

GISELE PIGATTO

***IRRADIAÇÃO UV EM XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV.
CAMPESTRIS VISANDO A PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA***

São José do Rio Preto
2008

GISELE PIGATTO

**IRRADIAÇÃO UV EM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV.
CAMPESTRIS VISANDO A PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto

São José do Rio Preto
2008

Pigatto, Gisele.

Microbiologia: Irradiação UV em *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* visando a produção da goma xantana / Gisele Pigatto. – São José do Rio Preto: [s. n.], 2008.

77 f. : il ; 30 cm.

Orientador: Pedro de Oliva Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Microbiologia. 2. Biopolímeros. 3. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 4. Irradiação UV. I. Oliva Neto, Pedro. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 579

GISELE PIGATTO

**IRRADIAÇÃO UV EM *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV.
CAMPESTRIS VISANDO A PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Microbiologia junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
Professor Assistente Doutor
UNESP – Assis
Orientador

Dr^a. Valéria Marta Gomes de Lima
Professor Doutor
UNESP-Assis

Dr^a. Ivanise Guilherme Branco
Professor Assistente Doutor
Universidade Estadual de Maringá

São José do Rio Preto, 20 de março de 2008.

Dedico este trabalho a minha família, que me apoiou em todos os momentos da minha vida. Sem eles (Meu filho Renato, minha mãe Teresa, meu pai Renato, meu irmão Bruno e minha cunhada Suzana) jamais chegaria onde estou, e tenho a certeza de que caminharei muito mais longe ainda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por ter me dado o mais necessário da vida, saúde para a conclusão deste projeto.

Ao meu filho Renato em primeiro lugar, por ter sido o maior afetado em relação a minha ausência em uma etapa tão importante de sua vida. Foi o meu maior incentivo em não desistir quando tudo me colocava a favor disso. Aos meus pais Renato e Teresa, a meu irmão e cunhada Bruno e Suzana por terem me apoiado, criticado, aconselhado tantas vezes durante um período tão conturbado da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto, por ter me acolhido mesmo não sendo graduada pela UNESP.

Aos Prof. Drs. Regildo e Valéria meus “co-orientadores”, pessoas que conheci na etapa final deste projeto e fizeram uma intensa diferença em minha vida acadêmica. Apoio, educação, carinho, compreensão, e principalmente incentivo foram algumas qualidades que encontrei em cada um deles. Agradeço muito cada palavra, levarei para sempre em meu coração.

Aos meus primos Marcelo Antônio Nero e Luís Augusto Nero por terem me apoiado nesta etapa tão trabalhosa com muita disposição, dedicação, carinho e profissionalismo.

A algumas alunas da graduação e amigas Alessandra, Kassandra, Débora (Regildo), Andressa, Cíntia e colegas do laboratório. Aprendi muito com cada um de vocês. Alê mesmo com filho recém nascido, e meu projeto (parte prática) já finalizado, não hesitei em orientá-la pelo amor que tenho no que faço. Amor que me fez deixar meu filhote em casa e aprender um pouco com você também. Dé (Regildo) digo o mesmo a você viu. Foi válido e prazeroso trabalhar com vocês.

A Coordenadora de Microbiologia de São José do Rio Preto (Paula Rahal) pela compreensão, apoio, carinho, amizade e incentivo. Será eternamente lembrada com muito carinho.

“Tudo vale a pena se a
alma não é pequena”

Fernando Pessoa

Pigatto, G. Irradiação UV em *Xanthomonas campestris pv. campestris* visando a produção de goma xantana. 2008. 77f. [dissertação]. São José do Rio Preto: Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2008.

RESUMO

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica que causa a podridão negra no sistema vascular das plantas da família das crucíferaceas. Produz um exopolissacarídeo denominado goma xantana, que possui propriedades reológicas únicas sendo utilizada amplamente como agente de suspensão, espessante, emulsionante e estabilizante. É aplicada em indústrias petrolíferas, alimentícias, farmacêuticas, mineração, têxtil, termoquímicas, tintas, cosméticos e produtos agropecuários. O Brasil é um grande produtor mundial de cana de açúcar e álcool etílico. Produtos estes utilizados para a produção de xantana; o primeiro como substrato da fermentação e o segundo para a separação da goma. Apesar de todo esse potencial, o Brasil importa grande quantidade de goma xantana que poderá ser produzida com grande competitividade internacional. Portanto, este trabalho objetivou a utilização da técnica de irradiação ultravioleta, em uma linhagem específica de *Xanthomonas campestris*, para a obtenção de mutantes estáveis que possam melhorar o rendimento e/ou qualidade de goma obtida. A quantificação foi realizada através da determinação da biomassa, viscosidade, cálculos do rendimento da biomassa e goma. A irradiação UV por 600 segundos causou uma redução de 92,2% na população irradiada e as linhagens sobreviventes foram isoladas e analisadas nos testes de produção e viscosidade da goma xantana. As linhagens I6, I7, I9 e I10 apresentaram um aumento de 102% na produção de goma comparando com a linhagem não irradiada. Em relação à viscosidade do caldo, as linhagens irradiadas obtiveram um aumento de 48% comparadas com as não irradiadas de 20 e 30 rpm. A viscosidade da solução de goma xantana 1%, também foram superiores quando comparadas com a não irradiada. O aumento de viscosidade foi de 17% para a velocidade rotacional de 20 rpm e de 16% para 30 rpm. A linhagem irradiada I9 que foi submetida a uma nova irradiação utilizando as mesmas técnicas, foram sensíveis a irradiação UV, com 100% de morte celular. Estes resultados demonstram a importância da técnica de irradiação e contribuem para um avanço tecnológico deste biopolímero.

PALAVRAS-CHAVE: goma xantana, biopolímero, *Xanthomonas campestris pv. campestris*, irradiação UV, rendimento e viscosidade.

Pigatto, G. Irradiation UV in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to production of xanthan gum. 2008. 77f. [dissertation]. São José do Rio Preto: Institute of de Biosciences, Letters and Exact Sciences, UNESP - São Paulo State University; 2008.

ABSTRACT

Xanthomonas campestris is fitopatogenic bacterium that causes the black rotten in the vascular system of the plants of the family of the cruciferaceas. It produces an exopolysaccharides that forms the xanthan gum, which is used in ample variety as agent of suspension, thicker, emulsifier and stabilizing, and singular rheological properties. It is applied in petroliferous, nourishing, pharmaceutical industries, of mining, textile, thermo chemistries, inks, cosmetics and farming products. Brazil is the worldwide producing greater of sugar cane of sugar and ethyl alcohol. Products theses used for the xanthan production; the first one as substratum of the fermentation, and the second as for the separation of the gum. Despite all this potential, the Brazil imports lot of xanthan gum that could be produced with great international competitiveness. This aiming work the used of the ultraviolet technique of irradiation in a specific strain of *Xanthomonas campestris* to obtain the mutants that can improve the income and/or quality of produced gum, through the determination of the biomass, viscosity, calculations of the income of the biomass and gum. The UV irradiation during 60 seconds caused a reduce of the 92.2% in the irradiated strains and the survived strains were isolated and analysed in the tests of production and viscosity of xanthan gum. The strains I6, I7, I9 e I10 showed increased in the xanthan production of 102% comparing with the non-irradiated strain. In relation the viscosity of the broth the irradiated strains the increase of 48% in shear rate of 20 and 30 rpm compared with the no irradiated. The viscosity of the xanthan solution 1% irradiated were higher also whwn compared with no irradiated in both shear rate (20 and 30 rpm. The increase of viscosity was of 17% to rotational speed of 20 rpm and 16% to 30 rpm. The strain irradiated I9 was the submeted the new irradiation and it was sensible UV irradiation causing 100% cells death. This results showed the importance of the irradiation technical, maid and contribution to advance in the technology of this biopolymer.

