos nutrientes citrato, extrato de levedura, lecitina de soja e sulfato de amônio na produção de biomassa, goma

xantana, viscosidades aparente da solução de goma xantana 1% e do caldo fermentado.

As variáveis codificadas e não codificadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Variáveis do primeiro planejamento experimental e seus valores reais e codificados

Meio	Fatores							
	Codificados				Decodificados			
	Extrato levedura	Sulfato amônio	Lecitina	Citrato	Ext. lev. (%)	Sulf. Amônio (%)	lecitina (%)	citrato (%)
1	-1	-1	-1	-1	0	0	0,001	0,1
2	+1	-1	-1	+1	0,2	0	0,001	0,3
3	-1	+1	-1	+1	0	0,3	0,001	0,3
4	+1	+1	-1	-1	0,2	0,3	0,001	0,1
5	-1	-1	+1	+1	0	0	0,1	0,3
6	+1	-1	+1	-1	0,2	0	0,1	0,1
7	-1	+1	+1	-1	0	0,3	0,1	0,1
8	+1	+1	+1	+1	0,2	0,3	0,1	0,3
9c	0	0	0	0	0,1	0,2	0,01	0,2
10c	0	0	0	0	0,1	0,2	0,01	0,2

* c: ponto central

A escolha dessas variáveis, e seus respectivos níveis, foram baseados em trabalho anterior (CARIGNATTO et al., 2011).

Todos os meios de produção formulados continham em sua composição 2% sacarose; 0,286% KH_2PO_4 ; 0,0006% H_3BO_3 ; 0,00024% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,002% CaCO_3 e 0,0006% ZnO .

Os reagentes utilizados nas formulações dos meios de produção eram da marca Vetec.

4.3.2.2 Otimização do Extrato de Levedura, Sulfato de Amônio e Citrato.

Um delineamento experimental 2^3 , com 4 repetições no ponto central, foi realizado para determinar a condição ótima das variáveis extrato de levedura, sulfato de amônio e citrato, partindo dos resultados obtidos na otimização anterior. As variáveis reais e codificadas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Variáveis do segundo planejamento experimental e seus valores reais e codificados

Meio	Fatores					
	Codificados			Decodificados		
	Extr. Lev	Sulf. Am.	Citrato	Extr. Lev (g/L)	Sulf. Am. (g/L)	Citrato (g/L)
1	-1	-1	-1	1,5	2	0,32
2	-1	-1	+1	1,5	2	0,68
3	-1	+1	-1	1,5	4	0,32
4	-1	+1	+1	1,5	4	0,68
5	+1	-1	-1	2,5	2	0,32
6	+1	-1	+1	2,5	2	0,68
7	+1	+1	-1	2,5	4	0,32
8	+1	+1	+1	2,5	4	0,68
9c	0	0	0	2,0	3	0,50
10c	0	0	0	2,0	3	0,50
11c	0	0	0	2,0	3	0,50
12c	0	0	0	2,0	3	0,50

* c = ponto central *Extr.Lev = extrato levedura *Sulf. Am.= sulfato de amônio

As respostas analisadas de maior interesse foram viscosidade e produção de goma, embora outras análises como biomassa e viscosidade do caldo tenham sido também realizadas.

4.3.3 Comparação entre o melhor meio da literatura e o meio proposto.

Após a avaliação da goma produzida nos diferentes meios descritos pelos autores citados no item 4.3.1, o melhor (meio GO) serviu como parâmetro de comparação para os dez meios formulados por delineamento.

4.4 Produção de xantana em fermentador

Foram realizadas fermentações em fermentador de 7 litros (Figura 8) utilizando o meio GO, nas temperaturas de 25°C e 30°C.

Também foi avaliada a produção de xantana em fermentador utilizando o meio com os melhores resultados obtido em incubadora orbital.

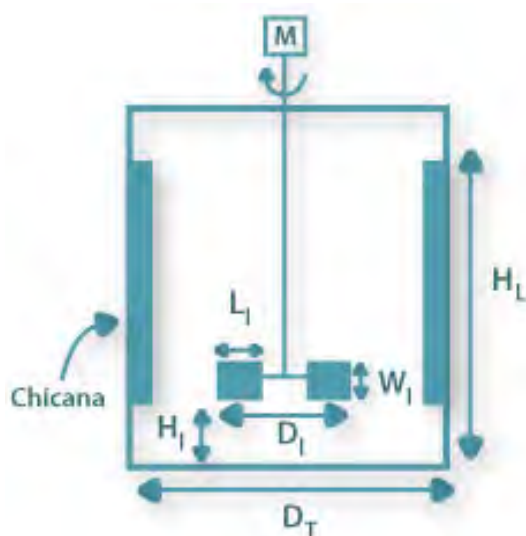


Figura 7: Esquema do fermentador TECBIO (TECNAL-Piracicaba,SP) utilizado para produção da xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Legenda: 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 pás do agitador) = 1,3cm; L_i (largura das pás do agitador) = 1,5cm; W_b (largura das chicanas) = 1,5cm.



Figura 8: Fermentador de 7 litros utilizado para produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Foram utilizados 4 litros do meio de produção e 400 mL do meio formulado (SILVA, 2007; CARIGNATTO e al., 2011) com cultura de 24 horas como inóculo. A temperatura de produção foi mantida a 25°C ou a 30°C de acordo com o protocolo escolhido, com variação máxima e mínima de 0,5°C. Foram coletadas amostras ao longo das 72 horas de produção.

Os dados de oxigênio dissolvido, temperatura, rotação, nível e pressão no interior do fermentador foram coletados a cada 30 segundos durante a produção do biopolímero

A concentração de oxigênio no fermentador foi monitorada através de um eletrodo (InPro6800/12/320 Mettler Toledo) situado a 5cm da parede do vaso de reação, na altura da turbina mais baixa. O eletrodo foi calibrado no instante inicial, antes de se fazer a inoculação do fermentador, saturando-se o líquido com oxigênio através de agitação e aeração. O controle da concentração de oxigênio no meio de cultura foi feito com aeração e agitação. A velocidade de agitação das pás foi controlada de maneira a manter a mais alta concentração de oxigênio possível, sendo o mínimo de 20%.

O sistema de controle de pressão no interior do vaso de reação era composto por sensor de pressão Piezo-Resistivo e linha de alívio de pressão comandada por válvula. A leitura de rotação foi feita por sensor ótico acoplado ao equipamento.

A temperatura foi monitorada com o auxílio de um sensor PT-100, localizado em um poço externo ao fermentador, ao qual foi adicionado uma pequena quantidade de glicerina para favorecer a transferência de calor.

Para o controle do nível de espuma foi utilizado um sensor condutivo e uma solução aquosa de anti-espumante industrial (Aratrop).

4.5 Análises físicas e químicas

4.5.1 Determinação de Biomassa

Foram retirados alíquotas de 15 mL do caldo de fermentação no tempo final de crescimento (24horas) e de produção (72horas). Essas amostras foram centrifugadas (centrífuga Excelsa - Fanen) sob uma rotação de 2800 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado, e este foi ressuspendido em água destilada e recentrifugado para remoção de sais e goma residual e posteriormente foi seco em estufa (Tecnal-Mod. TE 394/1) a 105°C até atingir peso constante para determinação de biomassa.

4.5.2 Extração do Biopolímero

Foram avaliados diferentes métodos de extração e solubilização da goma xantana e seus efeitos na viscosidade e quantidade de goma produzida por *Xanthomonas campestris* FCLA 26.

Em um primeiro teste, a goma foi extraída acrescentando etanol 96°GL sobre o caldo de fermentação (3:1) sem ou com diferentes concentrações (0,001%, 0,1% e 1%) de formaldeído.

Em outro momento, foram realizados testes em que se utilizou uma solução de álcool e NaCl (0,01%) para extração.

Foi utilizada uma terceira metodologia, na qual após precipitação da goma com álcool, esta era dissolvida em solução de NaCl 1% e re-precipitada.

Em todos os métodos, a goma precipitada foi retirada por meio da adsorção desta em um bastão de vidro e o biopolímero foi seco em estufa de ar forçado a 40°C até peso constante.

Testou-se também a solubilização da xantana em solução (0,1%) contendo os sais NaCl ou KCl.

4.5.3 Análise dos açúcares redutores totais e Cálculo dos rendimentos.

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método de Somogyi (1945) e Nelson (1944), após recuperação do biopolímero nas amostras do tempo zero e final, nas fases de produção do inóculo (fase de crescimento) e da produção da goma.

Os resultados foram expressos como rendimentos celulares e do biopolímero, estabelecidos de acordo com a quantidade de biomassa e de goma obtidos em relação à quantidade de açúcar disponível segundo a seguinte equação:

$$\frac{\text{Concentração xantana ou biomassa (final – inicial)}}{\text{Concentração de açúcares consumidos (inicial – final)}} \times 100$$

4.5.4 Viscosidades aparente e pH

Foram analisadas as viscosidades aparente do caldo de fermentação e da goma xantana (solução 1% ou 0,3%) com auxílio de um viscosímetro Brookfield (modelo LVDVII+) à 25°C com cisalhamento de 10 ou 20 rpm e sistema de medida para pequenas amostras. O pH do caldo foi determinado no final da fermentação.

4.5.5 Determinação da viscosidade intrínseca e massa molecular

A viscosidade intrínseca da xantana foi determinada utilizando viscosímetro capilar Cannon-Fensk número 100, mantido em banho termostático a 25°C. Medidas do tempo de escoamento, ou seja, medidas do tempo necessário para a amostra percorrer a distância entre as duas marcas do viscosímetro, foram realizadas nas soluções de goma xantana preparadas nas concentrações entre 0,05 a 0,3%, tendo como solvente solução de NaCl 0,1% (CASAS et al., 2000). As medidas do tempo de escoamento foram feitas em triplicatas.

Através das medidas efetuadas, a viscosidade reduzida (η_{sp}/c) foi calculada pela seguinte equação:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = \frac{t - t_0}{t_0 * c} \quad (\text{eq.1})$$

onde t é o tempo de escoamento da solução polimérica, em segundos; c , a concentração da solução polimérica, em g/dl; t_0 , o tempo de escoamento do solvente, em segundos. O valor de t_0 foi medido sob as mesmas condições de medidas de t .

A viscosidade intrínseca do polissacarídeo foi determinada usando a expressão empírica de Huggins (eq.2) que relaciona viscosidade reduzida (η_{sp}/c) em função da concentração. O valor da viscosidade intrínseca foi avaliado pela extrapolação da reta obtida à concentração zero, pois segundo a teoria de Huggins, em baixas concentrações vale a relação:

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right)_{c=0} + K_H \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right)_{c=0}^2 * c \quad (\text{eq. 2})$$

onde, K_H é o coeficiente de Huggins ou coeficiente de interação. Este coeficiente é a medida de interação polímero-polímero em condições diluídas e também depende da expansão do novelo do polímero enovelado.

O cálculo da massa molecular do polímero foi determinado a partir da equação de Mark-Houwink-Sakurada (eq.3) que tem como base que a viscosidade intrínseca de um polímero em um dado solvente aumenta com a massa molecular.

$$[\eta] = kM_v^\alpha \quad (\text{eq. 3})$$

onde, M_v é a massa molecular viscosimétrica média (dálton) e k e α são constantes viscométricas que dependem da natureza do solvente, da temperatura e da estrutura química do polímero. As constantes usadas para a xantana foram $\alpha = 1,14$ e $k = 1,7 \times 10^{-4}$ em solução de NaCl 0,1% (CASAS et al., 2000).

4.6 Determinação da composição química da xantana

4.6.1 Preparo das amostras para análises

As gomas foram dialisadas contra água destilada por 4 horas em tubos de 12 KDa, com trocas sucessivas a cada 15 minutos, para a retirada de sais provenientes do meio de cultivo e, em seguida, liofilizadas.

4.6.2 Determinação de açúcares totais

O método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956) foi utilizado para determinar a concentração de carboidrato total em cada amostra. O método consiste na formação do derivado furfural, na presença de H₂SO₄ concentrado, que reage com o fenol formando um complexo de cor amarela.

Foram adicionados 0,5 mL da solução de fenol 5% (m/v) e 2,5 mL de H₂SO₄ concentrado (em um único jato) a 0,5 mL da amostra. Após 10 minutos em repouso, a leitura foi realizada em um espectrômetro da marca Micronal a 480 nm. Para calcular a concentração de carboidrato, foi utilizado um padrão de glucose a 0,1% em uma faixa de sensibilidade de 10 a 100 µg.

4.6.3 Análise da composição de monossacarídeos por cromatografia líquida de alta pressão e coluna de troca iônica (HPAEC)

Para obtenção dos monossacarídeos foi realizada previamente a hidrólise ácida total do polissacarídeo (50 µg). Para tal hidrólise, foram adicionados à goma seca 300 µL de ácido trifluoracético (TFA) 2M em tubo de hidrólise, e mantida em estufa a 120°C por 2 horas em tubo próprio para hidrólise. A remoção do ácido foi realizada com auxílio de um evaporador rotativo (BUTCHI – R 114), fazendo-se várias trocas de água deionizada até a evaporação completa do ácido.

A análise dos monossacarídeos foi realizada utilizando um sistema Dionex DX500 (cromatografia líquida de íons) e um detector de amperimetria integrada (IAD). Os cromatogramas foram registrados em um integrador modelo 4600. Os açúcares neutros foram separados isocriticamente, usando uma coluna analítica CarboPac PA1 (4x250 mm) equipada com guarda coluna PA1, ao fluxo de 1 mL por minuto. As condições de eluição foram produzidas usando água deionizada (eluente 1) e NaOH

0,2M (eluyente 2), preparada a partir de uma solução de NaOH a 50%. Antes da injeção da amostra foram necessários 15 minutos para equilibrar a coluna. Foram injetados no Dionex 25 μ L de solução em estudo contendo 1 μ g de açúcares totais por 25 minutos e a coluna foi regenerada com 100% do eluyente 2, por 10 minutos.

4.6.4 Determinação do teor de ácido urônico

O ácido urônico foi mensurado pelo método colorimétrico descrito por Filisetti-Cozzi e Carpita (1991) que apresenta sensibilidade de 0,97 a 38,8 μ g.

Foram adicionados 40 μ L de uma solução de ácido sulfâmico-sulfamato de potássio 4 M (pH 1,6) em 400 μ L de amostra (150 μ g/mL). Em seguida, acrescentou-se 2,4 ml de solução de tetraborato de sódio (75 mM, em H₂SO₄ concentrado) e manteve-se a mistura aquecida em água fervente por 20 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 80 μ L da solução de m-hidroxi-bifenil (0,15 %) em NaOH (0,5 %). Formou-se um complexo colorido e este foi lido em espectrofotômetro a 525 nm.

4.6.5 Determinação do teor de piruvato

A dosagem de piruvato foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Sloneker e Orentas (1962).

Primeiramente a goma (2,5 mL de solução 0,15%) foi hidrolisada com 4 mL de HCl 1M por 3 horas a 100 °C em estufa. Foram transferidos 1,5 mL do hidrolisado para tubo de ensaio e adicionados 1 mL de uma solução 0,5% de 2,4 dinitrofenil-hidrazina em solução de HCl 2M. A mistura foi agitada durante 5 minutos para que houvesse a formação do sal piruvato de hidrazona, o qual foi extraído com a adição de 5 mL de acetato de etila e agitação do tubo. Formaram-se duas fases, aquosa e orgânica, presentes na parte inferior e superior, respectivamente, do tubo. A fase aquosa foi descartada com auxílio de uma pipeta e a fase orgânica foi lavada 3 vezes, sendo cada uma com 5 mL de carbonato de sódio 10% e agitada. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 375 nm e a concentração de piruvato foi determinada através de uma curva de calibração com padrão ácido pirúvico com faixa de sensibilidade de 10 a 100 μ g.