KEYWORDS: xanthan gum, biopolymer, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, UV irradiation, yield and viscosity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 Estrutura da goma xantana	23
FIGURA 2 A criação e o reparo de um dímero de timina causado pela luz ultravioleta	36
FIGURA 3 Fluxograma das etapas para obtenção de <i>Xanthomonas campestris</i> irradiadas.....	42
FIGURA 4 Concentração de biomassa e goma xantana com desvio padrão das 11 linhagens de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> irradiadas por luz UV e a linhagem da mesma não irradiada, produzida durante a fermentação após 72h e a 29 °C.....	53
FIGURA 5 Viscosidade do caldo em 20 e 30 rpm após fermentação de 72 h a 29°C de 11 linhagens de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> submetidas à irradiação por luz UV e linhagem não irradiada com média e desvio padrão.....	55
FIGURA 6 Viscosidade da goma reidratada a 1% em 20 e 30 rpm após fermentação de 72 h a 29°C de 11 linhagens de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> submetidas à irradiação por luz UV e linhagem não irradiada com média e desvio padrão.....	56
FIGURA 7 A comparação do rendimento e o desvio padrão da biomassa, nas linhagens irradiadas de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> e a linhagem padrão (não irradiada).....	59
FIGURA 8 A comparação do rendimento de goma e o desvio padrão nas linhagens irradiadas de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> e a linhagem padrão (não irradiada).....	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Efeito de irradiação UV no número de colônias viáveis de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	48
TABELA 2 Produção da biomassa nas linhagens de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> antes e após irradiação UV.....	50
TABELA 3 Produção de goma obtida pela linhagem de <i>X. campestris</i> antes e após irradiação UV.....	51
TABELA 4 Média de biomassa e goma produzida.....	52
TABELA 5 Viscosidade do caldo após fermentação de <i>X. campestris pv. campestris</i> antes e após irradiação por luz UV.....	54
TABELA 6 Viscosidade da goma reidratada a 1% após fermentação de <i>X.campestris pv. campestris</i> antes e após irradiação por luz UV.....	56
TABELA 7 Rendimento de biomassa e goma de <i>X. campestris</i> irradiada e não irradiada.....	58

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Biopolímeros-Considerações Gerais.....	15
2.2 Fitopatogenicidade de <i>Xanthomonas</i>	17
2.3 Aplicações da goma xantana.....	20
2.4 Estrutura e biossíntese da goma xantana.....	22
2.5 Fatores que interferem no crescimento de <i>Xanthomonas</i> e na produção de xantana.....	26
2.6 Recuperação dos biopolímeros.....	30
2.7 Reologia dos biopolímeros.....	31
2.8 Efeito da irradiação por luz ultravioleta no DNA e seleção de mutantes para a produção de xantana.....	34
3 OBJETIVO GERAL.....	40
3.1 Objetivos específicos.....	40
4 METODOLOGIA GERAL.....	41
4.1 MATERIAIS.....	41
4.1.1 Microrganismos utilizados.....	41
4.1.2 Reagentes.....	41
4.1.3 Equipamentos.....	41
4.2 Métodos.....	42
4.2.1 Etapas da metodologia aplicada.....	42
4.2.2 Produção de goma xantana.	43
4.2.3 Cultivo de <i>Xanthomonas campestris</i> para testes de irradiação.....	43
4.2.4 Preparo da suspensão de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> e irradiação UV.....	43
4.2.5 Plaqueamento das suspensões de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> submetidas a irradiação UV.....	43
4.2.6 Seleção de linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> irradiadas para a produção da goma xantana.....	44

4.2.7 Produção do inóculo de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> para a produção de goma xantana.....	44
4.2.8 Produção da goma xantana.....	45
4.3 Análises físicas e químicas.....	45
4.3.1 Determinação da biomassa.....	45
4.3.2 Tratamento do caldo da fermentação centrifugado para obtenção de goma.....	45
4.3.3 Determinação da viscosidade aparente.....	46
4.3.4 Análise de Açúcares Redutores Totais.....	46
4.3.5 Cálculo do rendimento.....	46
4.3.6 Análise estatística.....	47
4.4 Teste de irradiação com <i>Xanthomonas campestris</i> irradiada.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 Efeito de mutações em <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	48
5.2 Irradiação UV na produção de biomassa de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	49
5.3 Irradiação UV na produção de goma de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>	49
5.4 Viscosidade aparente do caldo de fermentação das linhagens de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> irradiadas e não irradiada.....	53
5.5 Viscosidade aparente da solução de xantana 1% das linhagens de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> irradiadas e não irradiada.....	55
5.6 Efeito da irradiação UV no rendimento de biomassa das linhagens de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> irradiadas e não irradiada.....	57
5.7 Efeito da irradiação UV no rendimento de goma das linhagens de <i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i> irradiadas e não irradiada.....	57
5.8 Linhagem irradiada I9 submetida a uma nova irradiação UV por 600 segundos.....	59
6. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO.

Os biopolímeros são aqueles produzidos por microrganismos e podem possuir propriedades geleificantes, estabilizantes e espessantes. Possuem algumas vantagens em relação aos polímeros convencionais (obtidos de origem vegetal e algas marinhas), tais como: produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno (MAUGERI FILHO, 2001).

Xanthomonas campestris é uma bactéria fitopatogênica que produz o biopolímero goma xantana. A xantana possui a capacidade de formar soluções e géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações, numa ampla faixa de pH e temperatura, garantindo assim vantagens comerciais (ZHANG et al., 2002).

A produção deste biopolímero é extremamente importante devido à vasta aplicação nos setores industriais como: alimentícios, farmacêuticos, químico e petroquímico. Nestes setores, há uma substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana, devido, dentre outros fatores, as possibilidades de modificação de suas características reológicas por meio de controle de parâmetros de fermentação (SEVIOUR; GIBBS, 1992). Nos EUA, a indústria de petróleo utiliza esse biopolímero de forma limitada, devido ao seu custo elevado de produção (PADILHA, 2003).

O Brasil possui um grande potencial para a produção do biopolímero, já que dispõe de matéria-prima básica para a produção: açúcar, extrato de levedura e álcool do setor sucroalcooleiro. O açúcar é utilizado como substrato, tanto para o crescimento celular quanto para a produção da goma, e o álcool para a separação da xantana durante a fermentação (PADILHA, 2003).

A irradiação de DNA ou células sob luz ultravioleta (UV) induz a formação de vários tipos de DNA lesionados mutagênicos (ROCHETTE et al., 2003). A partir dessa técnica foi realizada neste trabalho a indução de mutantes em linhagem de *Xanthomonas campestris pv. campestris*, visando uma melhoria na tecnologia de produção da goma xantana.

2 REVISÃO DE LITERATURA.

2.1 Biopolímeros – Considerações Gerais.

Rottava (2005) *apud* com Pasquel (1999) e Garcia-Cruz (2001) relatam que as gomas são compostos de natureza polissacarídica com propriedades geleificantes e que podem ser obtidas a partir de:

1. Algas marinhas – são extratos de algas vermelhas e marrons e que são também conhecidas como *seaweeds*. Exemplos: alginatos, goma agar e goma carragenana.
2. Sementes de plantas terrestres - um segundo grupo importante de gomas são as galactomanas obtidas das sementes de certas plantas. Exemplos: goma locusta e goma guar.
3. Exudatos de plantas terrestres – um terceiro grupo importante de gomas usadas na indústria de alimentos é o grupo das gomas exudadas por árvores. Exemplos: goma arábica, goma ghatti, goma karaya e goma tragacante.
4. Modificações químicas de produtos vegetais como, por exemplo, a modificação química da celulose e da pectina, conducentes à obtenção de hidrocolóides com propriedades geleificantes. Exemplos: gomas celulósicas (carboximetilcelulose, metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose) e pectinas.
5. Bioprocessos de origem microbiana ou biopolímeros – é importante destacar as gomas produzidas por algumas espécies de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, que apresentam propriedades incomuns no que diz respeito à textura como a goma xantana e a gelana.

Os biopolímeros são produzidos e secretados por microrganismos. Eles podem ser de dois tipos: os homopolissacarídeos, compostos apenas por um tipo de monossacarídeo (exemplo dextrana, pululana), e os heteropolissacarídeos, compostos por dois ou mais monossacarídeos com ou sem ramificações (exemplo: gelana e xantana) (LAWS; GU; MARSHALL, 2001; MONSAN et al., 2001).

Os biopolímeros são considerados constituintes normais de todas as células microbianas. Eles se dividem em três grupos de acordo com sua localização morfológica sendo: intracelular, quando aparece localizado no interior da célula ou como parte da membrana citoplasmática e armazenam diferentes formas de carbono; da parede celular, formado como parte estrutural das células (peptideoglicanos e ácido teicóico); e extracelulares (exopolissacarídeos ou EPS), os quais formam cápsulas e estão associados à superfície celular ou são posteriormente secretados para o meio extracelular (SUTHERLAND, 1982). Estes exopolissacarídeos podem ser capsulares ou livres. Os extracelulares livres são considerados os de maior importância devido à sua facilidade de obtenção e economia para indústria.

Os EPS de *Xanthomonas campestris pv. campestris* parecem ser sintetizados pelos mesmos genes encontrados em *X. axonopodis pv. manihotis*, *X. fastidiosa*, *X. axonopodis pv. citri* e *X. oryzae pv. oryzae* (DA SILVA et al., 2002; DA SILVA et al., 2001; DHARMAPURI; SONTI, 1999; KATZEN et al., 1998).

Os polímeros biossintetizados podem ser classificados de acordo com a composição e local da secreção. Quanto ao local, a xantana é um exopolissacarídeo, sendo secretada no meio de cultura (SUTHERLAND, 1982). A síntese de xantana em laboratório pode ser por fermentação contínua ou intermitente. A maior parte, se não a totalidade da produção comercial, é feita em batelada (TAIT; CLARKE-STURMAN, 1986; SUTHERLAND, 1993).

Dentre as características de alguns tipos de biopolímeros e vantagens sob as demais gomas estão suas propriedades físico-químicas, destacando-se sua elevada viscosidade em baixas concentrações (0,05 a 1%), sua estrutura ramificada, seu alto peso molecular, bem como estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH (VENDRUSCOLO, 1995; GARCIA-OCHOA; CASA; GÓMEZ, 2000). Além disso, não depende de fatores físicos e químicos do meio ambiente para a produção e possíveis instabilidades políticas das regiões produtoras o que provocaria escassez e alta de preços não são consideradas (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

O polímero obtido por *Xanthomonas campestris pv. campestris* é sintetizado principalmente ao cessar o crescimento microbiano. Geralmente, a concentração final atinge 20 a 30 g L⁻¹, com rendimento de 50 a 60 % e produtividade típica de 0,5g L⁻¹h⁻¹ (LIMA et al., 2001; PORTILHO, 2002). Quando a fermentação termina, o caldo é esterilizado e a goma xantana é recuperada por precipitação com álcool

isopropílico (KATZBAUER, 1998; MAUGERI FILHO, 2001; PAPAGIANNI et al., 2001).

Um grande número de bactérias conhecidas produz quantidades abundantes de exopolissacarídeos, particularmente os microrganismos fitopatogênicos como *Xanthomonas*, *Erwinia* e bactérias fixadoras de nitrogênio *Rhizobium*, *Beijerinckia* e *Azotobacter* (VERMANI, KELKAL, KAMAT, 1995). Destas, os exopolissacarídeos de *Xanthomonas campestris* (xantana), *Sphingomonas paucimobilis* e *Pseudomonas elodea* (gelana), *Acetobacter xylinum* (celulose) e *Rhizobium sp.* (succinoglucana) estão sendo comercializados (SUTHERLAND, 2001).

Os exopolissacarídeos possuem a função de proteger a célula bacteriana contra dessecação e ataque de bacteriófagos, bem como de antibióticos, compostos tóxicos e protozoários. Outra possível função do exopolissacarídeo inclui seqüestrar cátions essenciais e envolvimento na aderência em superfícies sólidas e formação de biofilme (DE VUYST; DEGEEST, 1999; LOOIJESTEIJN et al., 2001).

As propriedades físicas de um exopolissacarídeo microbiano dependem de suas estruturas primária, secundária e terciária. A goma xantana produzida por bactérias selvagens e mutantes, tem fornecido alguma indicação da relação entre a estrutura do carboidrato, o grau de acilação e suas propriedades físicas (SHATWELL; SUTHERLAND; ROSS-MURPHY, 1990). Os grupos acetila e outros substituintes não açúcares podem alterar grandemente as propriedades físicas, assim como conferir carga ao exopolissacarídeo. Na ausência de tais cargas, as macromoléculas podem ser insolúveis. Contudo, dependem das ligações estruturais. Os conteúdos de piruvato e o acetato influenciam, respectivamente, na transição e estabilização ou desestabilização da conformação ordenada. Grupos acetila geralmente impedem a associação sinérgica e sua remoção produz polímeros geleificantes em baixas concentrações (SUTHERLAND, 1997).

2.2 Fitopatogenicidade de *Xanthomonas*.

X. campestris pv. campestris pertence à família *Pseudomonaceae*, sendo uma bactéria gram-negativa, estritamente aeróbica, fitopatogênica e resistente à estreptomicina. O crescimento destas bactérias em meio YM apresenta grandes

colônias com aspecto mucóide, apresentando ou não pigmentações (BRADBURY, 1984). É apresentada em forma de bastonetes, 0.4-0.7 μm de largura e 0.7-1.8 μm de comprimento, móveis por flagelo único (1,7-3 μm de comprimento). Muitas espécies não são móveis ou somente apresentam sua mobilidade sob algumas condições. No caso de *X. campestris pv. campestris* ela pode ser móvel ou produzir o EPS, mas nunca ambos. Essa mobilidade da bactéria está relacionada com a redução da virulência presente na mesma (KAMOUN; KADO, 1990).

X. campestris infectam mais de 240 gêneros de plantas monocotiledôneas e dicotiledôneas que incluem alguns de interesse para a agricultura como, por exemplo, repolhos, feijões e alfafas (CIVEROLO; HATTINGH, 1993), exceto a *Xanthomonas maltophilia*, a qual é a única espécie não fitopatogênica (HAYWARD, 1993; SWINGS; CIVEROLO, 1993; GARCIA-OCHOA; CASA; GÓMEZ, 2000). A diferenciação das espécies desse gênero ocorre pela descrição de até 120 patovares. Esta classificação está relacionada com a especificidade da planta hospedeira, *Xanthomonas campestris pv. campestris*, *pv. citrus*, *pv. vesicatoria*, *pv. cassava* e *pv. manihotis*, as quais infectam crucíferas, citrus, solanáceas e mandioca, respectivamente (BRADBURY, 1984).