4.6.6 Determinação do teor de acetato

O teor de acetil foi determinado pelo método de Hestrin (1949). Os experimentos foram feitos em tubos de ensaio, no qual foram colocados 1,0 mL da amostra (solução contendo 6mg xantana solubilizada em 3 mL de acetato de sódio 0,001N) e 2 mL de uma mistura 1:1 das soluções de cloreto de hidroxilamônio 2M e hidróxido de sódio 3,5M. Após agitação por 1 minuto foi adicionado 1,0 mL de solução de ácido clorídrico 4,1M para baixar o pH da solução para cerca de $1,2 \pm 0,2$ e agitada novamente. O complexo colorido formado foi lido em cubetas de vidro a 540 nm em um espectrofotômetro e as cubetas foram lavadas com acetato entre as triplicatas.

Todas as soluções foram bem homogeneizadas e preparadas no dia em que foram utilizadas para que não ocorresse nenhum prejuízo na determinação de acetil, visto que algumas soluções eram instáveis. A concentração de acetil foi calculada através de uma curva de calibração com padrão cloreto de acetilcolina.

4.6.7 Análise da homogeneidade por Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC)

As análises de homogeneidade foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC), equipado com um detector de índice de refração diferencial SHIMADZU modelo RID 10A com fluxo de 0,6 mL/min. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação marca WATERS, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 , dispostas em série. Uma solução de nitrato de sódio (NaNO_3 0,1M), contendo azida sódica (0,003%) foi utilizada como fase móvel, em uma pressão de 1422 psi a 37 °C. A aquisição de dados foi realizada pela utilização do programa LC Solution (SHIMADZU CORPORATION).

Para essa análise foi preparada uma solução 0,01% da goma e esta filtrada em membrana de acetato de celulose 0,22 μm .

4.7 Forma de análise dos resultados

Foram calculadas as médias, desvio padrão e os tratamentos foram comparados estatisticamente através de análise de variância e teste de Tukey conforme o software estatístico Graphad-Instat (Rutgers University). Os dados experimentais do planejamento experimental foram analisados através do programa MINITAB.

5. RESULTADOS

5.1 Aspectos nutricionais de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

5.1.1 Comparação entre os meios descritos por Souw e Demain e Garcia-Ochoa

Os meios SD e GO foram comparados para determinar o melhor a ser utilizado na fase de produção de xantana para a linhagem em questão.

Observou-se uma diferença significativa na biomassa formada durante a segunda etapa do processo, na qual foram utilizados os dois diferentes meios. Nesta fase, maior quantidade de células (cerca de 2,4 vezes) foi obtida quando a bactéria foi inoculada no meio de produção GO (Tabela 4).

Com o meio de produção SD, maior quantidade de goma foi produzida, apesar de esta não ser a mais viscosa. A maior disponibilidade de açúcar e a relação alta de C/N presente nesse meio devem ter favorecido a formação de goma em maior quantidade. Outros autores também observaram a importância da concentração maior de fonte de carbono em detrimento da fonte de nitrogênio na etapa de produção de xantana (QUINLAN, 1986; NITSCHKE et al., 2001).

Em relação ao pH do caldo, no término da fermentação, o valor permaneceu próximo da neutralidade nos dois meios de produção testados (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação entre os valores médios obtidos utilizando os meios de produção SD e GO para produção de xantana por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Meios	Biomassa (g/L)	Xantana (g/L)	Viscosidade aparente (cP)		Rendimento (%)		pH
			Caldo	Goma	celular	goma	
SD	0,28 ^a	14 ^a	2251 ^a	824 ^a	8,8 ^a	35 ^a	6,96 ^a
GO	0,66 ^b	10 ^b	1531 ^b	1000 ^a	12,8 ^b	61 ^b	6,98 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os rendimentos celulares e do biopolímero dependem da concentração de açúcar presente no meio, pois seus valores são estabelecidos de acordo com a quantidade de biomassa e de goma obtidos em relação à quantidade de açúcar disponível. Os meios de produção utilizados continham concentrações diferentes de sacarose. O meio GO continha a metade da concentração de açúcar do meio SD e proporcionou um melhor rendimento celular (Figura 9).

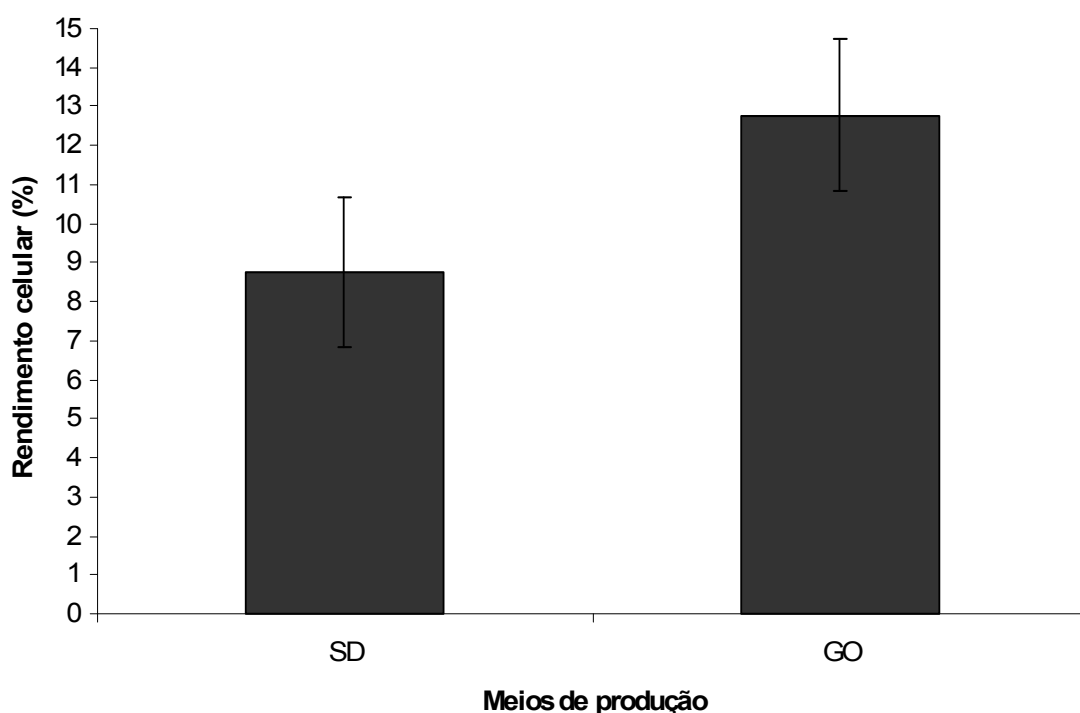


Figura 9: Rendimento celular obtido usando os meios SD e GO na fase de produção de xantana.

Em relação ao rendimento da xantana, obteve-se rendimento de 61% e 35% nos meios GO e SD, respectivamente (Figura 10).

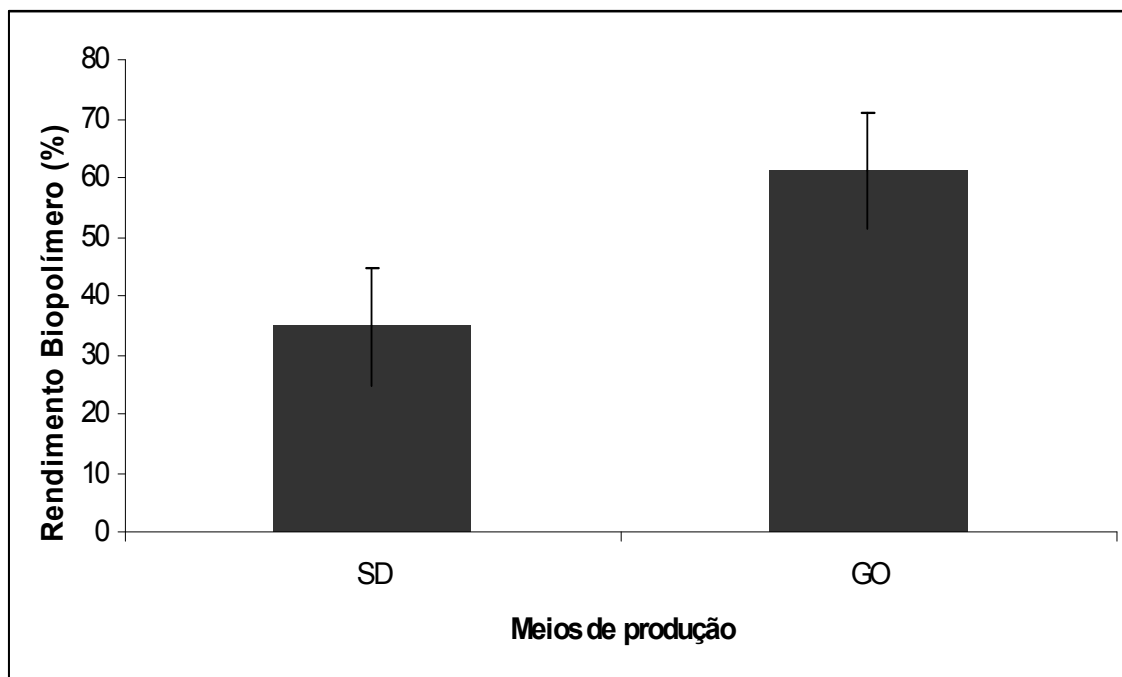


Figura 10: Rendimento do biopolímero usando os meios SD e GO por cultivo de *X. campestris pv campestris* por 72 h e 30°C.

Tanto a viscosidade da goma quanto a do caldo de fermentação foram determinadas e verificou-se que a maior viscosidade do caldo em meio SD (2251 cP) não foi acompanhada por uma maior viscosidade da goma (824 cP). Provavelmente isso se deve à maior quantidade de goma produzida nesse meio (14 g/L), já no meio GO houve uma viscosidade da goma ligeiramente maior (1000 cP).

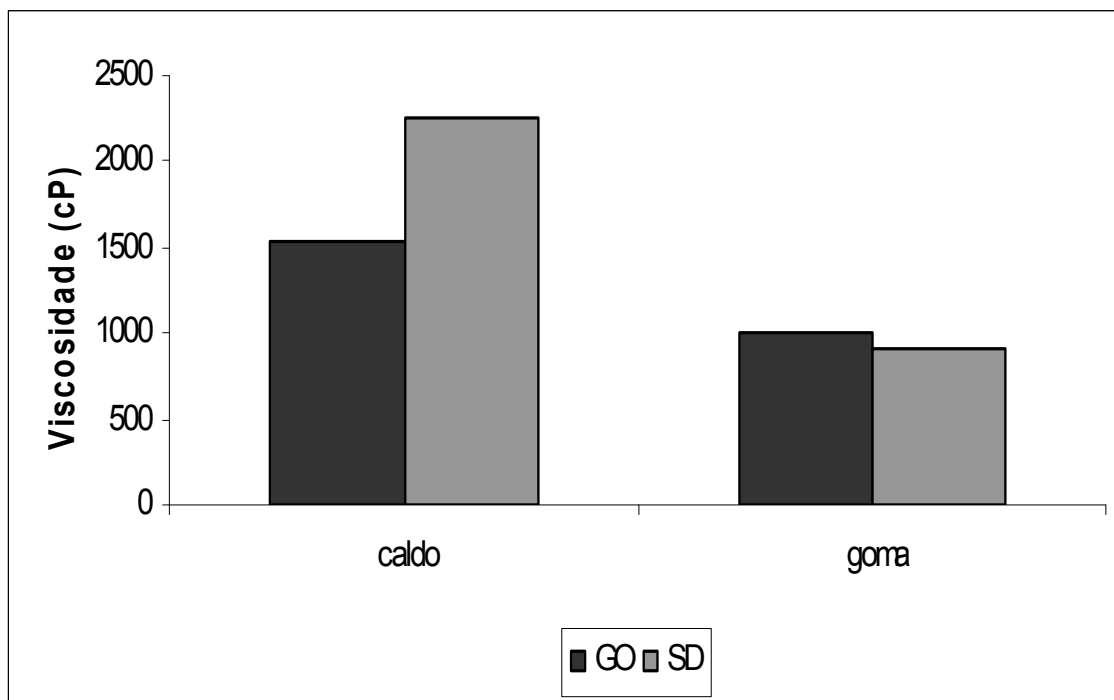


Figura 11: Viscosidade do caldo de fermentação e da goma xantana (1%) produzida nos meios de produção SD e GO por cultivo de *X. campestris pv campestris* por 72 h e 30 °C.

Considerando que a composição nutricional proposta por Garcia-Ochoa proporcionou maior rendimento celular (12,8%) de *Xanthomonas campestris pv. campestris*, maior rendimento de xantana (61%) e formação de goma mais viscosa (1000 cP), esse meio foi utilizado posteriormente para comparação com os meios de produção formulados através de delineamento experimental.

5.1.2 Delineamento Experimental

5.1.2.1 Influência dos nutrientes na produção de xantana

Para análise de alguns nutrientes sobre a produção de goma xantana foram formulados 10 ensaios de produção. A Tabela 5 apresenta os níveis das variáveis

independentes já decodificadas e as respostas obtidas de biomassa, goma xantana produzida, viscosidades aparente da goma e do caldo.

Tabela 5: Valores reais e respostas do planejamento experimental

Meio	Fatores				Respostas				
	Extrato Levedura (%)	Sulfato Amônio (%)	Lecitina (%)	Citrato (%)	Biomassa (g/L)	Xantana (g/L)	Viscosidade aparente goma caldo (cP)		
1	0	0	0,001	0,1	1,10	3,2	2489	256	
2	0,2	0	0,001	0,3	0,78	7,8	301	204	
3	0	0,3	0,001	0,3	0,82	7,5	396	238	
4	0,2	0,3	0,001	0,1	1,32	11,5	711	2319	
5	0	0	0,1	0,3	0,74	2,1	357	19	
6	0,2	0	0,1	0,1	0,76	5,8	1150	159	
7	0	0,3	0,1	0,1	1,26	8,6	1090	1087	
8	0,2	0,3	0,1	0,3	1,20	11,6	207	458	
9	0,1	0,2	0,01	0,2	0,81	7,6	762	445	
10	0,1	0,2	0,01	0,2	0,84	7,9	979	645	

Os nutrientes extrato de levedura e sulfato de amônio tiveram efeitos positivos sobre a quantidade de goma produzida, mas não influenciaram significativamente na viscosidade aparente da goma (Tabela 6).

O citrato exerceu um efeito negativo sobre a viscosidade o que significa que ao aumentar a concentração de 0,1 para 0,3% deste componente, ocorre redução da viscosidade aparente (Tabela 6). Borowski et al. (2006) também observaram uma influência negativa desse nutriente sobre a qualidade da goma.

Segundo Souw e Demain (1980) o citrato, nas concentrações de 0,09 a 0,18% (m/v), estimulam a produção da xantana quando o pH não é controlado. No entanto, no presente estudo, no qual também foi testado concentrações de citrato dentro dessa

faixa, não se observou um efeito significativo desse nutriente sobre a quantidade de goma produzida (Tabela 6).

Tabela 6: Estimativa dos efeitos para produção e viscosidade da goma.

Variável	Efeito	
	Goma (g/L)	Viscosidade aparente(cP)
Média	7,3580	844,18
Extrato levedura	3,8500	-490,65
Sulfato de amônio	5,1000	-473,40
Lecitina de soja	-0,4800	-273,30
Citrato	-0,0300	-1044,65

Valores em negrito com p-valor < 0,05

Influência do citrato sobre a viscosidade

Verificou-se que alguns meios de produção (1, 6 e 7) favoreceram a formação de gomas mais viscosas (Tabela 5). Estes meios tinham em comum a concentração de 0,1% citrato, quantidade menor que a presente no meio GO (0,21%).

O melhor meio para produção de xantana foi o meio 1 que apresentou xantana com viscosidade 2,8 vezes superior à produzida no meio GO (880cP). A combinação ausência de nitrogênio com concentração mais adequada de citrato (0,1%) permitiu a biossíntese de goma excepcionalmente viscosa (2489 cP).

Em trabalhos anteriores, o citrato foi adicionado ao meio de crescimento de *Xanthomonas campestris pv. campestris* na concentração de 0,05%, apresentando um efeito positivo sobre a viscosidade do caldo e formação de biomassa (CARIGNATTO et al., 2011).