A virulência de *X. campestris* depende de alguns fatores, incluindo a síntese de enzimas extracelulares e a síntese do polissacarídeo extracelular (EPS). O agrupamento de genes *rpf* (para regulação de fatores de patogenicidade) controla positivamente ambos os processos e a virulência da planta. A mutação nos genes *rpf* leva a uma baixa regulação da síntese de numerosas enzimas extracelulares como endoglucanase, protease e liase poligacturonate e também do EPS xantana (BARBER et al., 1997).

Em 1960 foi descoberto um biopolímero pela Northern Utilization Research Development dos EUA anunciado como polissacarídeo B-1459, este sendo um produto de fermentação da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris pv. campestris*, um importante biopolímero industrial e considerado também um polissacarídeo natural. Este polissacarídeo microbiano foi identificado como sendo de alto peso molecular, hidrossolúvel e um heteropolissacarídeo extracelular, e ainda possuía características singulares que o diferenciaram de outras gomas. Após pesquisas, o termo goma xantana começou a ser utilizado genericamente para este polissacarídeo (GODET, 1973).

Na década de 40, VERS isolou a bactéria denominada *X. campestris*. Esta tem a propriedade de formar soluções mais viscosas. A viscosidade se inicia quando ocorre secreção de um determinado heteropolissacarídeo aniônico, denominado goma xantana, produzido em larga escala por fermentação aeróbia pelo microrganismo *X. campestris* (MAURY; ROQUE, 1986). Esta goma foi aprovada pelo FDA em 1969 e no Brasil sua adição na indústria alimentícia se iniciou em 1965 (ABIA, 1992).

Xanthomonas causam diversas doenças à diferentes partes das folhas, ramos ou frutos de muitas plantas. Os sintomas aparecem incluindo necrose, gomose e/ou doenças vasculares ou parenquimatosas (HAYWARD, 1993). Em geral não apresentam crescimento epífito, isto é, superficial, considerável especialmente nas folhas. A água livre, luz solar, especialmente os raios UV e temperaturas extremas (~50°C) são destacados como fatores limitantes para o crescimento (RUDOLPH, 1993).

A virulência da linhagem *Xanthomonas* pode estar mais relacionada com a viscosidade produzida pelo exopolissacarídeo do que com a quantidade de goma produzida pelo microrganismo durante a infestação. Existem diversos fatores que ajudam na propagação da doença conhecida como podridão negra que ataca as plantas da família cruciferaea, e um desses fatores é devido à infestação das sementes das plantas pelos microrganismos patogênicos e a persistência das bactérias no solo (FUKUI; ARIAS; ALVAREZ, 1994). Esta bactéria infecta também outras culturas de importância econômica como algodão, citrus, arroz, feijão, soja, tomates, pimenta, morango e cana-de-açúcar, entre outros (ROITMAN; SCHRAG 1985; CIVEROLO; HATTINGH, 1993; VAUTERIN; SWINGS, 1997).

Os biopolímeros parecem influir no processo de adesão das bactérias a certas estruturas, colonizando a superfície dos vegetais. Depois de invadirem os espaços intercelulares, desenvolvem microcolônias rodeadas de material fibrilar, provavelmente o exopolissacarídeo xantana. Após 24 horas, encontram-se abundantemente rodeadas por estes exopolissacarídeos microbianos, que preenchem os espaços entre as células (SWINGS; CIVEROLO, 1993).

Os espaços tornam-se congestionados (processo chamado *water soaking*), pois o muco secretado pela bactéria apresenta alta capacidade de retenção de água. Este é considerado o primeiro sintoma da infecção e pré-requisito para a efetiva colonização bacteriana (RUDOLPH, 1993). Os danos se tornam mais críticos,

já que a congestão é progressiva. A permeabilidade da membrana celular é aumentada devido à fotossíntese ser reduzida, apressando assim o murchamento da planta.

O tecido necrosado é utilizado pela bactéria como substrato. A celulose e a pectina (polissacarídeos estruturais) são degradadas por diversas enzimas secretadas pela bactéria (SUTHERLAND, 1993). A eficiência da capacidade de formação do *water soaking* está relacionada à virulência da cepa que é correlacionada com a quantidade e qualidade do EPS produzido *in vitro* quando diferentes cepas são comparadas (RUDOLPH, 1993).

Muitas funções têm sido sugeridas para a xantana durante a invasão da bactéria nas plantas: protege a bactéria contra dessecação, concentra minerais e nutrientes, reduz o contato com componentes tóxicos (de plantas e outros microrganismos) pelo efeito de seus ânions naturais (DENNY, 1995). Além disso, a xantana pode estar envolvida na produção de biofilme (DHARMAPURI; SONTI, 1999). Várias *Xanthomonas* com mutantes deficientes de xantana freqüentemente tem redução na virulência quando comparada com a bactéria selvagem (DANIELS et al., 1984; DHARMAPURI; SONTI, 1999; KATZEN et al., 1998). EPS também pode estar relacionado com a sobrevivência epífita de *Xanthomonas campestris pv. campestris* (POPLAWSKY; CHUN, 1998).

O agrupamento do gene *gum* em *X. campestris pv. campestris* parece ser expressado tardiamente durante a infecção do nabo, indicando que o EPS pode ser crítico para estágios tardios de infecção, mas não um fator essencial para o início da doença na planta. Isto pode ocorrer pelo fato do EPS não ser requerido para o crescimento na folha de mandioca, mas é pré-requisito para a infecção de outras culturas (VOJNOV et al., 2001).

2.3 Aplicações da goma xantana.

O mercado anual para as gomas utilizadas em alimentos foi estimado em 405 milhões de dólares. Somente para a goma xantana, este valor foi avaliado em aproximadamente 60 milhões de dólares (BAIRD; PETTITT, 1991). O biopolímero goma xantana é o polissacarídeo mais importante do ponto de vista comercial. Atualmente, a xantana tem um mercado de cerca de US\$ 270 milhões e uma

produção de 40.000 t/ano, com taxa de crescimento acima de 5% ao ano, indicando para 2015 um mercado estimado em US\$ 400 milhões e 80.000 t/ano (PRADELLA, 2006).

As empresas Merck e Pfizer, nos Estados Unidos da América, Rhône Poulenc e Sanofi-Elf, na França, e Jungbunzlauer, na Áustria são consideradas as maiores produtoras de xantana atualmente. Estas produzem a goma tanto para uso em alimentos como para outros usos industriais (GARCIA-OCHOA; CASA; GÓMEZ, 2000).

Mesmo com resultados tão significativos este biopolímero não predomina no mercado devido a seu alto custo de produção, saindo em média US\$ 6,8/Kg. Este valor ainda não inclui gastos com despachantes, transporte e imposto (ABIA, 2004).

No Brasil, a adição da goma xantana como estabilizante e espessante em alimentos, foi permitida desde 1965 pelo decreto Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (LIMA et al., 2001). Com exceção dos amiláceos, o mercado brasileiro é um tradicional importador de biopolímeros para uso industrial, seguindo a tendência mundial na qual o total de importações dos biopolímeros vêm progredindo cada vez mais (CRUZ, 1983; ABIA, 1989/1993).

Após vários estudos observou-se que os biopolímeros vêm substituindo progressivamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais. Isso ocorre devido ao visível interesse por suas propriedades reológicas, que em grande parte dos casos superam as características funcionais dos convencionais (SANDERSON; CLARK, 1983; RINAUDO, 1993).

A partir de inúmeros estudos com a goma xantana, foi comprovado que este polissacarídeo é atóxico. Estes estudos foram realizados em ratos e em cães incluindo análises reprodutivas e nutricionais a curto e a longo prazo, concluindo que a goma xantana não inibia o crescimento, não causava nenhum tipo de alergia, irritação nos olhos e nem na pele, não promovia incidência de tumores, não provocava alterações no peso dos órgãos ou na constituição sanguínea destes animais (GARCIA-OCHOA; CASA; GÓMEZ, 2000). A conclusão dos testes nutricionais foi que o biopolímero não era degradado no sistema digestivo, passando pelo estômago e intestino com a mínima modificação, considerando esta passagem quase imperceptível (BETZ, 1979; PETTITT, 1982).

A goma xantana é aplicada nos setores industriais em geral preferencialmente o de alimentos. A xantana é empregada para controlar viscosidade, textura, retenção

de aromas e estabilização de emulsões e suspensão de sólidos. A xantana é encontrada adicionada em molhos prontos, alimentos congelados, sucos de frutas e coquetéis, sobremesas instantâneas, produtos cárneos etc (MAUGERI FILHO, 2001). A compatibilidade deste polissacarídeo com a maioria dos colóides utilizados em alimentos, incluindo o amido, torna a goma xantana ideal para a preparação de pães e outros produtos para a panificação (CHRISTIANSON et al., 1974).

Na indústria de alimentos a xantana é considerada multifuncional, atuando como estabilizantes, espessantes, geleificantes e crioprotetores, sendo muitas vezes os principais responsáveis pela textura (corpo, viscosidade e consistência) dos alimentos processados (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

A goma xantana também está presente na indústria farmacêutica e cosmética, como agente de suspensão e espessante (KATZBAUER, 1998). Representa 90% do volume total de vendas dos polímeros bacterianos.

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

A xantana é o polissacarídeo mais utilizado na recuperação terciária de petróleo (EOR), não tendo até o momento nenhum outro em escala comercial que supera suas qualidades. Este biopolímero têm sido usado junto com hidróxido de sódio e surfactantes na técnica conhecida como APS (álcali-polímero-surfactante) (NAVARRETE; SHAH, 2001).

2.4 Estrutura e biossíntese da goma xantana.

Existem poucas informações sobre o processo da biossíntese dos diferentes tipos de exopolissacarídeos. Um bom entendimento do processo bioquímico é importante, pois estas informações podem ser usadas para controle e otimização da produção e também para ter conhecimento das características físico-químicas dos EPS. Com o conhecimento do processo biossintético, pode-se melhorar os

processos tecnológicos com o objetivo de diminuir os custos (DE VUYST; DEGEEST, 1999; LOOIJESTEIJN et al., 2001).

A goma xantana apresenta uma unidade básica repetitiva considerada um polímero constituído por unidades de glicose, duas de manose, uma de ácido glicurônico, na proporção molar de 2,8: 2,0: 2,0 e grupos piruvato e acetil. O peso molecular da xantana é considerado alto, de 2 a 12×10^6 Da (Daltons), mas pode variar dependendo do processo fermentativo e da linhagem utilizada. Sua cadeia principal consiste em unidades de β -D-glucose com ligações nas posições 1 e 4. O trissacarídeo de cadeia lateral confere solubilidade em meio aquoso. Especificamente os ácidos glicurônico, pirúvico e acético conferem ionicidade a xantana e estão relacionados à conformação molecular (MISAKI, 1993). A unidade de ácido D-glicurônico fica entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glucose da cadeia principal. A rigidez da cadeia principal, aliada à solubilidade induzida pelas cadeias laterais, e demais características únicas à xantana que a tornaram tão importante para a indústria de alimentos dentre outras. Aproximadamente metade dos resíduos D-manose terminais contém um ácido pirúvico ligado, com distribuição indeterminada. A unidade D-manose ligada na cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6 (SUTHERLAND, 1992; GARCIA-OCHOA; CASA; GÓMEZ, 2000; PORTILHO, 2002). Cerca de 30% das ramificações possuem um grupo piruvato carregado.

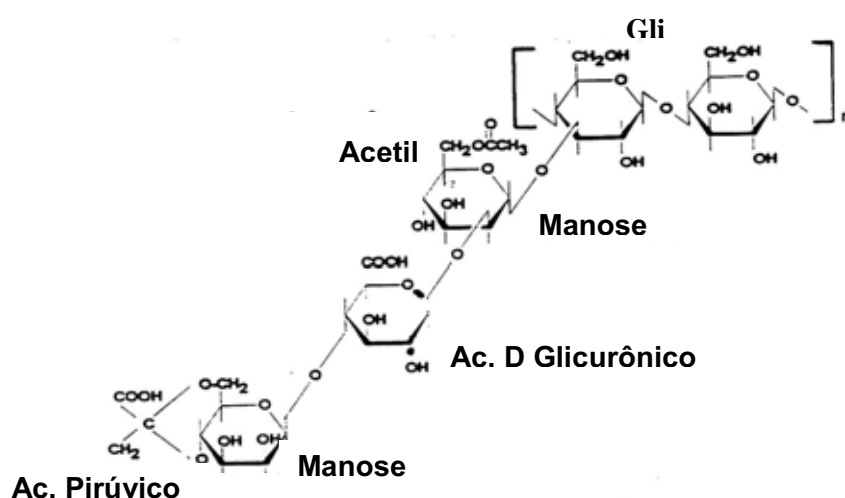


FIGURA 1 Estrutura da goma xantana (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

O genoma de *X. campestris* codifica 21 proteínas com propriedade única GGDEF, 5 com EAL, 8 GGDEF e EAL, e 3 HD-GYP. Na maioria dessas proteínas, os domínios GGDEF, EAL e HD-GYP estão associados com outros domínios que possuem funções estabelecidas em sinalização, tal como os domínios PAS, GAF e REC. Uma hipótese é que estes reguladores são componentes de sistemas de transdução de sinal que respondem a diferentes respostas ambientais para modular o nível GMP cíclico na célula com conseqüentes efeitos para a regulação de funções associadas à superfície (CROSSMAN; DOW, 2004).

A conformação da molécula da xantana apresenta-se de duas formas sendo hélice e espiral aleatória, dependendo da temperatura de dissolução (MORRIS, 1976; GALINDO, 1994; CHALLEN, 1993). Devido à presença dos ácidos D-Glicurônico, pirúvico e agrupamentos acetila em sua estrutura molecular possui caráter aniônico marcante. Nos produtos comerciais, estas funções ácidas encontram-se neutralizadas por eletrólitos (LEE, 1980; OHLWEILER, 1982; RUSSEL, 1994; ATKINS, 2001). Na xantana são utilizados os cátions Na^+ , K^+ e Ca^{++} (MORRIS, 1992).

A biossíntese da goma xantana é bem complexa e se inicia com a produção de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glicurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples para precursores derivados de açúcares nucleotídeos. As subunidades de pentassacarídeos são fixadas no interior da membrana portadora de fosfato poliprenol e a adição de grupos acetil e piruvato ocorre durante a polimerização de unidades repetidas de pentassacarídeos e secreção do polímero (HARDING; CLEARY; IELPI, 1995; IELPI; COUSO; DANKERT, 1993 e 1983).