Souw e Demain (1980) observaram que a utilização de 0,09% de citrato e 0,2% de glutamato, como fonte de nitrogênio ao invés de sulfato de amônio, favorece a produção de uma goma de melhor qualidade e em maior quantidade.

Os meios com 0,3% de citrato (2, 3 e 8), apresentaram as piores viscosidades. Segundo Vuyst e Vermeire (1994) o aumento da concentração de citrato no meio ocasiona um aumento concomitante no teor de piruvil na goma. Esse radical, que será discutido no item 5.5.2, parece ter influenciado negativamente na viscosidade da goma.

O nutriente citrato, em demasia, provavelmente deve alterar também negativamente a conformação tridimensional da goma quanto a sua propriedade reológica.

A análise do efeito do citrato sobre a viscosidade da goma foi estatisticamente significativa e negativa, demonstrando que são inversamente proporcionais na faixa de concentração avaliada (Tabela 6).

Influência do nitrogênio sobre a xantana produzida

O nitrogênio foi um nutriente importante para formação de goma xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Os meios 1 e 5 foram formulados sem a presença do nitrogênio e nessa condição foram obtidos os piores resultados para formação de goma (3,2 e 2,1 g/L respectivamente).

Os meios 4 e 8, que apresentavam tanto sulfato de amônio (0,3%) quanto extrato de levedura (0,2%) em sua composição, proporcionou a produção de maior quantidade de goma e de biomassa. Nestes meios cerca de 30% a mais de goma foi obtida em relação ao meio GO (8,9 g/L). A análise estatística foi significativa e diretamente proporcional para a produção da goma, apesar de não ter sido significativa para a produção da biomassa (Tabelas 5 e 6). Isso ocorreu provavelmente por que nesta fase a produção de biomassa é relativamente pequena comparada à fase de crescimento.

No presente estudo, verificou-se que a fonte de nitrogênio influencia na produção de goma, assim como observado em outros trabalhos (SILMAN; ROGOVIN, 1970; MORAINÉ; ROGOVIN, 1973). Isso ocorre porque a formação da goma está associada ao crescimento celular e ao aparecimento de metabólitos. No entanto, Kalogiannis et al. (2003) observaram que altas concentrações de nitrogênio apresentam um efeito inibitório sobre o crescimento celular e a produção de goma xantana.

O excesso de nitrogênio resultou em boa produção de goma e crescimento celular, porém acompanhado de uma goma menos viscosa, como no caso dos meios 4 (711 cP) e 8 (207 cP). No entanto, o efeito tanto do sulfato de amônio como do extrato de levedura não foram significativos sobre a resposta viscosidade (Tabela 6). Provavelmente, a viscosidade bastante baixa da goma produzida no meio 8 tenha sido resultado de uma alta concentração de citrato (0,3%) três vezes superior àquela

verificada ser a mais adequada (0,1%). A relação inversa entre viscosidade e quantidade de goma também foi observada em outros trabalhos (OLIVEIRA, 2009; CARIGNATTO et al., 2011). Possivelmente, a maior velocidade na biossíntese para formação de mais xantana faz com que diminua a qualidade desta, desde que é conhecido que estimulando a biomassa há também um estímulo na produção do biopolímero.

Constatou-se também que, apesar de alguma fonte de nitrogênio ser necessária para produção do biopolímero, não há necessidade dela ser orgânico. Isto é indicado pelos meios 3 e 7 que apresentam gomas em quantidades intermediárias (7 e 8 g/L) e boa viscosidade (1090 cP).

pH do caldo de fermentação

Sabendo da importância do pH sobre o crescimento de micro-organismos e sobre seu metabolismo, este foi mensurado no término da fermentação. Na maioria das vezes, o caldo de fermentação permaneceu com uma leve alcalinidade (Figura 12). Psomas et al. (2007) também constataram um pH básico (8-10) do caldo fermentativo.

Os meios 4 e 7, foram exceções e apresentaram o pH do caldo próximo de 6, o mesmo valor otimizado para a fase de crescimento da *Xanthomonas campestris* (OLIVEIRA, 2000). Nesses meios a biomassa foi maior que nos demais. Segundo Garcia-Ochoa et al. (2000) para a produção da goma xantana e qualidade do polímero os melhores intervalos de pH é entre 7,0 – 8,0.

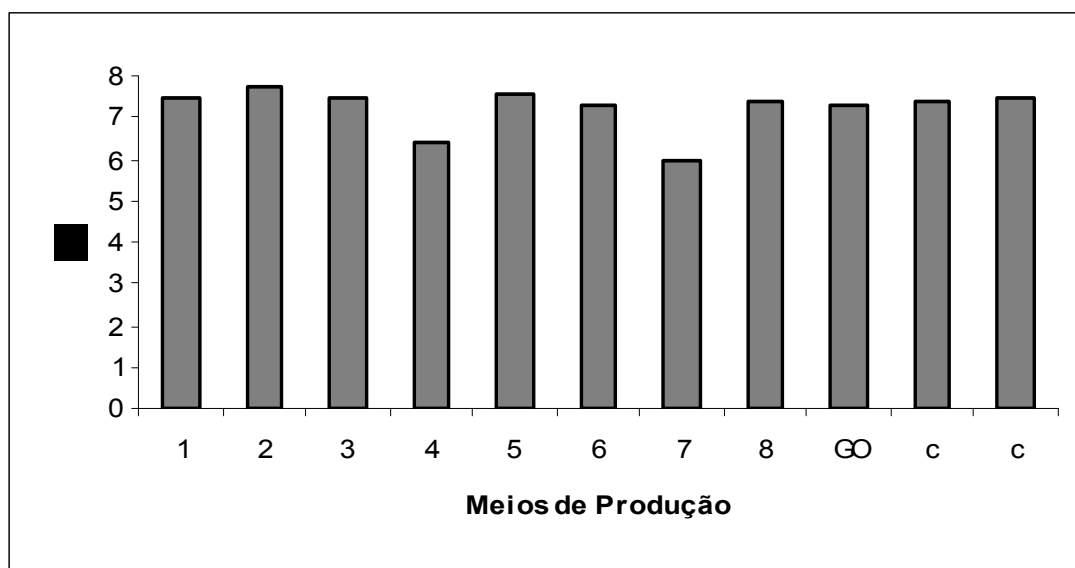


Figura 12: Valor do pH final do caldo de fermentação utilizando diferentes meios de produção por *X. campestris pv campestris* a 30°C e 72 h de cultivo.

Relação entre rendimento celular e do biopolímero no meio de produção

O rendimento celular também foi avaliado e os melhores resultados foram alcançados nos meios 1 (6,3%) e 4 (6,1%), no entanto, esses meios diferem quanto à disponibilidade de nitrogênio. Enquanto o meio 1 não apresenta nenhuma fonte de nitrogênio, o meio 4 apresenta as maiores concentrações testadas de sulfato de amônio e extrato de levedura. Portanto, nessa fase de produção de goma, percebe-se que não há tanta necessidade da presença desse componente para formação da biomassa, pois além de o inóculo já possuir nitrogênio residual, não há grande formação de biomassa nesta etapa. No entanto, ambos os meios continham 0,1% de citrato e este componente influencia positivamente na formação da biomassa (SOUW; DEMAÏN, 1980; CARIGNATTO et al., 2011).

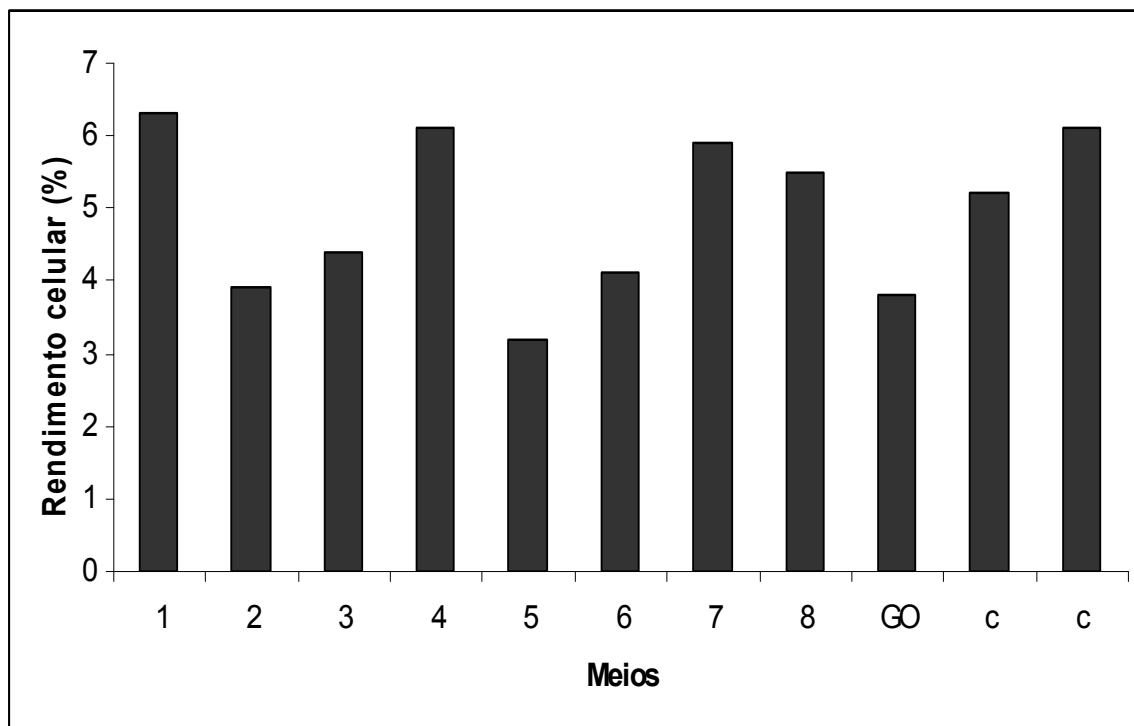


Figura 13: Rendimento celular obtido utilizando diferentes meios de produção por *X. campestris pv campestris* a 30°C e 72 h de cultivo.

O rendimento do biopolímero, referente ao 1º estudo de delineamento, que relaciona a concentração de goma pela concentração de açúcar ofertada, foi maior nos meios 7 (72%) e 8 (78%), que têm em comum a combinação da mesma concentração dos componentes lecitina de soja (0,1%) e sulfato de amônio (0,3%), sugerindo que estes nutrientes podem ter influência nestes resultados (Figura 14) .

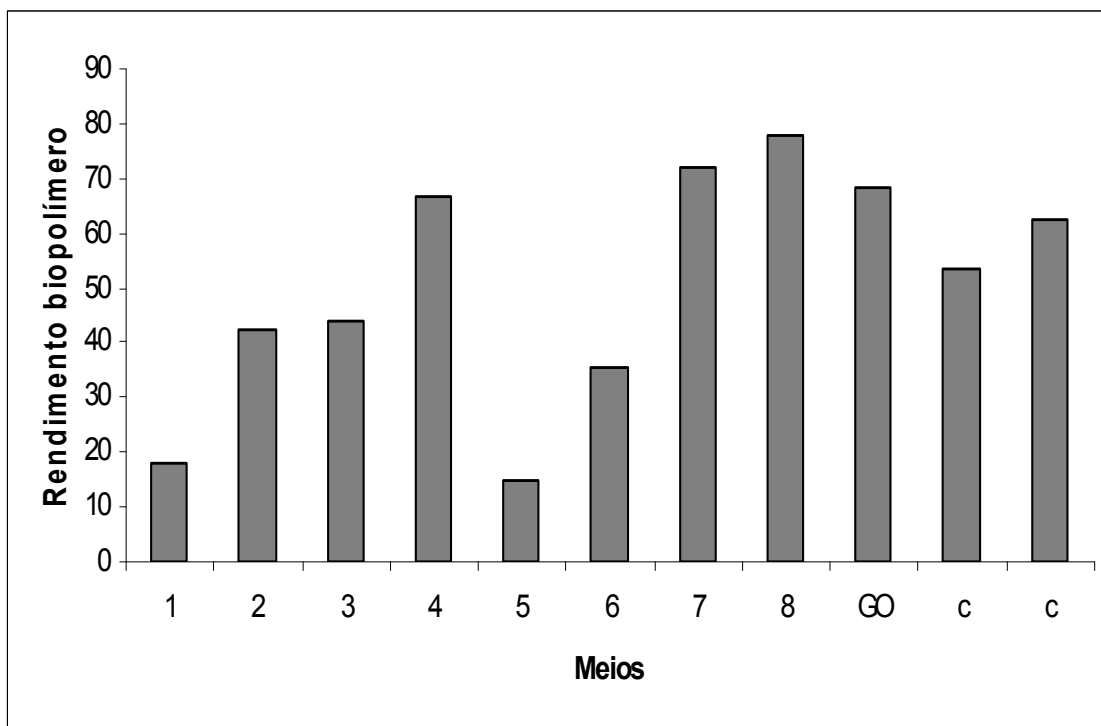


Figura 14: Rendimento de goma xantana nos diferentes meios de produção por *X. campestris pv campestris* a 30 °C e 72 h de cultivo .

5.1.2.2 2ºEstudo de superfície de resposta referente aos nutrientes Extrato de Levedura, Sulfato de Amônio e Citrato quanto a produção de biomassa, goma xantana e viscosidade.

A partir dos resultados dos efeitos das variáveis (Tabela 6) sobre a produção e viscosidade da xantana, novas concentrações foram definidas e um novo delineamento foi realizado com as variáveis extrato de levedura, sulfato de amônio e citrato, os quais apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$). Já a lecitina de soja foi retirada do meio de produção por não apresentar um efeito significativo sobre estas respostas, apesar de aparentemente ter favorecido o rendimento do biopolímero.

Na Tabela 7 está representado o novo planejamento que foi realizado com o intuito de possibilitar uma melhor compreensão da influência desses nutrientes individualmente, e a interação deles na produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Tabela 7: Fatores e respostas de primeiro planejamento experimental com 4 pontos centrais para produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Meio	Fatores			Respostas			
	Extr.Lev. (%)	Sulf. Am. (%)	Citrato (%)	Biomassa (g/L)	Xantana (g/L)	Visc. goma (cP)	Visc. caldo (cP)
1	0,15	0,2	0,032	1,3	4,3	139	17,7
2	0,15	0,2	0,068	1,4	4,5	452	30,6
3	0,15	0,4	0,032	0,9	1,9	93	6,9
4	0,15	0,4	0,068	1,8	4,7	298	26,6
5	0,25	0,2	0,032	1,2	2,8	65	7,5
6	0,25	0,2	0,068	1,9	3,1	249	12,6
7	0,25	0,4	0,032	1,8	2,1	28	7,2
8	0,25	0,4	0,068	1,5	1,7	68	7,1
9c	0,20	0,3	0,050	2,1	3,2	344	14,4
10c	0,20	0,3	0,050	1,8	3,6	277	30,5
11c	0,20	0,3	0,050	1,8	3,5	288	31,9
12c	0,20	0,3	0,050	1,9	3,6	290	18,4

* c = ponto central *visc = viscosidade *Extr.Lev = extrato levedura *Sulf. Am.= sulfato de amônio

Altas concentrações de fonte de nitrogênio (2,5 g/L de extrato de levedura e 4 g/L sulfato de amônio), combinadas influenciaram negativamente no bioprocesso ocasionando os piores resultados obtidos na fermentação (meios 7 e 8).

O meio 2 foi o mais satisfatório para produção de goma e viscosidades, e apresentava pequena quantia destas fontes de nitrogênio, mas possuía 0,68 g/L de citrato, o qual, no delineamento anterior, foi muito importante para a viscosidade da goma em concentração próxima (1,0 g/l).

Os coeficientes de regressão para as resposta estudadas estão apresentados na Tabela 8. Para a resposta produção de goma (Y_1), somente a variável extrato de

levedura foi estatisticamente significativa, ao nível de significância 5%. O aumento da concentração desse nutriente levou à diminuição da síntese de xantana.

Os meios de produção referentes ao ponto central apresentaram valores próximos para as respostas viscosidade e produção da goma, o que indica a reprodutibilidade do experimento.

A seguir, está representada a equação para descrever a produção da goma prevista pelo modelo em função das variáveis codificadas:

$$Y_1 = 3,475 - 0,7125 (\text{extrato levedura})$$

Tabela 8: Estimativas dos coeficientes de regressão para produção de goma (Y_1).

Fatores	Coefficiente	Erro padrão	T	p-valor
Média	3,4750	0,3030	11,469	0,000
Extrato levedura	-0,7125	0,2142	-3,326	0,029
Sulfato de Amônio	-0,5375	0,2142	-2,509	0,066
Citrato	0,3625	0,2142	1,692	0,166
Extrato lev x extrato levedura	-0,3375	0,3711	-0,910	0,415
Extrato lev x sulfato amônio	0,0125	0,2142	0,058	0,956
Extrato lev x citrato	-0,3875	0,2142	-1,809	0,145
Sulfato amônio x citrato	0,2375	0,2142	1,109	0,330

S = 0,605960 / $R^2 = 86,46\%$ / R^2 (adj) = 62,77%

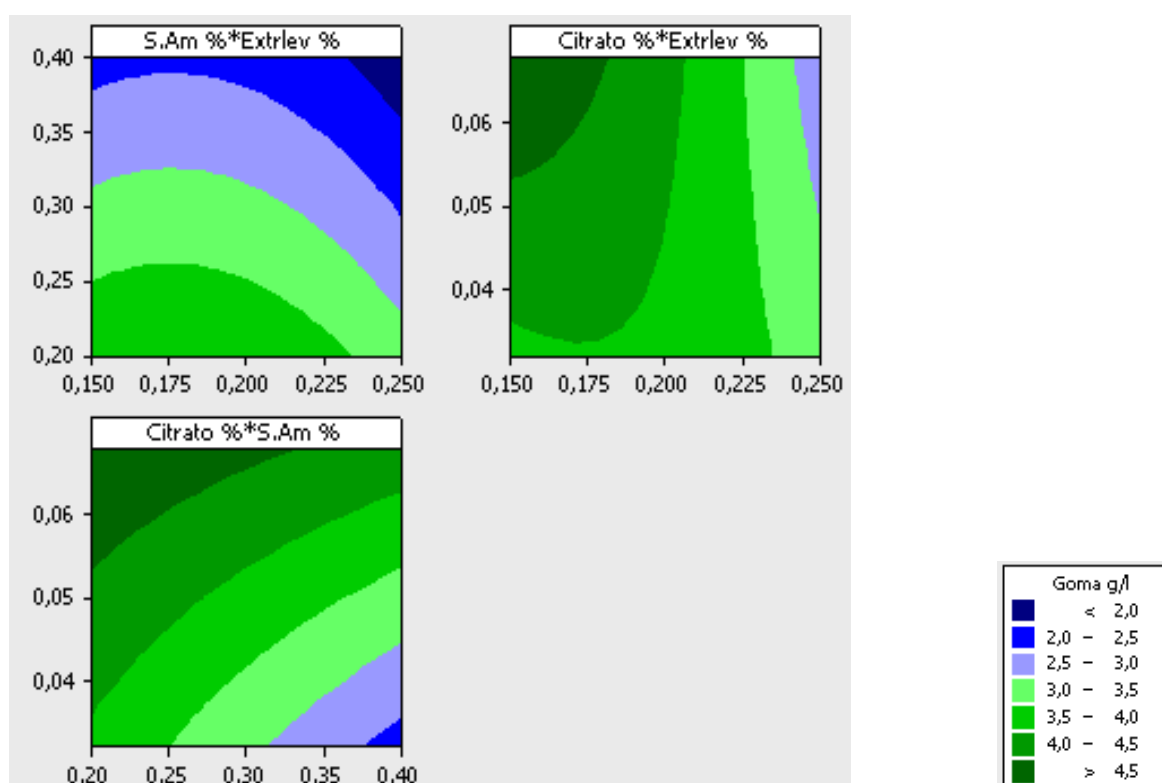


Figura 15: Curvas de contorno para produção de goma xantana (g/L) em função das concentrações de sulfato de amônio (S. AM), extrato de levedura (Extrlev) e citrato (obs. O primeiro nutriente refere-se ao eixo Y e o segundo ao eixo X).

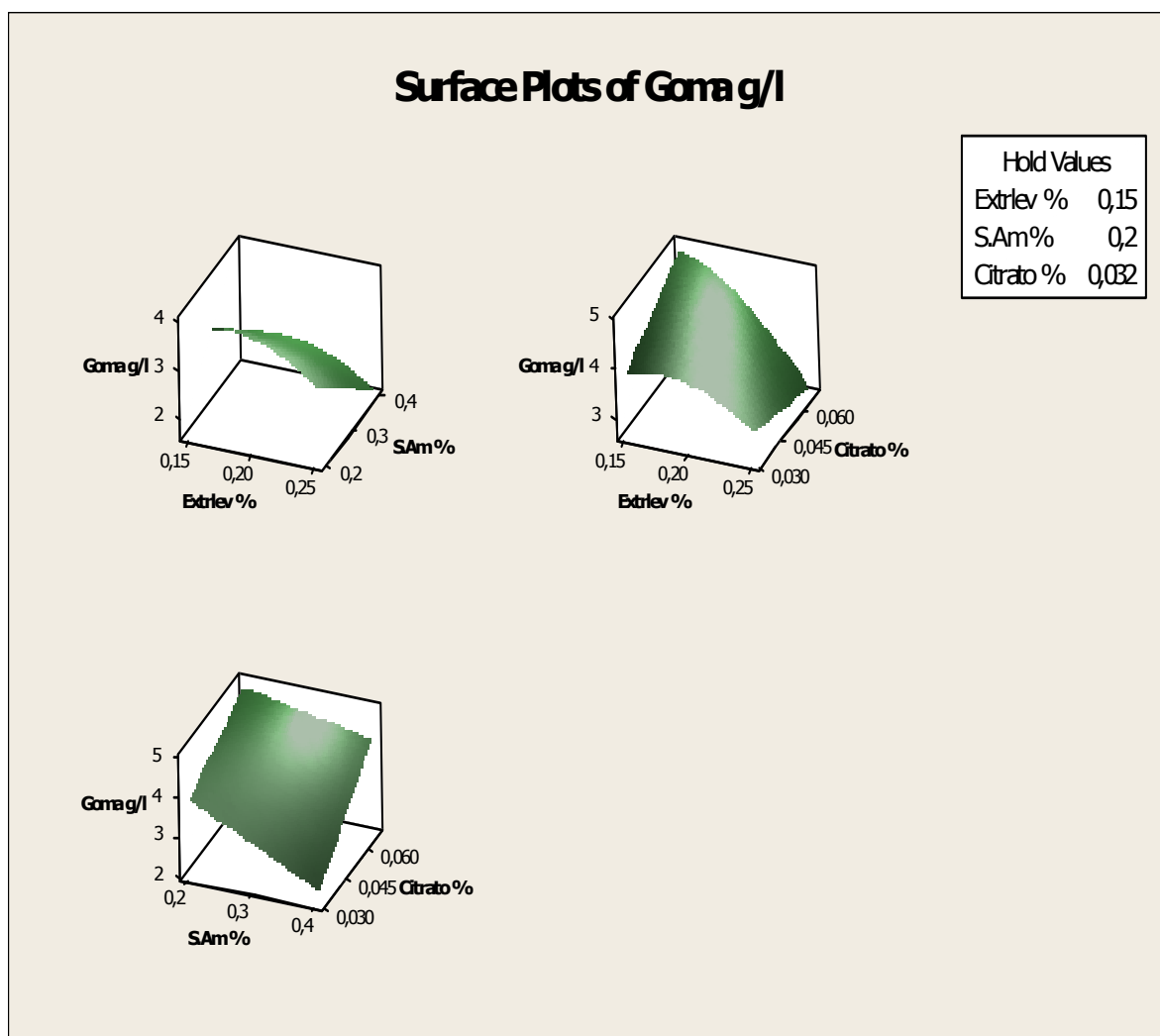


Figura 16: Superfície de resposta para a goma xantana (g/L) produzida em função das concentrações de sulfato de amônio (S.Am), extrato de levedura (Extrlev) e citrato no cultivo de *X. campestris pv campestris* a 30 °C e 72 h.

Para a resposta viscosidade da goma (Y_2) verifica-se que, com exceção do fator extrato de levedura x sulfato de amônio, todos os outros termos das variáveis foram estatisticamente significativos ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9: Estimativas dos coeficientes de regressão para a resposta viscosidade da goma (Y_2).

Fatores	Coeficiente	Erro padrão	T	p-valor
Média	299,75	13,395	22,378	0,000
Extrato levedura	-71,50	9,472	-7,549	0,002
Sulfato de amônio	-52,25	9,472	-5,516	0,005
Citrato	92,75	9,472	9,792	0,001
Extrato lev x extrato levedura	-125,75	16,405	-7,665	0,002
Extrato lev x sulfato amônio	-2,25	9,472	-0,238	0,824
Extrato lev x citrato	-36,75	9,472	-3,880	0,018
Sulfato amônio x citrato	-31,50	9,472	-3,326	0,029

S = 26,7897 / % variação explicada $R^2 = 98, 53\%$ / R^2 (adj) = 95,96%

A maior viscosidade foi encontrada nos níveis mínimos para extrato de levedura e sulfato de amônio. Outros autores também verificaram que concentrações altas de fonte de nitrogênio resultavam em uma goma menos viscosa (KENNEDY et al., 1982; CASAS et al., 2000).

A análise estatística ($p=0,824$) não indica uma interação entre o extrato de levedura e sulfato de amônio, ambos fontes de nitrogênio. Porém essa interação existe entre cada um desses nutrientes com o citrato ($p < 0,05$). Na presença do citrato em concentrações iguais ou superiores a 0,06% o extrato de levedura deve ser usado na faixa de 0,15-0,20%, e o sulfato de amônio na faixa de 0,20-0,25%, para obtenção de melhores resultados de viscosidade da goma (Figuras 17 e 18).

A equação para descrever a viscosidade da goma prevista pelo modelo em função das variáveis codificadas é a seguinte:

$$Y_2 = 299,75 - 71,5(\text{extrato levedura}) - 52,25 (\text{sulfato amônio}) + 92,75(\text{citrato}) - 125,75 (\text{extrato levedura})^2 - 36,75 (\text{extrato levedura} \times \text{citrato}) - 31,5 (\text{sulfato amônio} \times \text{citrato})$$

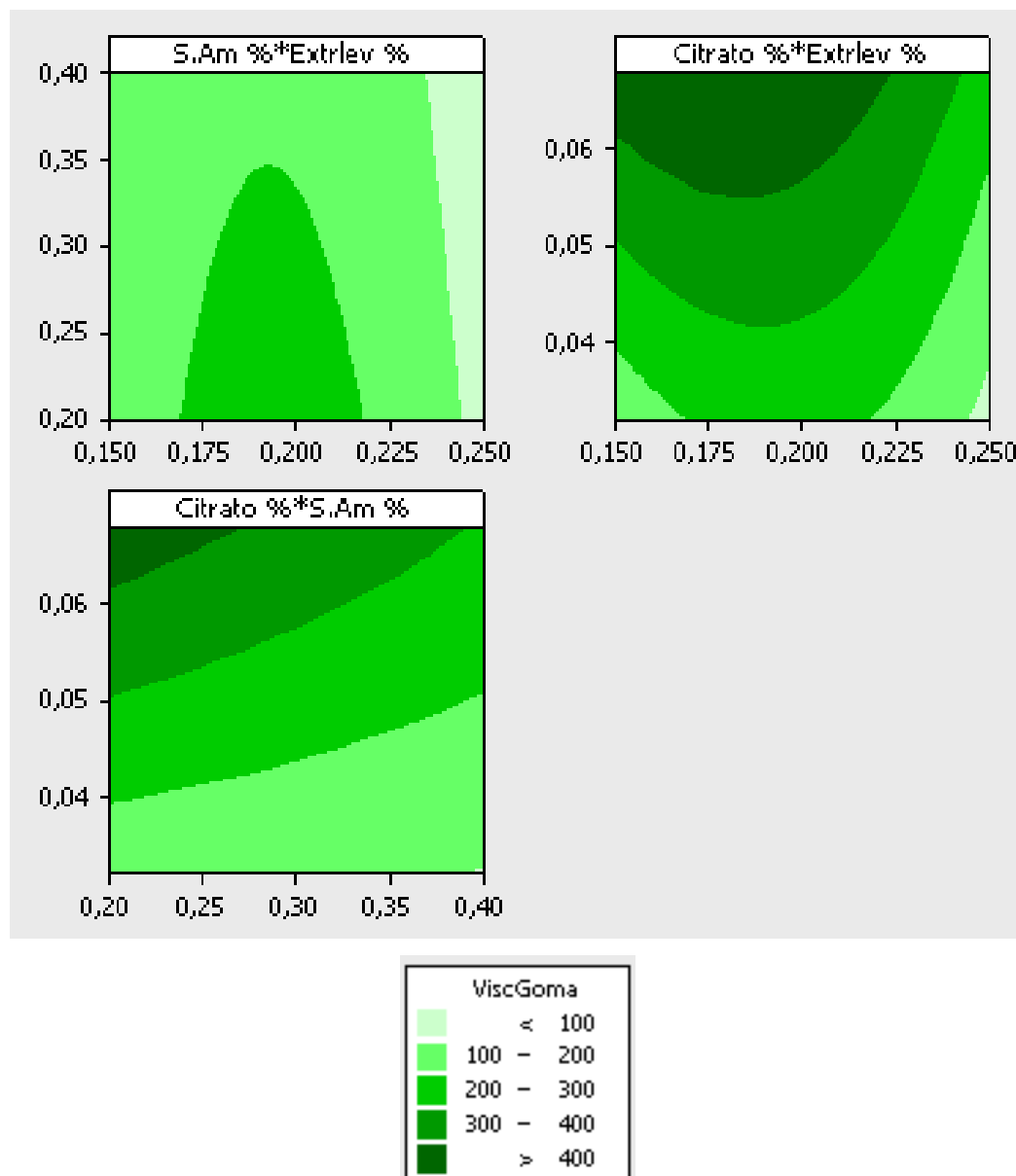


Figura 17: Curvas de contorno para viscosidade da goma xantana (g/L) produzida em função das concentrações de sulfato de amônio (S.Am), extrato de levedura (Extrlev) e citrato.