O local preciso do processo de polimerização e o estágio final da secreção do EPS a partir da membrana citoplasmática, envolvendo a passagem pelo periplasma, membrana exterior e a excreção para o ambiente extracelular, ainda são pouco elucidados (HARDING et al., 1994; SUTHERLAND, 1997 e SUTHERLAND, 2001). Os autores ainda não entraram em um consenso, pois alguns citam que primeiro ocorre à polimerização das unidades pentassacarídicas no interior da célula para posteriormente a secreção do biopolímero (COPLIN; COOK, 1990; HARDING et al., 1993; KATSEN et al., 1998; SUTHERLAND, 2001). Já de acordo com Köplin et al (1992), as unidades pentassacarídicas são secretadas e polimerizadas no ambiente extracelular ocasionando a formação do biopolímero.

Alguns genes de *X. campestris pv. campestris* relacionados com a biossíntese da goma xantana e patogenia estão sendo clonados (BARRERE; BARBER; DANIELS, 1986; THORNE; TANSEY; POLLOCK, 1987), mas somente alguns têm suas funções estabelecidas (HARDING et al., 1987; HOTTE et al., 1990). O isolamento de mutantes defeituosos é uma importante etapa de identificação de genes relacionados à patogenia e produção da goma.

A região cromossômica *xpsIII*, *xpsIV* e *xpsVI* e o agrupamento do gene 35.3kb são essenciais para a primeira etapa da biossíntese da xantana (HARDING et al., 1993; KOPLIN et al., 1992). Estas regiões compreendem funções de genes envolvidos na biossíntese dos precursores de açúcares nucleotídeos. Proteínas relacionadas para o estágio subsequente da biossíntese da xantana têm sido propostas para serem codificadas pela região *gum* ou *xpsI* (CAPAGE et al., 1987; HARDING et al., 1987; VANDERSLICE et al., 1988).

Na biossíntese da xantana estão envolvidos 12 genes (HARDING et al., 1987). Estes são nomeados de *gumB* – *gumM*, na ordem em que eles aparecem no genoma de *X. campestris pv. campestris* (KATZEN et al., 1998). O número de genes homólogos da goma têm sido detectados na seqüência genômica de *Xilela fastidiosa* (DA SILVA et al., 2001) e *Xanthomonas axonopodis pv. citri* (DA SILVA et al., 2002). A proteína da *GumD* catalisa a primeira etapa da produção de xantana sendo responsável pela a adição da primeira molécula de glicose para a molécula aceptora de isoprenóide (KATZEN et al., 1998). Os mutantes de *X. campestris pv. campestris* sem *gumD* não produzem xantana e o fator de virulência é reduzido (CHOU et al., 1997; KATZEN et al., 1998). A mutação de qualquer outro gene biossintético de *gum* pode induzir a produção de exopolissacarídeos modificados (que pode ainda funcionar na planta), ou sintetizar intermediários tóxicos (KATZEN et al., 1998).

A biossíntese da xantana pode ser bloqueada em diferentes etapas (HARDING; CLEARY; IELPI, 1995). A inativação das enzimas envolvidas na síntese de açúcar nucleotídeo aboliu a produção da xantana e teve efeitos pleiotrópicos, desde que estas enzimas estão também envolvidas na biossíntese da glicana cíclica e lipopolissacarídeos (KOPLIN et al., 1992). Em contraste, a ruptura do gene na região *gum* é provavelmente ocasionada, visando a inativação da enzima restrita a biossíntese do biopolímero.

No exterior da célula microbiana os exopolissacarídeos podem permanecer soltos (como muco viscoso) ou podem estar ligados covalentemente (a um

fosfodiéster ou a um lipídio) na superfície da célula. Neste último caso, o material pode formar uma cápsula, que pode ser reconhecida microscopicamente e que pode estar aderida firmemente à superfície celular (SILVA et al., 2001; WHITFIELD; ROBERTS, 1999).

Um problema que pode ocorrer na síntese de exopolissacarídeos é a presença de polissacarases específicas ou polissacarídeo-liases que degradam o exopolissacarídeo produzido pela bactéria. No periplasma existem produtos intracelulares, nos quais os genes estruturais estão estreitamente associados com aqueles para a biossíntese de polissacarídeos. Caso ocorra lise da célula durante o cultivo, as enzimas podem ser liberadas para o meio extracelular podendo ocorrer à degradação dos produtos poliméricos e a redução drástica da massa. Tais problemas são especialmente pertinentes durante a produção de alginato bacteriano e também na produção comercial de ácido hialurônico. A produção de gelana por *Sphingomonas paucimobilis* também envolve uma gelana-liase enquanto *Xanthomonas campestris* produz uma celulase (CONTI et al., 1994; SUTHERLAND; KENNEDY, 1996).

Estima-se que são utilizados onze ATP para cada cinco hexoses polimerizadas para a síntese da goma xantana. Toda energia excedente do metabolismo de *X. campestris* é direcionada para a biossíntese da goma xantana, resultando em aumento da sua produção (ROSEIRO et al., 1993; JARMAN; PACE, 1984; RYE; LINTON, 1988).

2.5 Fatores que interferem no crescimento de *Xanthomonas* e na produção da xantana.

A produção tecnológica da xantana é realizada em duas etapas sendo a primeira relacionada com a produção do inóculo (crescimento celular) e a segunda com a produção do biopolímero. Um dos fatores que inibem uma maior produção deste polissacarídeo é seu meio de fermentação, onde participam substratos caros. Por este motivo, estudos vêm sendo realizados progressivamente em busca de meios mais baratos para esta produção (PAPOUTSOPOULOS; EKATERINIADOU; KYRIAKIDIS, 1994; BILANOVIC; SHELET; GREEN, 1994; SILVA, 2004).

Para que a produção do biopolímero ocorra de maneira correta, é necessário considerar como primeiro fator o microrganismo em estudo. Alguns parâmetros de

fermentação são também essenciais para obtenção de resultados adequados como: 1) Aeração e agitação (160 rpm para crescimento e produção): necessários para produção industrial da xantana, que é realizada convencionalmente em batelada (aproximadamente 80 horas de duração). 2) Composição do meio de cultivo: uma fonte de carbono (glicose ou sacarose), uma fonte de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, nitrato de amônia ou uréia) e sais. 3) O pH do meio próximo ao da neutralidade e 4) Temperatura: mantida em torno de 28°C. Cada cepa apresenta um tipo de necessidade alimentar, como suas fontes de carbono, e também apresentam diferentes respostas diante de uma mudança no ambiente, podendo ser favorável ou não (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Várias pesquisas indicam que a composição do meio interfere diretamente na qualidade, ou seja, viscosidade do polímero, e foi comprovado que quando os biopolímeros são sintetizados nos meios convencionais estes apresentam maior viscosidade que aqueles que utilizam meios de cultura alternativos como: soro de leite (ANTUNES, 2000). No entanto, Foresti (2003) analisou o meio de cultura alternativo com a presença de arroz infuso e obteve soluções de xantana com viscosidade superior a apresentada pela mesma cepa em meio convencional (LANEUVILLE; PAQUIN; TURGEON, 2000).

A enzima β -galactosidase pertencente a linhagem *X. campestris* possui baixa afinidade com a lactose presente em alguns meios dificultando a síntese do biopolímero (FRANK; SOMKUTI, 1979). No entanto, alguns autores utilizaram o soro de leite como substrato para produção de xantana, mas com duas alternativas: isolando cepas com maior capacidade de hidrólise da lactose ou realizando modificação genética no microrganismo para facilitar a síntese do biopolímero (SCHWARTZ; BODIE, 1985; FU e TSENG, 1990; FU; CHANG; TSENG, 1992; KONÍCEK; KONÍCKOVÁ-RADOCHOVÁ, 1992; PAPOUTSOULOU; KATERINIADOU; KYRIAKIDIS, 1994; DRAHOVSKÁ e TURNA, 1995). Os mesmos autores relataram, no entanto, que as características acrescidas ao microrganismo não se mantiveram estáveis.