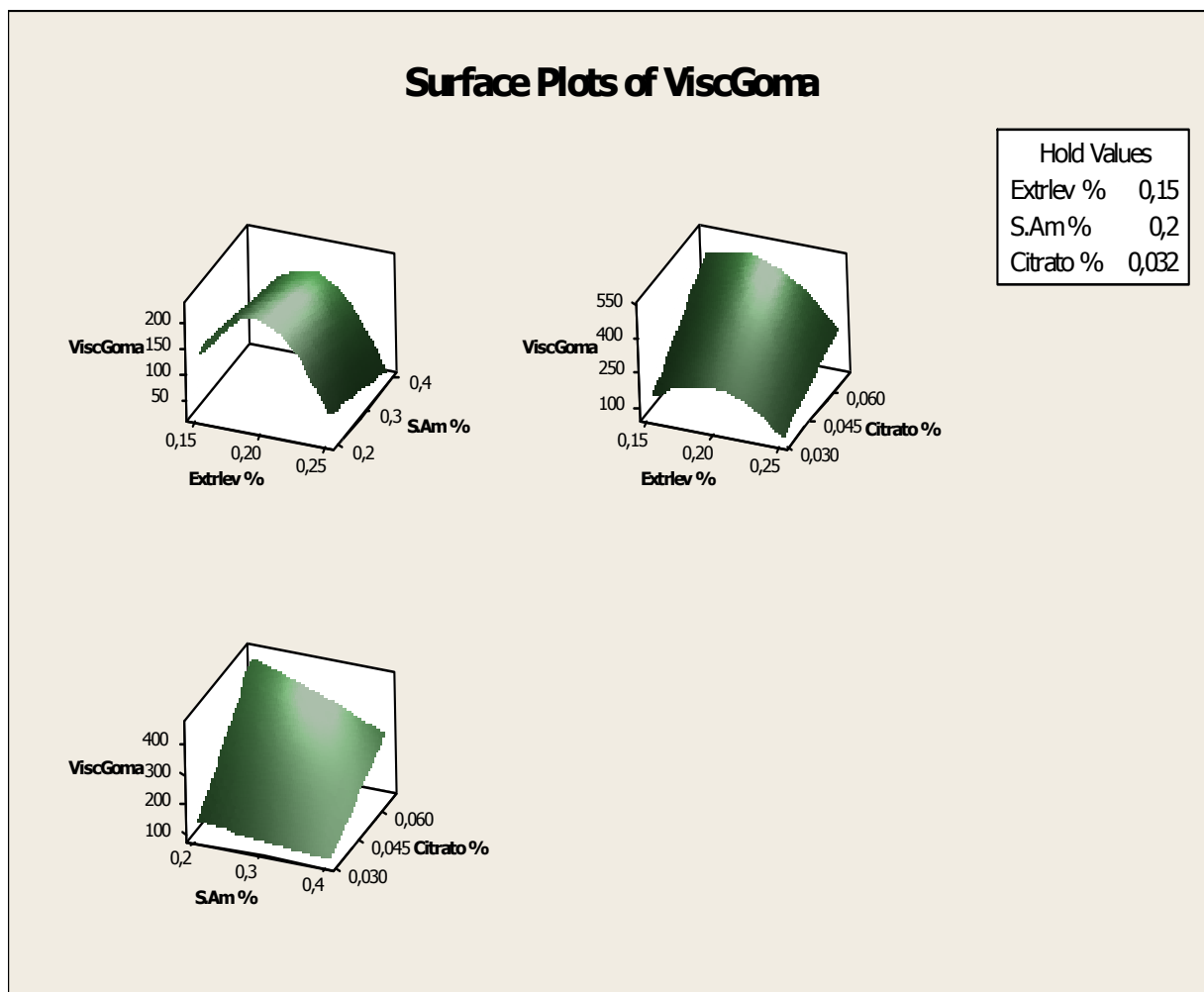


Figura 18: Superfície de resposta para a viscosidade da goma xantana (cP) em função das concentrações de sulfato de amônio (S.Am), extrato de levedura (Extrlev) e citrato.

A bactéria *Xanthomonas campestris pv. campestris* utilizando meios de produção que continham extrato de levedura, sulfato de amônio e citrato em concentrações diferentes produziu xantana em quantidades e com aspectos também diferentes (Figura 19).

As gomas 9, 10, 11 e 12 foram produzidas em meio com a mesma composição, pois são referentes ao ponto central e apresentaram-se bastante parecidas em relação à textura e coloração.

A coloração das gomas produzidas nos meios 5, 6, 7 e 8 era mais escura comparada às outras, provavelmente essa característica foi ocasionada pela presença de maior concentração de extrato de levedura (0,25%) nesses meios.

A xantana produzida no meio 2 apresentou coloração levemente amarelada e uma textura mais fibrosa e diferenciada em relação às demais, o que, provavelmente, deve estar relacionado com a sua qualidade superior.

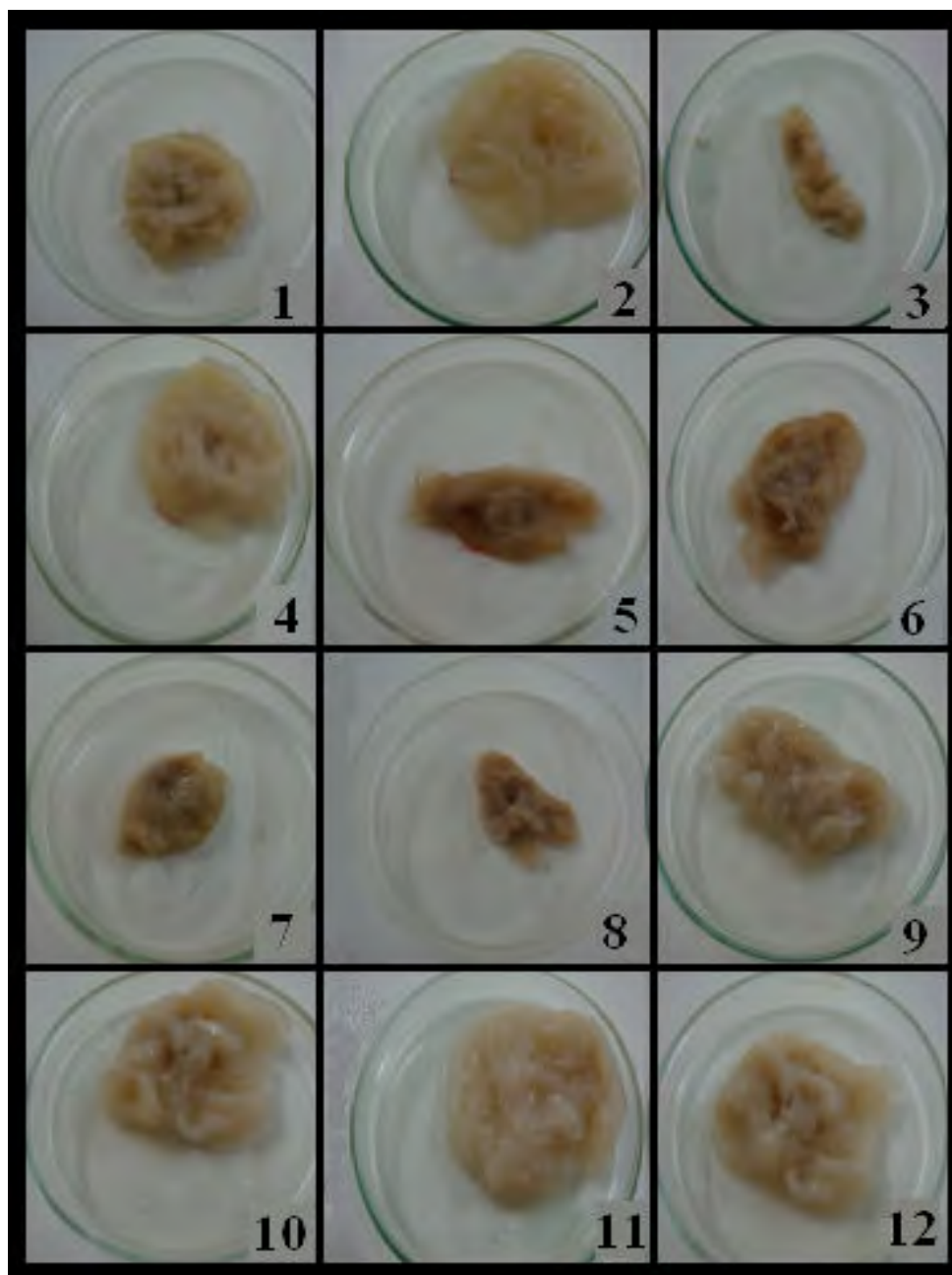


Figura 19: Aspecto das gomas úmidas obtidas nos diferentes meios de produção. * Os números correspondem aos diferentes meios de produção.

5.2 Comparação entre os resultados obtidos com a produção de xantana em incubadora orbital e fermentador

O meio 1, formulado no primeiro delineamento experimental, foi escolhido para produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* no fermentador de 7 litros devido ter proporcionado uma solução de goma xantana com expressiva viscosidade (Figura 20).

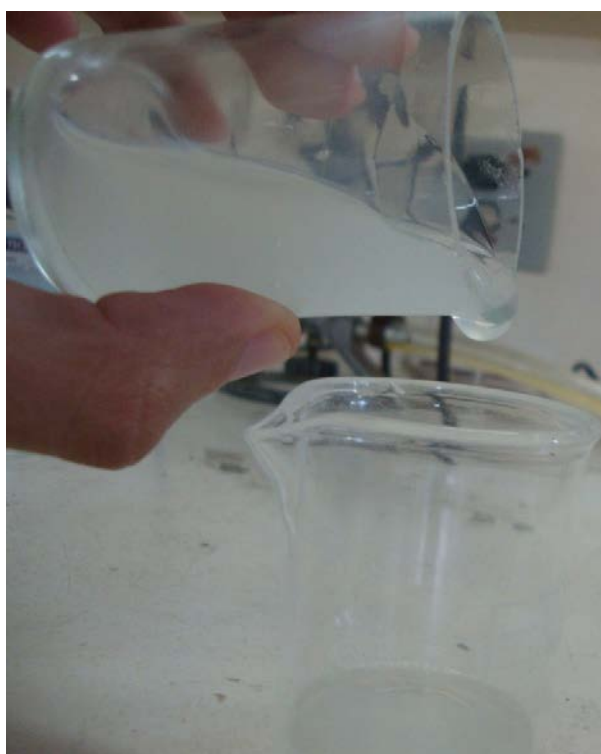


Figura 20: Aspecto viscoso da goma produzida no meio 1 por *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Pôde-se notar uma diferença no resultado final obtido quando o bioprocesso ocorreu em fermentador comparado ao realizado em incubadora orbital.

A produção de xantana realizada no fermentador no modo batelada simples proporcionou um rendimento do biopolímero de 65%, sendo esse valor considerado um bom resultado, visto que, normalmente, o rendimento do processo de produção de xantana por batelada é de 50% (FLORES CANDIA E DECKWER, 1999; VIEIRA;2008).

A produção de xantana em modo batelada alimentada foi realizada por outros autores e forneceu maior produtividade no fermentador. Werneau (1981) apresentou, rendimentos acima de 70% e concentração final de xantana de 51 g L⁻¹. Oliveira (2009) obteve rendimento de biopolímero de 88% utilizando batelada alimentada em fermentador de 7 litros e alta agitação (1000 rpm).

Apesar da quantidade de biomassa e a viscosidade da goma não terem apresentado diferenças expressivas nos dois processos, a produção de xantana em fermentador foi quase o triplo em relação àquela obtida em incubadora orbital utilizando o mesmo meio. Faria et al. (2009) realizaram um estudo comparativo entre o uso de fermentador e incubadora orbital para produção de xantana e obtiveram rendimento do biopolímero de 63 e 34%, respectivamente, nessas duas condições. Oliveira (2009) também observou que a concentração de goma e o rendimento foram superiores quando comparados as mesmas condições de fermentação em agitador orbital.

Houve também uma grande diferença da viscosidade do caldo, mas isso se deve à maior quantidade de goma presente no caldo de fermentação.

Também foi testado o meio GO em fermentador nas mesmas condições utilizadas com o meio 1. Apesar de mais goma ter sido produzida no meio citado na literatura, a qualidade da xantana foi inferior em relação ao novo meio formulado (Tabela 10).

Tabela 10: Produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* utilizando meio 1 em fermentador e incubadora orbital ou meio GO em fermentador à 30 °C e 72 h de cultivo.

	Biomassa (g/L)	Goma (g/L)	Rendimento celular (%)	Rendimento biopolímero (%)	Viscosidade aparente Caldo (cP)	Viscosidade aparente Goma (cP)
Fermentador GO	0,9 ^a	13 ^a	3,0 ^a	65,0 ^a	1218 ^a	1135 ^a
Fermentador M1	1,2 ^a	9,5 ^a	9,9 ^b	65,5 ^a	1678 ^a	2165 ^b
incubadora orbital M1	1,1 ^a	3,2 ^b	6,3 ^c	18,2 ^b	256 ^b	2489 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Na Figura 21 pode ser observado a curva de crescimento da bactéria *Xanthomonas campestris pv. campestris* e a quantidade de goma xantana formada por essa ao longo da fermentação.

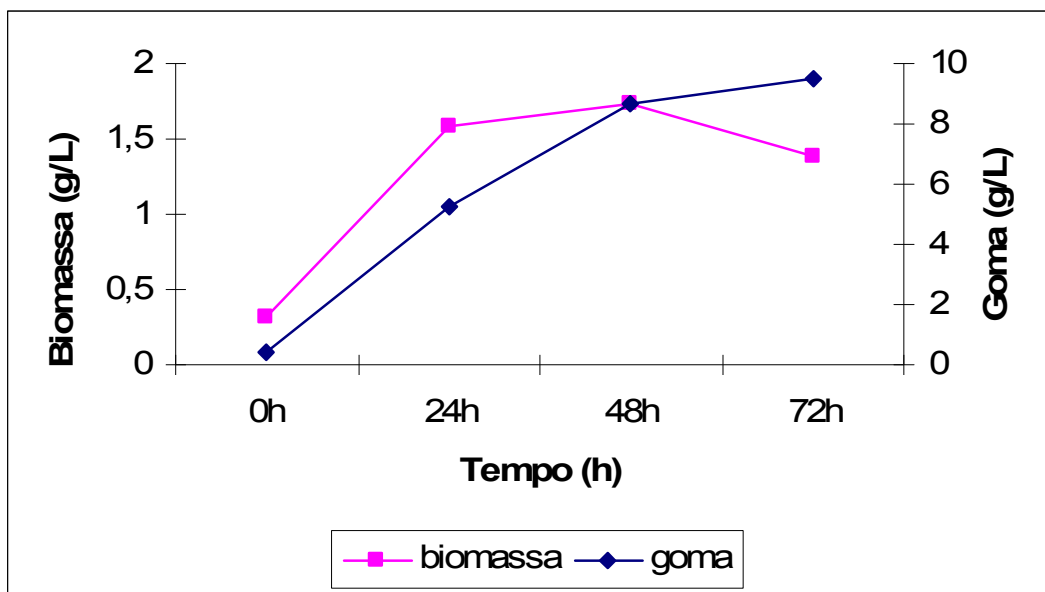


Figura 21: Biomassa e goma formadas durante o cultivo de *X. campestris pv. campestris* a 30 °C e 72 h em fermentador usando o meio 1.

No tempo inicial da fase de produção (0 horas), a pequena quantidade de biomassa e goma presentes são provenientes da fase de crescimento que serviu como inóculo.

Observa-se uma curva característica de crescimento bacteriano, ocorrendo a fase de crescimento exponencial (fase log) durante as primeiras 24 horas de fermentação. Em seguida se inicia a fase estacionária até as 48 horas e, posteriormente, a fase de declínio. Segundo Oliveira (2009), 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 produção de goma por *Xanthomonas campestris pv. campestris* no fermentador de 7 litros aumentou com o passar do tempo e, no tempo 72 horas, atingiu um valor de 9,5 g/L. Psomas et al. (2007) avaliaram a influência da temperatura, tempo e agitação sobre a produção de xantana por *X. campestris* ATCC 33913 em bioreator de 2 litros. O valor máximo de xantana que obtiveram foi de 7g/L a 35°C, 72 horas e 600 rpm.

5.3 Influência da temperatura na produção de goma xantana em fermentador

Também foi avaliada a influência da temperatura na produção da xantana em fermentador. Para essa análise, foram testadas as temperaturas de 25°C e 30°C, utilizando o meio GO.

De acordo com a Tabela 11, após a inoculação na fase de produção de goma xantana, houve um crescimento da biomassa, com valor máximo no tempo de 48 horas, tanto na fermentação ocorrida a 25°C como a 30°C.

Tabela 11: Quantidade de biomassa obtida no decorrer da fermentação.

Fermentação	Biomassa (g/L) nos diferentes tempos de fermentação			
	0h	24h	48h	72h
25°C	0,40	1,4	2,8	2,1
30°C	0,26	1,5	2,1	0,9

A biomassa obtida no final da fermentação (72h) apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) para as duas temperaturas testadas, sendo 2,3 vezes maior a 25°C do que a 30°C (Tabela 11). Shu e Yang (1990) realizaram fermentação para produção de xantana em temperaturas que variavam de 22 a 35°C e também observaram uma maior biomassa em temperaturas baixas. Quando a temperatura aumentava de 24 para 33 °C, a concentração celular diminuía. Salah et al., (2010) notaram um aumento da biomassa com aumento da fonte de nitrogênio e diminuição da temperatura. O valor máximo de biomassa obtido foi de 3,74g/L no final de 72 horas de fermentação.

A quantidade de goma obtida na fermentação a 25°C também foi maior (cerca de 18%) que a obtida a 30°C com diferença estatística significativa entre elas (Tabela 12). Gupte e Kamat (1997) testaram as temperaturas de 25°C, 32°C, 35°C e 38°C, e obtiveram 4,2, 9,0, 8,7 e 3,6 g.L⁻¹, de xantana, respectivamente. Portanto, as maiores concentrações de goma foram na temperatura de 32°C. Já Casas et al. (2000) observaram que a biomassa e a goma xantana eram máximas quando a produção ocorria a 28°C. Segundo Shu e Yang (1990), deve-se considerar que a temperatura ótima para produção de xantana depende do meio de produção e pode variar de 25 a

34°C. Oliveira (2009) verificou que 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.

Salah et al. (2010) otimizaram a produção de xantana utilizando o programa NEMRODW e obtiveram 43,35g/L de goma na temperatura de 30,1 °C. O meio de produção utilizado por esses autores continha (g/L): tamareira D-glucose,84,68; KH₂PO₄, 5; MgSO₄, 0,2; (NH₄)₂SO₄, 2,7; ácido cítrico, 2; H₃BO₃, 0,006; ZnCl₂, 0,006; FeCl₃, 0,0024 e CaCO₃, 0,02. De acordo com esses autores, a temperatura é um fator importante na fermentação de *X. campestris*, pois está associada com a ativação de enzimas que atuam no processo de polimerização da xantana.

Observa-se na Tabela 12, o aumento da quantidade de xantana com o aumento do tempo de cultivo. Psomas et al. (2007) também observaram o mesmo, no entanto, o valor máximo de xantana obtido por esses pesquisadores foi de 7g/L a 35 °C e 72 horas de fermentação.

Tabela 12: Goma xantana obtida no decorrer da fermentação.

Fermentação	Xantana (g/L)			
	0h	24h	48h	72h
25°C	0,3	5,5	10,8	15,9
30°C	2,5	3,3	6,7	13,0

Em relação à viscosidade da solução de goma xantana 1% foi observada a viscosidade 15,6% superior na temperatura de 30°C quando comparada à temperatura de 25°C (Tabela 13). Resultados diferentes foram obtidos por Oliveira (2009) que obteve maior viscosidade e quantidade de goma produzida a 25°C.

Tabela 13: Comparação entre os resultados obtidos para produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* utilizando o meio GO nas temperaturas 25 e 30 °C.

<i>Temperatura</i>	<i>Biomassa</i> (g/L)	<i>Goma</i> (g/L)	<i>Viscosidade</i> <i>Caldo (cP)</i>	<i>Viscosidade</i> <i>aparente</i> <i>goma (cP)</i>	<i>pH</i>
25 °C	2,1 ^a	15,9 ^a	1231 ^a	958 ^a	6,6 ^a
30 °C	0,9 ^b	13 ^b	1218 ^a	1135 ^a	6,7 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Considerando a viscosidade um dos parâmetros mais importantes para indicar a qualidade dos biopolímeros, a fermentação a 30°C no fermentador foi considerada a mais eficiente para a linhagem *Xanthomonas campestris pv campestris* produzir xantana utilizando o meio de produção descrito por Garcia-Ochoa et al. (1992).

5.4 Influência do modo de extração e solubilização na qualidade da xantana

Normalmente, a goma xantana é extraída acrescentando-se etanol ao caldo de fermentação de *X. campestris pv campestris* a 30 °C e 72 h de cultivo utilizando o meio 1 em incubadora com agitação orbital, e retirada deste com o auxílio de um bastão de vidro (Figura 22).



Figura 22: Caldo de fermentação e goma sendo extraída com a adição de álcool.

Nesse trabalho, foram testados outros modos de recuperação e avaliados os seus efeitos sobre a viscosidade e quantidade de goma produzida.

Observa-se na Tabela 14 que uma quantidade maior de biopolímero pode ser obtida com a adição de NaCl (0,01%) no álcool (9,1g/L) ou com a sua re-precipitação na presença desse sal (9,4g/L) em relação ao método que utiliza apenas álcool (8,0g/L). Houve diferença significativa entre o método convencional e os demais ($p < 0,05$), porém não houve diferença significativa entre os dois tratamentos com sal ($p > 0,05\%$). Um aumento de 17% e 13% foi alcançado em relação ao método convencional quando a goma foi recuperada pelos métodos de re-precipitação e adição de sal ao álcool, respectivamente.

Outros trabalhos analisaram o efeito da adição de sais no processo de extração da goma e obtiveram resultados semelhantes. Borges et al. (2005) adicionaram 2% de NaCl e KCl em álcool e obtiveram um aumento respectivamente de 10,45% e 9,15% da quantidade de goma produzida em relação a goma sem adição de sais.

Oliveira (2009), também observou um aumento na quantidade de goma com a adição 0,1% de KCl e 0,05% de NaCl no álcool diminuindo 14% e 10% respectivamente a quantidade de solvente sem prejuízo na concentração de goma. No presente trabalho,

a precipitação de goma xantana utilizando NaCl em concentração menor (0,01%), consumiu uma quantidade 13% menor de etanol em relação à precipitação no modo convencional.

Apesar de mais goma ser precipitada na presença do NaCl, principalmente com a dupla precipitação, a análise da viscosidade da goma como parâmetro para avaliação da qualidade desta mostrou que o método convencional ainda é o mais eficiente. A adição de sais no álcool usado para recuperação da goma interferiu negativamente na qualidade desta.

Foi testada também a adição de 0,1% dos sais monovalentes NaCl e KCl após a recuperação da goma. No entanto, não houve diferença significativa entre esses sais, pois a viscosidade da goma permaneceu em torno de 2470 cP, menor que a goma sem adição de sal e recuperada de modo convencional (2780 cP). Segundo Garcia-Ochoa e colaboradores (2000), quando colocada em baixas concentrações, a goma xantana tende a apresentar uma leve queda na viscosidade quando há a adição de pequenas quantidades de sais na solução. Talvez o acréscimo desse sal sobre uma solução de xantana em concentração maior que a testada (1%) favorecesse a viscosidade. De acordo com a literatura, há influência na viscosidade da goma xantana quando na presença de sais, entretanto esses efeitos tem sido contraditórios, havendo diminuição ou aumento na viscosidade.

Através dessa análise, constatou-se que a adição de sais na recuperação da goma aumenta a quantidade de goma recuperada, mas diminui sua viscosidade. Já a adição de sais durante a solubilização da goma não provoca alterações significativas na viscosidade da mesma.

Tabela 14: Quantidade e viscosidade de xantana (solução 1%) extraída de diferentes formas e solubilizada em sais.

	Xantana (g/L)		Viscosidade aparente (cP)	
	M	F*	M	F*
	Modo convencional	8.0 ^a	31.099**	2780 ^a
Adição de NaCl com uma precipitação	9.1 ^b		2094 ^c	
Adição de NaCl com duas precipitações	9.4 ^b		1805 ^b	
Solubilização em KCl	8.0 ^a		2472 ^a	
Solubilização em NaCl	8.0 ^a		2475 ^a	

*Valor obtido pela análise de variância. F tabelado = 75.219 ao nível de 95% de confiança. ** significativo ao nível de 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Extração com formaldeído

Em outro momento da pesquisa foi adicionado formaldeído em três diferentes concentrações no caldo fermentativo e avaliada sua influência sobre a goma precipitada.

Maior quantidade de goma foi extraída do caldo de fermentação quando este continha formaldeído comparado ao valor obtido em caldo não acrescido desse composto (Figura 23).

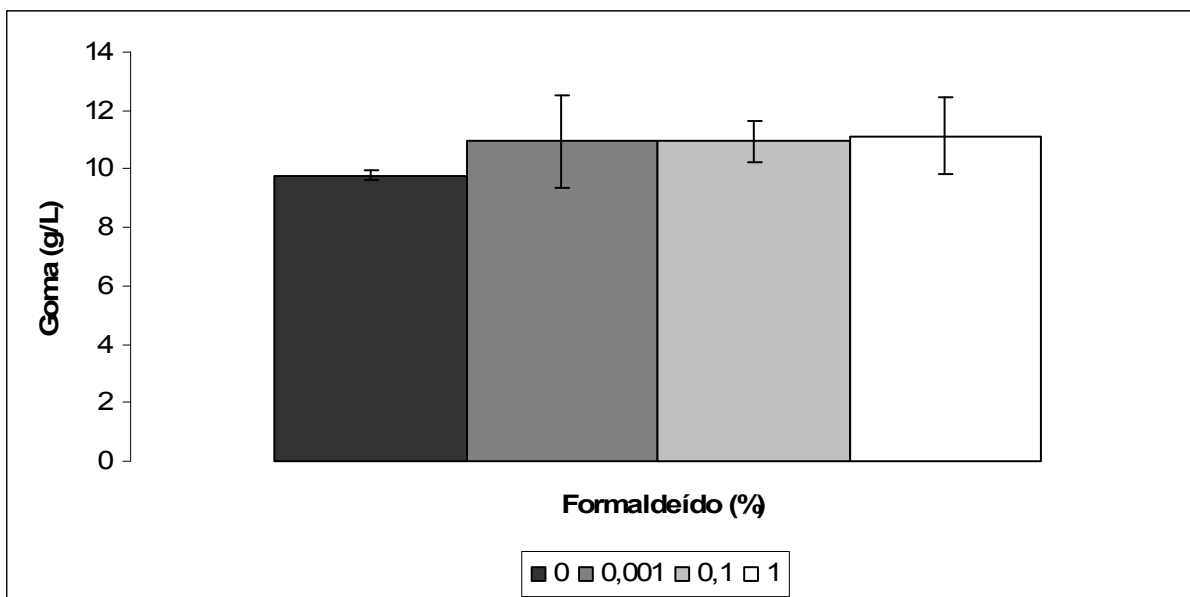


Figura 23: Influência da presença de formaldeído em diferentes concentrações no caldo de fermentação sobre a quantidade de xantana recuperada.

Na literatura há informação de que a goma xantana tratada com formaldeído tem sua viscosidade aumentada (MAUGERI, 2001). No entanto, no presente trabalho verificou-se que a utilização desse componente no processo de recuperação da goma influencia negativamente em sua qualidade.

Provavelmente, o formaldeído por ser um composto altamente reativo, ocasionou a precipitação não só da goma como também de outras impurezas presente no caldo que ocasionaram o abaixamento da viscosidade da solução de goma xantana 1% diminuindo sua qualidade.

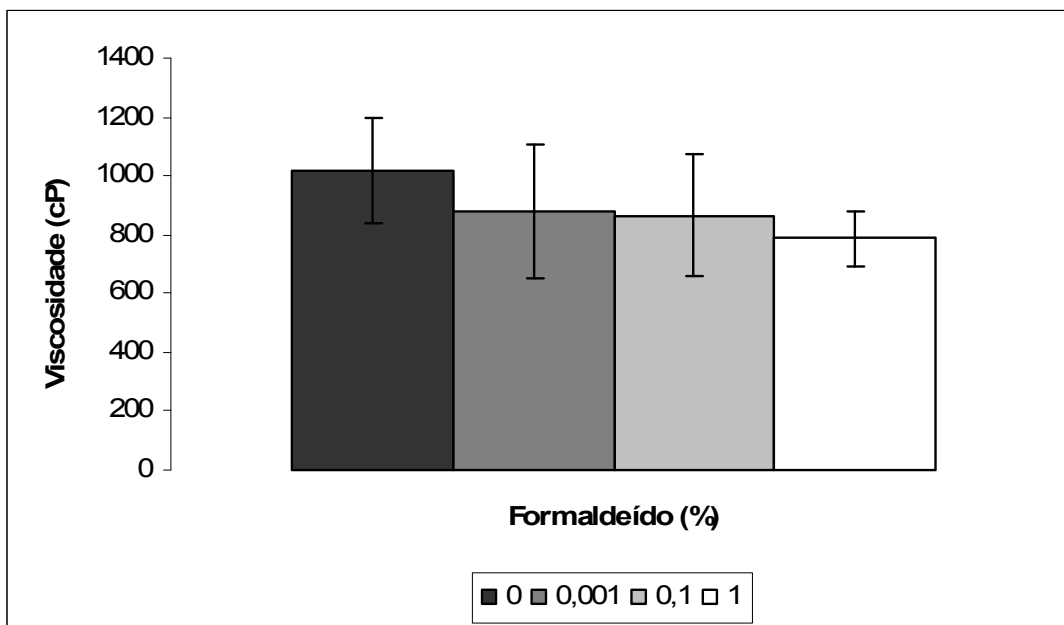


Figura 24: Influência do uso de formaldeído no processo de extração da xantana sobre a sua viscosidade aparente.

5.5 Composição química de xantana comercial e produzida em meios de produção diferentes

Para análise da composição química da goma xantana, foram utilizadas as produzidas no meio descrito por Garcia-Ochoa et al (GO), no meio formulado no primeiro delineamento (M 1) e a goma comercial (C) tipo Kelzan ASX—T produzida pela Kelco (lote: 6F6758A).

Todas as gomas foram dialisadas e liofilizadas (Figura 25).



Figura 25: Goma xantana após diálise e liofilização.

5.5.1 Quantificação de açúcar total e monossacarídeos neutros

A concentração de açúcar total, após diálise, presente nas gomas M1, GO e C foi de 95%, 85% e 79%, respectivamente. Esses resultados indicam que a maior parte dos açúcares constituintes destas gomas estava na forma de polissacarídeo, destacando-se a goma obtida no novo meio.

Apenas os monossacarídeos neutros foram identificados nas condições de hidrólise ácida utilizadas. As gomas produzidas nos dois diferentes meios e a comercial não apresentaram nenhuma diferença quanto à composição monossacarídica (Figura 26). Ambas as gomas apresentaram 59% glucose e 41% de manose em relação aos monossacarídeos neutros. Aranda-Selverio (2009) também observou que biopolímeros produzidos pelo mesmo micro-organismo com diferenças nas condições de cultivos, apresentaram constituição semelhante na cadeia principal e variações apenas no grau de ramificação.

Segundo Moreira et al. (2001), polímeros com maior conteúdo de manose possuem maior valor de viscosidade e de acordo com Quinn (1999) a eliminação dos terminais de manose da xantana diminui a sua capacidade de espessar. Isso se deve ao fato de estarem ligados, nesse monossacarídeo, os radicais acetil e piruvil.