Estão descritos vários meios de produção na literatura. Entretanto a composição qualitativa é a mesma e cada suplemento apresenta uma determinada função na produção de polissacarídeo. Os meios para a produção dos polissacarídeos apresentam basicamente uma fonte de fósforo (fosfato de potássio) e nitrogênio (sulfato de amônio) em concentrações adequadas para o crescimento

do microrganismo, uma fonte de carbono (glicose, sacarose, manose, frutose e outras) como reserva energética e ainda oligoelementos como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} , os quais têm um papel importante como cofatores enzimáticos nas vias de produção do polissacarídeo (MARTINS; BRITO; SÁ-CORREIA, 1990; WONG, 1993; MADI; MCNEIL; HARVEY, 1997).

Em geral o tipo e a concentração da fonte de nitrogênio tem uma influência média no fluxo de carbono, na formação de produtos ou na formação de biomassa. Isto já foi relatado no caso da produção de xantana, alginato e gelana, onde uma alta proporção C:N favorece um acúmulo de exopolissacarídeo (NAMPOOTHIRI et al., 2003).

Um dos fatores que interferem na qualidade da produção da goma xantana é a variação do seu peso molecular quando utilizam diferentes substratos (SUTHERLAND, 1993). De acordo com Garcia-Ochoa, Casa e Gómez (1992) vários nutrientes influenciam na produção da goma e crescimento de *X. campestris*: o nitrogênio, fósforo e magnésio para o crescimento, e nitrogênio, fósforo e enxofre para a produção do biopolímero. Quando utilizados em uma alta concentração, o nitrogênio e o fósforo causam um efeito contrário inibindo o crescimento celular e a produção da goma xantana. De acordo com SILMAN e ROGOVIN (1970), o nitrogênio é considerado um componente limitante para o crescimento celular da linhagem NRRL-B-1459 de *X. campestris*.

Alguns pesquisadores descrevem como meios de formação da goma xantana por *X. campestris pv. campestris* NRRL-B-1459: 2% de glicose, 0,02% de nitrogênio e 0,2% de fosfato de potássio (ROGOVIN; ANDERSON; CADMUS, 1961). O meio de cultura consiste geralmente de 2 a 4% de glicose ou sacarose como fonte de carbono, 0,05 a 0,1 % de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, extrato de amônio ou uréia), fósforo e traços de outros minerais. O pH deve ser mantido próximo ao da neutralidade (SILMAN e ROGOVIN, 1970).

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

também interfere na produtividade da goma se o nível de nitrogênio for acima de 0,06%.

LINDBLOM e PATTON (1967) afirmam que quando a linhagem de *Xanthomonas* NRRL-B-1459 é colocada num processo de multiestágios, na qual as células crescem num meio pobre em carboidrato (0,2%), ocorrem duas observações: no primeiro momento há crescimento celular do microrganismo, mas não há produção do biopolímero: já no segundo momento, os autores citam que se pode obter um incremento na produção do polissacarídeo quando há um aumento de concentração de carboidrato.

Na indústria utilizam-se substratos de custo baixo como os melaços residuais da indústria açucareira, água de maceração de milho, açúcar mascavo, bagaços de frutas, sacarose, amido, amido hidrolisado, soro de leite, xarope de milho e de glicose, entre outros. Já os substratos purificados da produção de xantana são utilizados apenas para experimentos, sendo assim em escala laboratorial, devido ao preço alto que eles possuem (SUTHERLAND, 1993; DE VUYST e VERMEIRE, 1994; GREEN; SHELEF; BILANOVIC, 1994; DRAHOVSKA; TURNA, 1995; RAJESWARI; PRAKASH; GHOSH, 1995).

O pH neutro é considerado ótimo pelos pesquisadores para o crescimento de *X. campestris*, mas quando inicia-se a fermentação do polissacarídeo microbiano, o mesmo decresce para 5,0. Isto ocorre devido à presença dos grupos ácidos nos polímeros. Estudos comprovaram que se ocorre o controle do pH, o crescimento microbiano alteraria, fornecendo resultados excelentes, mas não haveria nenhuma interferência na produção (GARCIA-OCHOA; CASA; GÓMEZ, 2000).

A temperatura é um fator importante para o crescimento celular e para a produção do biopolímero. Quando está igual ou menor que 24°C, a formação da goma xantana apresenta um atraso significativo. Entretanto, quando essa temperatura aumenta para 27°C, a biossíntese da xantana segue o crescimento, celular a partir do início da fase exponencial e continua na fase estacionária. No entanto, a 35°C o crescimento torna-se lento e a temperatura elevada ocasiona altas taxas de morte celular (SHU e YANG, 1990).

A partir da década de 70, estudos sobre a cinética da produção de goma xantana foram intensificados, realizados principalmente por Moraine e Rogovin (1971 a, b; 1973), Silman e Rogovin (1972) e Jeanes et al (1976). O crescimento celular foi analisado nestes estudos separadamente da formação do produto, sendo

caracterizado por uma fase log onde o crescimento celular era quase ausente, com rápido declínio da taxa de crescimento já no primeiro dia de fermentação. Este baixo crescimento de *X. campestris* é entendido pela exaustão de algum nutriente limitante, provavelmente o nitrogênio. A formação do polímero foi altamente dependente da temperatura, da concentração de açúcar, do pH, da concentração de oxigênio dissolvido e possivelmente da viscosidade do meio.

2.6 Recuperação dos biopolímeros.

Para a separação do polissacarídeo microbiano, podem ser utilizados alguns tratamentos com a finalidade de obter algumas características no produto final. Quando o biopolímero é tratado com dialdeídos o objetivo é aumentar sua dispersibilidade, reagindo com formaldeído é para aumentar a viscosidade do biopolímero, e com utilização de celulasas consegue-se torná-la compatível com outros polissacarídeos como a CMC (carboxil metil celulose) (LIMA et al., 2001).

De acordo com Garcia-Ochoa, Casas e Gómez (2000), as etapas para a separação do biopolímero são: desativação ou lise das células por meio de processos químicos, mecânicos ou térmicos; remoção da célula por filtração (se preciso, fazer a diluição antes da filtração); recuperação do polímero por precipitação com solventes orgânicos (etanol, álcool isopropílico, misturas de sais e álcool); separação do precipitado/solvente, sendo o precipitado lavado várias vezes com o solvente que é evaporado posteriormente; secagem do biopolímero em secadores contínuos ou em batelada, a vácuo ou com circulação forçada de gás inerte.

Para a recuperação da xantana existe um método tradicional que após a fermentação utiliza-se o etanol. No entanto, o estudo realizado por Medeiros et al (2000) mostrou que a adição de NaCl a 1%, além de reduzir a quantidade de etanol necessária para a precipitação da goma, resulta também em um biopolímero com um valor de viscosidade aparente superior ao recuperado somente com etanol.

A literatura cita também outros métodos alternativos de recuperação primária do biopolímero como, por exemplo, a precipitação seletiva com a utilização de detergentes catiônicos e ainda uma produção insolúvel de polímero por adição de

certos sais e ajuste de pH (PACE, 1991, GARCIA-OCHOA, CASAS; GÓMEZ, 2000; DRUZIAN, 2000).