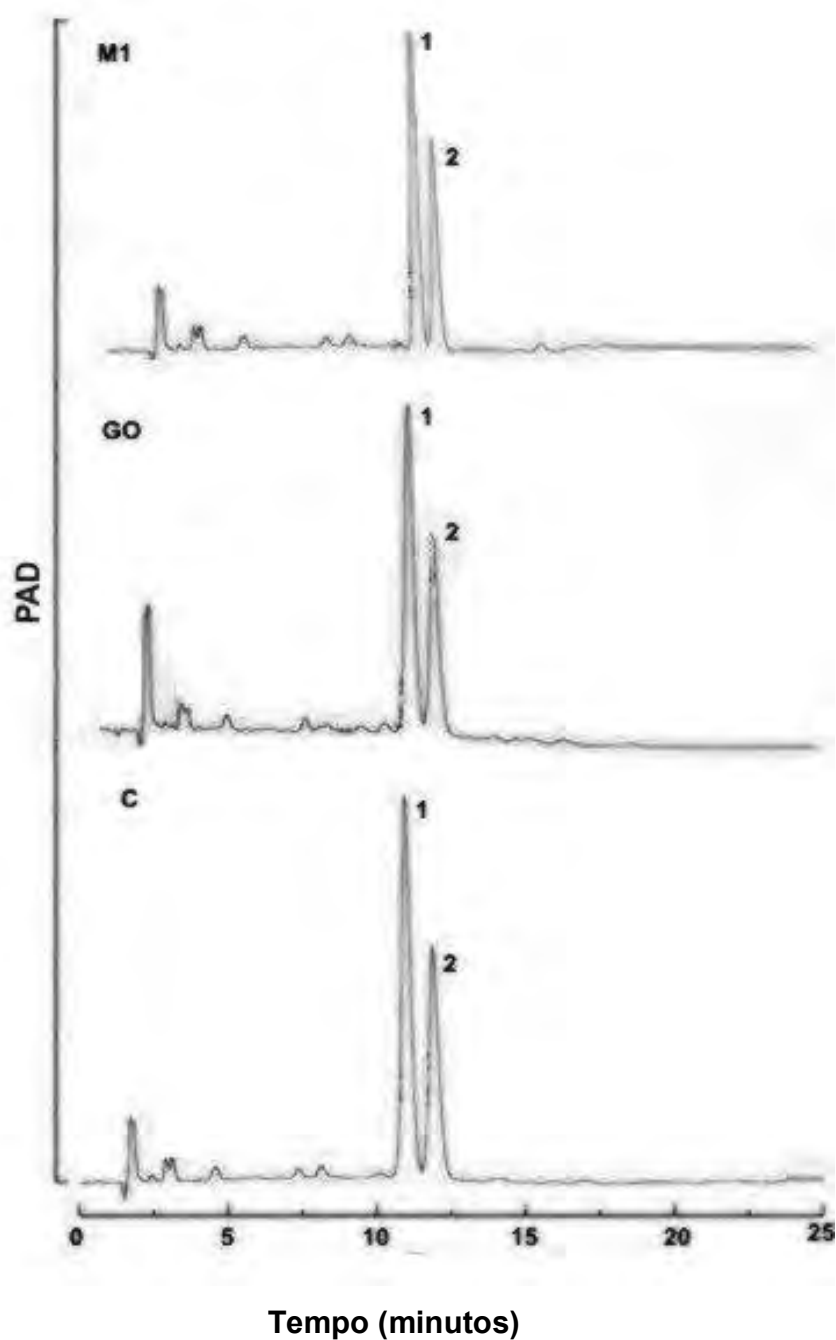


Figura 26: Análise dos monossacarídeos obtidos por hidrólise ácida das gomas produzidas nos meios M1, GO e C por HPAEC/PAD. Padrões de açúcares neutros (Pd), com tempos de retenção em minutos: fucose (4.67); arabinose (7.66) ramnose (8.01); galactose (10.48); glucose (11.47); manose (12.54). 1: glucose 2: manose. Condições da corrida: isocrática (NaOH 14 mM, 25 minutos). Coluna: CarboPac PA1. Condiçõesde hidrólise: TFA 2 M, 2 horas, 120 °C. Quantidade de material hidrolisado: 50 µg.

5.5.2 Quantificação do ácido glicurônico e dos radicais piruvato e acetato

O açúcar carregado negativamente, ácido glicurônico, foi mensurado indiretamente pelo teor de ácido urônico presente na xantana. As gomas diferiram em relação à quantidade desse monossacarídeo, sendo produzida goma com menos ácido urônico no meio M1 (8,2%) e mais no meio GO (10,4%). Aranda-Selverio et al. (2009) analisando quatro exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium* observaram que apresentava-se menos viscoso aquele que continha maior concentração de ácido glicurônico. O mesmo foi observado nesse trabalho, quando comparado as duas gomas produzidas por *X. campestris pv. campestris*. Esse monossacarídeo, juntamente com o piruvil, conferem repulsão eletrostática na cadeia lateral e favorecem a conformação desordenada da estrutura da xantana. Com a cadeia mais distendida, a solubilidade é favorecida e a xantana torna-se menos viscosa, pois a densidade de cargas modifica as suas propriedades macromoleculares em solução (CHEETHAM; MASHIMBA, 1991; MILAS, 1991; RINAUDO, 1992).

Em relação ao substituinte piruvil, pode se observar na Tabela 15 que todas as gomas apresentaram valores superiores a 4%. Segundo Sandford et al. (1977), concentrações acima de 4% proporcionam melhor viscosidade às soluções de xantana. Observa-se também uma diferença significativa na concentração deste radical nas gomas produzidas nos meios M1 (4,9%), GO (9,1%) e na comercial (7,5%). Considerando que a única diferença na produção das gomas M1 e GO foram os nutrientes utilizados nos meios de produção, pôde ser avaliada a influência desses sobre sua estrutura. Observou-se a formação de goma (M1) com menor taxa de piruvato (4,9%), na ausência de fonte direta de nitrogênio, comparada à goma GO (9,1%) produzida no meio que continha 0,114% de $\text{NH}_4 \text{NO}_3$. Alguns autores também obtiveram resultados semelhantes. Tait et al. (1986) obtiveram goma com menos piruvil (2,2%) em meio no qual a fonte de nitrogênio havia sido exaurida. Kennedy et al. (1982) também verificaram uma correlação entre nitrogênio e piruvato. Segundo esses autores, na presença do nutriente ocorre um aumento do substituinte na molécula de xantana. Contrariamente, Flores Candia e Deckwer (1999) obtiveram maior taxa de piruvato

(7,2%) quando utilizaram menor concentração de fonte de nitrogênio (0,6% NH_4Cl). Portanto, não se observa na literatura um consenso e uma relação direta entre as concentrações de nitrogênio e piruvato.

O nutriente citrato também exerceu certa influência sobre o conteúdo de radicais piruvil presente na molécula de xantana. No meio GO, que continha maior concentração de citrato (0,21%), formou-se goma com maior teor de ácido pirúvico. Segundo Jana e Ghosh (1999), o ácido cítrico é um nutriente que aumenta o conteúdo de ácido pirúvico na molécula de xantana. Talvez por que a bactéria é aeróbia, e se tiver oferta de ácido cítrico para o ciclo de Krebs pode desviar parte do piruvato, que iria para o ciclo de Krebs, para a biossíntese da goma.

A relação entre a qualidade da xantana com o teor de piruvil que ela apresenta foi avaliada comparando-se as viscosidades das gomas M1 e GO, e verificou-se que goma com menor concentração desse substituinte (goma M1) apresentou-se mais viscosa (Tabela 15). Resultados semelhantes foram obtidos por Silveira et al. (2008). No entanto, Rodríguez e Aguilar (1997) observaram que as gomas que apresentavam menor conteúdo de piruvil apresentava maior viscosidade da goma e caldo.

A viscosidade da goma comercial foi superior às goma M1 e GO, no entanto, os resultados apresentados (Tabela 15) impedem uma análise comparativa conclusiva, uma vez que, provavelmente, ela pode ter passado por tratamentos especiais que não foram realizados nas gomas produzidas em nosso laboratório.

Todas as amostras analisadas apresentaram conteúdo de acetato dentro da faixa (1,9% a 6%) indicada por García-Ochoa et al. (2000). Quantidades bem próximas desse substituinte foram obtidas na goma M1 e comercial (aproximadamente 4,5%). Já na goma produzida em meio GO, menos viscosa, foi encontrado apenas 2,5% (Tabela 15). Portanto, assim como o observado por Silveira et al (2008), polímeros com maior teor de acetato apresentaram as maiores viscosidades.

Tabela 15: Valores médios do acetato e piruvato e viscosidade da goma comercial e produzida por *X. campestris pv.campestris* nos meios M1 e GO.

Goma	Acetato (%)		Piruvato (%)		Viscosidade aparente (cP)	
	M	F*	M	F*	M	F*
M1	4,7 ^b ± 0,30	48.503	4,9 ^b ± 0,18	125.38	139 ^b ± 1,04	12.076
GO	2,5 ^a ± 0,25		9,1 ^a ± 0,35		81 ^a ± 0,30	
C	4,4 ^b ± 0,47		7,5 ^c ± 0,17		291 ^c ± 3,00	

.Obs: solução de goma 0,3%, 10 rpm.

Embora tenha sido usada a goma xantana comercial como parâmetro de comparação para as gomas produzidas nesse trabalho, algumas considerações devem ser feitas. Sabe-se que tratamentos físicos, químicos ou biológicos durante a separação do biopolímero do caldo fermentativo podem ser utilizados a fim de se obter características especiais no produto final. Algumas formulações de goma xantana comercial são acrescidas de sais de potássio, de cálcio ou sódio na forma de cloretos, para facilitar a solubilização, aumentar a viscosidade e manter a estabilidade (MORRIS, 1996). Flores Candia e Deckwer (1999) observaram que quando o grau de substituição de piruvil é alto, as interações de polímero-polímero se tornam mais significativas na presença de KCl, o qual faz com que a repulsão eletrostática entre cadeias seja minimizada por aumento da força iônica.

Considerando que a goma comercial testada apresentou alto teor de piruvil, diferentemente da goma M1 (Tabela 15), provavelmente a adição de algum tipo de sal tenha favorecido a sua conformação e, conseqüentemente, a sua viscosidade.

Com a quantificação da composição química das xantanas analisadas, pode-se inferir que tanto o piruvil quanto o monossacarídeo de caráter aniônico (ácido glicurônico), em altas concentrações, interferem na estrutura conformacional da goma por repulsão eletrostática causando diminuição da sua viscosidade. Enquanto o acetato, responsável pela estabilidade do biopolímero (SHATWELL et al. 1990), parece apresentar um efeito positivo sobre sua viscosidade.

5.6 Análise da homogeneidade da xantana

Na cromatografia de filtração em gel a alta pressão, a presença de um único pico e simétrico é indicativo de material puro ou homogêneo e pouco polidisperso. Portanto, pode-se inferir que tanto a goma comercial quanto as gomas produzidas por *Xanthomonas campestris pv. campestris* nos dois diferentes meios estavam puras (Figura 27).

Nota-se também uma pequena polidispersividade nas amostras. Este fato ocorre devido à biossíntese dos polissacarídeos ocorrer com a disposição de monossacarídeos aleatoriamente, sem um molde prévio, gerando moléculas semelhantes com diferentes massas moleculares (CORRADI da SILVA et al., 2006).

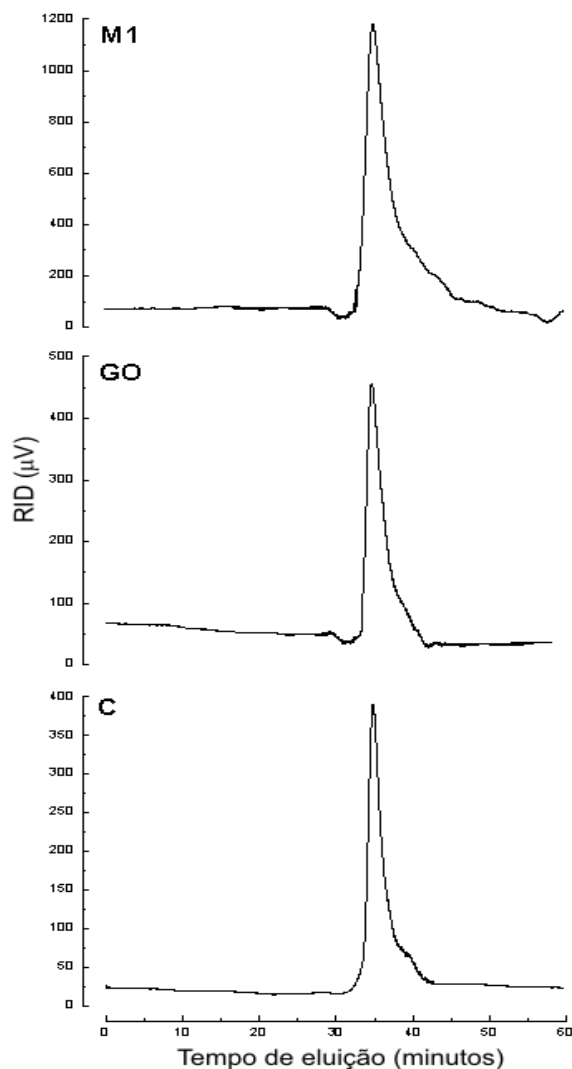


Figura 27: Perfil de eluição para a xantana produzida nos meios M1 e GO e xantana comercial (C) por HPSEC equipado com um detector de índice de refração diferencial. Colunas de gel permeação dispostas em série, com limites de exclusão de 1.106, 4.105, 8.104 e 5.103. Total de EPS aplicado: 200 µg; fluxo de 0,6 mL/min. Eluente: NaNO₃ 0,1M contendo azida sódica 0,03%, pressão de 1422 Psi a 37 °C.

5.7 Massa molecular da xantana comercial e produzida em diferentes meios de produção

As gomas produzidas por *X. campestris pv. campestris* apresentaram valores de massa molecular na ordem de 10^5 e 10^6 g/mol (Tabela 16), que são próximos aos obtidos por outros autores (PAPAGIANNI et al., 2000; PSOMAS et al., 2007).

Tabela 16: Valores médios das massas moleculares e viscosidade da xantana produzidas por *Xanthomonas campestris pv. campestris* nos meios M1, GO e da goma comercial.

Xantana	Massa Molecular (g/mol)		Viscosidade aparente (cP)	
	M	F*	M	F*
M1	$1,17 \times 10^6$ ^b	147,05	$139^b \pm 1,04$	12.076
GO	$1,49 \times 10^5$ ^a		$81^a \pm 0,30$	
C	$1,71^b \times 10^6$ ^c		$291^c \pm 3,00$	

*Valor obtido pela análise de variância. F tabelado = 2,62 ao nível de 95% de confiança. ** significativo ao nível de 5%. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fica evidente, como mostrado na Figura 28, que a massa molecular da xantana pode ser utilizada como um indicador de sua qualidade, pois se verifica uma relação direta entre viscosidade e massa molecular das xantanas estudadas. A goma comercial foi a de maior viscosidade (291cP) e massa molecular ($1,71 \times 10^6$ g/mol). Na comparação entre as gomas produzidas no meio proposto (M1) e no citado na literatura (GO), xantana com massa quase 10 vezes maior e 72% mais viscosa foi obtida utilizando o novo meio (Tabela 16).

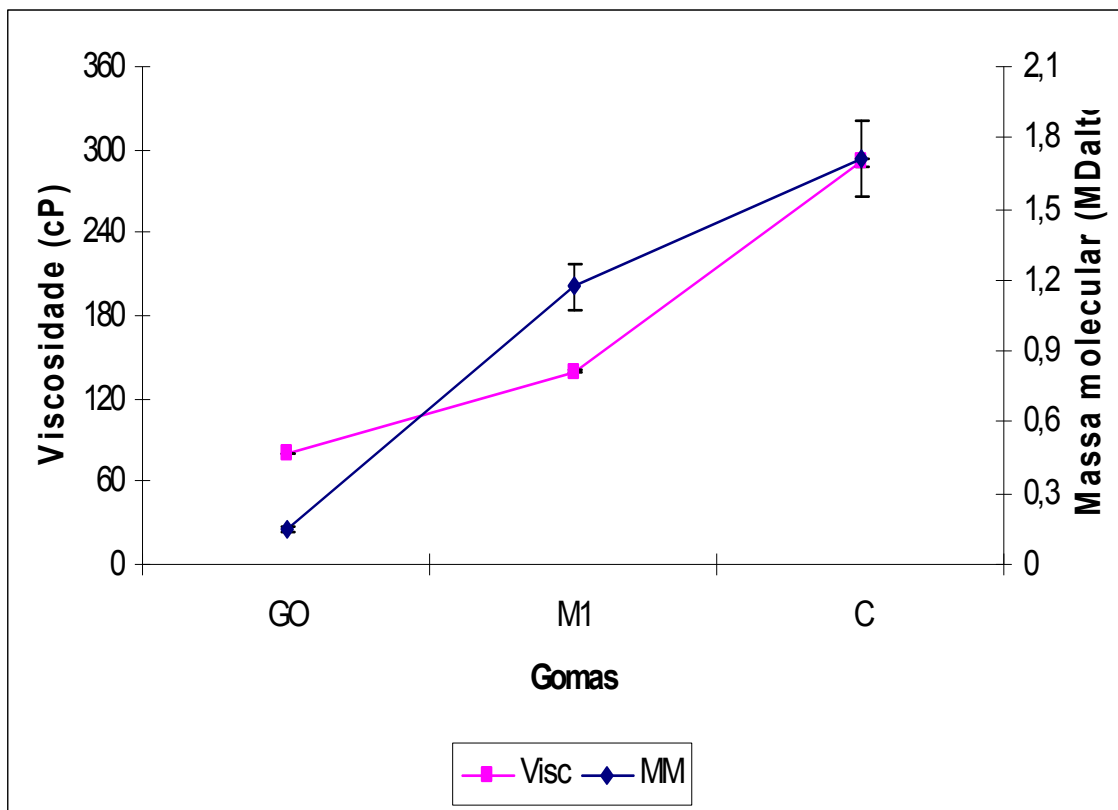


Figura 28: Viscosidade aparente (Visc) e massa molecular (MM) das gomas produzidas nos meios GO e M1 e da goma comercial.

A ausência do nutriente nitrogênio parece ter influenciado também nesse parâmetro, uma vez que o meio M1, isento dessa fonte, favoreceu a formação de goma com maior massa molecular. Flores Candia e Deckwer (1999) estudando a influência do nitrogênio nas propriedades reológicas da xantana observaram que, com menores concentrações de nitrogênio, goma de maior massa molecular e mais viscosa é formada. O valor máximo (7×10^6 g/mol) de massa molecular de xantana obtido por esses autores, ocorreu em meio contendo uma das menores concentrações (1g/L) de NH_4Cl .

Através do estudo realizado, pôde-se constatar, portanto, que gomas com massa molecular, viscosidade e composição química diferentes são produzidas por *Xanthomonas campestris pv. campestris*, se forem fornecidos nutrientes diferentes para essa bactéria.

6. CONCLUSÕES

- O meio descrito por Garcia-Ochoa e colaboradores (1992) proporciona maior rendimento e viscosidade da goma que o meio descrito por Souw e Demain (1979) nas condições testadas para *X. campestris pv campestris*. Entretanto o novo meio estudado e proposto neste trabalho possibilitou a produção de uma goma com maior massa molecular e mais viscosa do que aquela obtida com o meio desenvolvido por Garcia-Ochoa e cols. Gomas produzidas por *Xanthomonas campestris pv. campestris* em diferentes meios apresentam concentrações diferentes dos radicais acetil e piruvil e o primeiro interfere positivamente na sua massa molecular e qualidade.
- O nitrogênio é importante para produção de goma xantana, mas sua ausência ou concentrações mínimas devem ser utilizadas para a formação de goma mais viscosa.
 - A temperatura de 25°C favorece o crescimento celular e a maior produção de goma, enquanto a de 30°C proporciona a obtenção de xantana com qualidade superior para a linhagem estudada.
- A extração de goma utilizando formaldeído ou os sais NaCl e KCl é maior, porém a viscosidade desta é prejudicada. Já a adição de sais na solubilização da goma com menor teor de radical piruvil não provoca alterações significativas na viscosidade da mesma.
- A substituição da incubadora orbital pelo fermentador é fundamental para o aumento da produtividade e rendimento do biopolímero. A produção de xantana por *Xanthomonas campestris pv. campestris* com expressiva viscosidade e maior rendimento ocorre em meio formulado, denominado M1, utilizando bioreator, a 30°C e é extraída com adição apenas de etanol sobre o caldo de fermentação (3:1).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C.T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, p. 123-125, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. Publicação eletrônica (mensagem pessoal). Mensagem recebida por <cleber@abia.org.br> em 15 de abr. 2004.

AZUAJE , R.A. ; SÁNCHEZ, J.A. Produccion de xantano por *Xanthomonas campestris* en un medio de cultivo no convencional. **Acta Científica Venezolana**. v.50, p.201-209, 1999.

BILANOVIC, D.; SHELEF, G.; GREEN, M. Xanthan fermentation of citrus waste. **Bioresource Technology**, v. 48, n. 2, p. 169 -172, 1994.

BORGES, C.D.; BASTOS, C. P.; TEIXEIRA, A. M.; VENDRUSCOLO, C.T. Influência do Tratamento Térmico e da Adição de Sais na Recuperação do Biopolímero Xantana. In: **CIC - Congresso de Iniciação Científica e VII Encontro de Pós-Graduação**, Pelotas, 2005.

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

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

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: STEINBÜCHEL, A.;VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S. **Biopolymers**. v. 5. Weinheim: Weley-VCH. p.259-291, 2002.

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

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

CADMUS, M. C.; ROGOVIN, S. P.; BURTON, K. A; PITTSLEY, J.E; KNUTSON, C. A;JEANES, A. 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.

CADMUS, M. C. , KNUTSON, C. A. , LAGODA, A . Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p. 1003-1014, 1978.

CARIGNATTO, C. R. R.; OLIVEIRA, K. S. M; DE LIMA, V. M. G.; OLIVA-NETO, P. New culture medium to xanthan production by *Xanthomonas campestris pv. campestris*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 283-288, 2011.

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

CHEETHAM, N. W. N.; MASHIMBA, E. N. M. Conformational aspects of xanthan–galactomannan gelatin: Further evidence from optical-rotation studies. **Carbohydrate Polymers**, 14, 17–27, 1991.

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

CORRADI DA SILVA, M.L.; MARTINEZ, P.F.; IZELI, N.L.; SILVA, I.R.; VASCONCELOS, A.F.D.; CARDOSO, M.S.; STELUTTI, R.M.; GIESE, E.C.; BARBOSA, A.M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, Araraquara, v.29, p.85-92, 2006.

CRUZ, C. H. G. Contribuição ao estudo dos fatores envolvidos na produção da goma xantana por *Xanthomonas manihotis*. **Dissertação de Mestrado**, UNICAMP, 1983.

DAVIDSON I.W. Production of polysaccharide by *Xanthomonas campestris* in continuous culture. **FEMS Microbiology Letters**, v.3, p.347-349, 1978.

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.

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 goma xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 15-28, 2004

DRUZIAN, J. I.; PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p.26-31, 2007.

DUBOIS, N.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Lisboa, v.28, p.350-356, 1956.

EVANS, C.G.T, YEO, R.G., ELLWOOD, D.C. Continuous culture studies on the production of extracellular polysaccharides. p.51-64 In: Berkely, R.C.W, Gooday, G.W., e Ellwood, D.C. (ed.) **Microbial polysaccharides and polysaccharases**, 1979.

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

FARIA, S.; VIEIRA, P.A.; RESENDE, M.M.; FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. A Comparison between shaker and bioreactor performance based on the kinetic parameters of xanthan gum production **Applied Biochemistry Biotechnology**, 156:475–488, 2009.

FILISSETTI-COZZI, T. M. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, Lisboa, v. 197, p. 157-162, 1991.

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

FLORES, F.; TORRES, L.G; GALINDO, E. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *Xanthomonas campestris* on the production and quality of xanthan gum. **Journal of Biotechnology**. v. 34, p.165-173, 1994.

FUNAHASHI H.; MACHARA, M.; TAGUSHI, H.; YOSHIDA, T. Effect of glucose concentration on xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. **Journal Chemical Engineering Japanese**, v. 65, p. 603-606, 1987.

GALINDO, E.; SALCEDO,C.; FLORES, M; RAMIREZ,E. Improved shake-flask test for the screening of xanthan-producing microorganisms. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 9, p.122– 124, 1993.

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

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

GREEN, M.; SHELEF, G.; BILANOVIC, D. The effect of various citrus waste fractions on xanthan fermentation. **The Chemical Engineering Journal**, v. 56, n. 1, p. B37-B41,1994.

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

HAYWARD, A.C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E. L. ***Xanthomonas***. London: Chapman & Hall, 1993.

HESTRIN, S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application. **Journal of Biological Chemistry**, v. 180, p249-261, 1949.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. London: Williams & Williams, 9^o ed., 1993. 787p.

HOLZWARTH, G., OGLETREE, J. Pyruvate-free xanthan. **Carbohydrate Research**, v.76, p.277-280, 1979.

JANA, A. K.; GHOSH, P. Xanthan biosynthesis in continuous culture: citric acid as an energy source. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, p. 485-491, 1995.

JANA, A. K.; GHOSH, P. Effect of citric acid on the biosynthesis and composition of xanthan. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 45, p.115–120, 1999.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the exocellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. 1, p. 275-285, 1975.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molases. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 249-256, 2003.

KANG F.S.; PETTIT, D.J.; Xanthan, gellan, welan, and rhaman. In: Whistler RL, BeMiller J.N, editors. **Industrial Gums**. Polysaccharides and their derivatives. 3th ed. Academic Press, San Diego, USA, pp341-99, 1993.

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, p.39-43, 1982.

KENNEDY, J.F.; BRADSHAW, I.J. Production, properties and applications of xanthan. **Progress Industrial Microbiology**, v.19, p.319-71, 1984.

KIOSSEOGLU, A.; PAPALAMPROU, E.; MAKRI, E.; DOXASTAKIS, G.; KIOSSEOGLU, V. Functionality of medium molecular weight xanthan gum produced by *X. campestris* atcc1395 in batch culture. **Food Research International**, v. 36, p.425-430, 2003.

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

LAWSON, C. J.; SUTHERLAND I.W. In: ROSE, A.H. **Economic Microbiology**. New York and London: Academic Press. v. 2, p. 327-392, 1978.

LETISSE, F.; CHEVALLEREAU, P.; LINDLEY, J. L. S. Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 417–422, 2001.

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

LINDEN, G.; LORIENT, D. **Bioquímica agroindustrial – Revalorización alimentaria de la producción agrícola**. Zaragoza: Acribia, 1996. 428p.

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

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

MAUGERI, F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo:Edgard Blücher, v. 3, p.125-150, 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**, p.9-29, 2000.

MILAS, M. ; RINAUDO, M., Conformational investigation of the bacterial polysaccharide xathan, **Carbohydrate Research** , v. 76, p.189-196, 1979.

MILAS, M.; RINAUDO, M.; TINLAND, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weigth and shear rate of xanthan solutions. **Polymer Bulletin**, v.14, p.157-164, 1985.

MILAS, M. Em *Polieletrólitos*; De Goote, R. A. M. C.; Curvelo, A. A. S., eds.; Ed. USP: São Carlos, p. 84, 1991.

MOORHOUSE, M. D.; REES, G.; YOUNG, M. D.; WALKINSHAW; DARKE, A. Xanthan gum–molecular conformation and interactions. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. ACS, Washington, DC, p. 90. 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. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH control. **Biotechnology and Bioengineering**, v.13, p.381-391, 1971.

MORAINE, R.A.; Rogovin, P. Kinetics of the Xanthan Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.15, 225-237, 1973

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4-6, p. 469-474, 2001.

MORENO, J.; LÓPEZ, M.J.; VARGAS-GARCIA, C.; VÁZQUEZ, R. Use of agricultural wastes for xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4-5, p. 242-246, 1998.

MORRIS, E. R. Molecular origin of xanthan solution properties. In: SANDFORD, P.A.; LASKIN, A. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington: American Chemical Society, p. 83-89, 1977.

MORRIS, E. R. Rheology of xanthan: Suspension of particles and stabilization of emulsions. **Foods and Food Ingredients**, v.167, p.31-36, 1996.

NELSON, M.A. Photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v.153, p. 379-380, 1944.

NERY, T.B.R; BRANDÃO, L.V.; ESPERIDIÃO, M.C.A; DRUZIAN, J.I. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p.1937-1941, 2008.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para produção de goma xantana por *X. campestris* C7L1. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 82-85, 2001.

OLIVA NETO, P.; CARIGNATTO, C.R.R.; LIMA, V.M.G., CARVALHO, A.F.A. Produção biotecnológica do biopolímero goma xantana. **Microbiologia in Foco**, n.15, p.14-22, 2011.

OLIVEIRA, K. S. M. Diferentes parâmetros de produção e extração de goma xantana pela fermentação de *Xanthomonas campestris pv campestris*, **Dissertação**, UNESP – Rio Claro, 2009.

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

PACE, G.W. RIGHELATO, R.C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances Biochemical Engineering**, v.15, p.41-70, 1980.

PACE, G.W. In: KRISTIANSEN, B., BU'LOCK, J. **Basic Biotechnology**. London: Academic Press. p. 449-462, 1987.

PALANIRAJ, A.; VIJAYAKUMAR, J. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v.106, p.1-12, 2011.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOUKYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v.37, p73-80, 2001.

PETERS, H. U.; HERBS, H.; HESSELINK, P.; LÜNSDORF, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Bioengineering**. v.34, p.1393-1397, 1989.

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

PIELKEN, P. et al. Effect of methionine formation by *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiology Letters** , v.44, n.1, p.27-31, 1987.

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

QADEER, M.A.; BAIG, S. Effect of nitrogen sources on the production of exocellular polysaccharide by of *Xanthomonas campestris* NRRLB-1459. **Science International (Lahore)**, v.14, p.262– 4, 1989.

QUINLAN, A.V. Kinetics of secondary metabolite synthesis in batch culture when two different substrates limit cell growth and metabolite production: xanthan synthesis by *Xanthomonas campestris*. **Biochemistry Engineering** v. 469, p.259-269, 1986.

QUINN, F. X. In: **Concise Polymeric Materials Encyclopedia**; Salamone, J. C., eds: Boca Raton, p.1652-1653, 1999.

RAJESHWARI, K.V.; PRAKASH, G.; GHOSH, P. Improved process for xanthan production using modified media and intermittent feeding strategy. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.173-175, 1995.

RINAUDO, M. Em *The relation between the chemical structure of polysaccharides and their physical properties*; Philips, G. O.; Wedlack, D. J.; Willians, P. A., eds.; Gums Stabilizers Food Industries. p. 51-61,1992.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos**. 2 ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009.

RODRÍGUEZ, H.; AGUILAR, L. Detection of *Xanthomonas campestris* mutants with increased xanthan production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p. 232–234, 1997.

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

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n.2, p. 197-207, 2006.

SALAH, R.B.; CHAARI, K.; BESBES, S. KTARI, N.; BLECKER, C.; DEROANNE, C.; ATTIA, H. Optimisation of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera L.*) juice by-products using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.121, p.627-633, 2010.

SANDEFORD, P. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; WATSON, P. R.; CADMUS, M. C.; JEANES, A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B – 1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: SANDEFORD, P.A.; LASKIN, A. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington: American Chemical Society, 1977. p. 192–210.

SCHAAD, N. W.; ALVAREZ, A. *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cause of black rot of crucifers In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 1-120.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. 1ªed, v. 2 São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2001. p. 5 -18.

SHATWELL, K. P.; SUTHERLAND, I. W.; DEA, I. C.M.; ROSS-MURPHY, S. B. The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-Coil transition behaviour of xanthan. **Carbohydrate Research.**, v.206, p.87-103, 1990

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

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

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**, UNESP, 2007.

SILVEIRA, C. F.; PREICHARDT, L. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindústria**, v. 2, p.32, 2008.

SLONEKER, J. H.; ORENTAS, D. G.. Pyruvic acid, a unique component of an exocellular bacterial polysaccharide. **Nature**, v. 194, n. 4827, p. 478-479, 1962.

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

SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Stanford, 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. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.19, n.1, p. 53-56, 2003.

SOUW, P., DEMAINE, 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.

SOUW, P.; DEMAINE, A. L. Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation Technology**, v.58, n. 5, p. 411-416, 1980.

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

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

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

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

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

TAIT, M. I; SUTHERLAND, I. W; CLARKE-STURMAN, 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.

TAKO, M. Molecular origin for rheological characteristics of xanthan gum. Viscoelasticity o Biomaterial. . In: ACS Symposium Series, 489, 268-281, 1992.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ªed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

TRILSBACH, G. F.; PIELKEN, P.; HAMACHER, K.; SAH, H. Xanthan formation by *Xanthomonas campestris* under different culture conditions. **European Congress of Biotechnology**, p. 65-70, 1984.

UMASHANKAR, H. ANNADURAI, G.; KRISHNAN, M.R.V. Influence of nutrients on cell growth and xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Bioprocess Engineering** v. 14, p.307-310, 1996.

VARELA, J.W. Produção de goma xantana em cultivo submerso e cultivo semi-sólido utilizando casaca de soja como substrato. **Tese de Doutorado**. UFRGS, 2008.

VAUTERIN, L.; SWING, J. Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? **Journal Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p.77-82, 1997.

VIEIRA, E. D. Produção de goma xantana em reator de coluna de bolha utilizando processo de batelada repetida. **Tese de doutorado**, UNICAMP, 2008.

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

YOO, S. D.; HARCUM, S. W. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 105-109, 1999.