2.7 Reologia dos biopolímeros.

As características reológicas de um biopolímero dependem diretamente da bactéria utilizada, do processo de fermentação e recuperação, e das condições de utilização da goma. A reologia pode ser definida como o estudo da deformação da matéria, ou o estudo da mobilidade dos fluídos e está ligada com a importância da tecnologia dos alimentos. O estudo da deformabilidade no alimento está relacionado com a quantidade e tipo de água presente no alimento. A reologia dos fluídos é estudada por meio de medidas de viscosidade ou fluidez (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Rottava (2005) *apud* com Pasquel (1999) classificaram o comportamento reológico em dois extremos: sólidos perfeitos (hookeanos) e fluídos perfeitos (newtonianos). Os sólidos ideais se deformam elasticamente e a energia de deformação é completamente recuperada quando cessa o estado de tensão. Já os fluídos ideais escoam, ou seja, se deformam de forma irreversível e a energia de deformação é dissipada na forma de calor. Alguns exemplos: bebidas destiladas, refrigerantes artificiais, leite, soluções de sacarose e de vários sais, óleos etc (BOBBIO, 2001).

Não-newtonianos são considerados os fluídos reais, ou seja, quando há interação entre os componentes de um fluído e essas interações dependem e afetam a velocidade de deformação causada por forças externas. A maioria dos colóides hidrofílicos apresenta este tipo de comportamento como: as pastas de amido e seus derivados, as soluções de gomas e de derivados da celulose, sopas cremosas e maionese etc (BOBBIO, 2001).

De acordo com Krevelen (1990), a viscoplasticidade é um fenômeno que depende e ocorre apenas em sistemas poliméricos. Os fluídos poliméricos apresentam comportamento não-newtoniano em soluções diluídas, sendo possível verificar que em repouso as moléculas do polímero podem assumir uma posição equilibrada de formas (conformação) e aleatória de orientações (configurações). Sob cisalhamento, estas moléculas mudam de forma e se afastam da posição de equilíbrio. As várias moléculas se alinham com as suas vizinhas, reduzindo a

aleatoriedade do sistema molecular, tomando uma orientação global típica de sólidos, originando o comportamento viscoelástico (YOUNG, 1981; NAVARRO, 1997).

A medida da viscosidade aparente de soluções aquosas é considerada um dos indicativos mais importantes que o biopolímero possui propriedade sendo esta de interesse comercial como agente estruturante, espessante ou geleificante (SZCZESNIAK, 1985). O tipo de estrutura molecular e a concentração do polímero são alguns fatores que interferem em sua viscosidade. Quando a concentração do polímero aumenta a viscosidade também aumenta. Este comportamento pode ser atribuído às interações intermoleculares e entrelaçamentos, devido ao acréscimo efetivo nas dimensões da macromolécula e no peso molecular (GARCIA-OCHOA; CASAS; GÓMEZ, 2000).

A cadeia linear apresenta um grau de enrolamento que é reduzido com a ramificação. O polímero ramificado apresenta diferenciação em termos de viscosidade quando comparado com o polímero linear, mesmo apresentando a mesma composição química e peso molecular. A queda da viscosidade com o aumento da ramificação, sempre ocorre quando os ramos não excedem a um dado comprimento, estando relacionado com a alteração no movimento cooperativo dos segmentos da cadeia (DIAZ; VENDRUSCOLO, 2004). Entretanto, alguns pesquisadores relatam que quando as ramificações são longas e enrolam-se entre as cadeias com comprimento maior que o crítico da cadeia, este comportamento aumenta a viscosidade (NAVARRO, 1997; RAO, 1999).

A solubilização do biopolímero é um item importante na viscosidade e que deve ser considerado quando ocorre a adição de xantana em um produto. Diaz (2002) estudou vários métodos de solubilização de xantana utilizando água destilada e incluindo métodos oficiais de solubilização. Apesar de várias pesquisas literárias recomendadas, o autor conclui que o método proposto por Zhang Xuewu et al (1996), o qual descreve o efeito da concentração na viscosidade da goma xantana em temperaturas variáveis foi o que apresentou maior viscosidade aparente da solução de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 24.

As soluções dos biopolímeros podem apresentar dois tipos de comportamento reológico: tixotrópico e pseudoplástico. O comportamento tixotrópico é observado em produtos cosméticos como: loções e xampus, tintas, catchup etc. A retirada do produto da embalagem torna-se mais fácil, não ocorrendo escoamento exagerado e

obtendo uma utilização correta (MOREIRA, 2002). Na goma xantana é observado a tixotropia, relacionada com o conteúdo de piruvato presente na molécula sendo um indicativo de qualidade de goma (SANDFORD et al., 1979). Pseudoplástico é a aplicação de uma força em um sistema aumentando a fluidez e, conseqüentemente, diminuindo a viscosidade (BOBBIO, 2001). A goma xantana permite também que o produto alimentício no qual foi utilizada, seja menos viscoso ao paladar e o sabor seja mais acentuado (CHALLEN, 1993).

A viscosidade pode fornecer importantes informações a respeito das mudanças fundamentais na estrutura do fluído durante um determinado processo, como polimerização, emulsificação e homogeneização. Os testes reológicos a baixa tensão de cisalhamento são importantes para avaliar as características de uma solução, ou mesmo realizar o controle de qualidade de um produto alimentício. É o parâmetro mais indicado para simular as condições de utilização do produto (SCAMPARINI, 1991) e a viscosidade aparente (RAO, 1999).

A maioria das soluções das gomas apresenta uma diminuição da viscosidade de acordo com o aumento da temperatura. Neste sentido destaca-se a goma xantana não apresentando redução da viscosidade quando presente na faixa de temperatura entre 0°C e 100°C (PASQUEL, 1999).

A adição de eletrólito em solução de goma xantana faz com que ocorra redução do valor do módulo elástico. Os polieletrólitos são os responsáveis por este comportamento típico e que resulta na mudança da conformação, causando decréscimo no volume hidrodinâmico, decrescendo assim os valores dos parâmetros reológicos. A adição de eletrólito acima da concentração crítica pode induzir a um aumento nos valores dos parâmetros reológicos por associações intermoleculares, facilitadas pela redução das repulsões eletrostáticas e ordenação das cadeias, conduzindo a uma rede tridimensional (PELLETIER et al., 2001).

A viscosidade das soluções de xantana é dependente da concentração dos sais quando este ultrapassa $0,1\text{mol L}^{-1}$ (KANG; PETTITT, 1993). Diaz (2002) estudou a adição de cloreto de potássio e de sódio em soluções de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 24, verificando que a maior viscosidade aparente apresentada pela solução foi com a adição de cloreto de potássio na concentração de $0,1\text{mol L}^{-1}$. Moreira (2002) também apresenta resultados semelhantes, citando que a presença de cloreto de sódio ajuda a aumentar a viscosidade de soluções de xantana. Entretanto, para os autores Garcia-

Ochoa, Casas e Gómez (2000), quando pequenas quantidades de sais são adicionadas à solução, a viscosidade diminui nas baixas concentrações de xantana. Este efeito tem sido atribuído à redução das dimensões moleculares resultando da diminuição das forças eletrostáticas entre as moléculas.

2.8 Efeito da irradiação por luz ultravioleta no DNA e seleção de mutantes para a produção de xantana.

A radiação ultravioleta cobre uma região do espectro eletromagnético que fica entre 100nm e 400nm (nanômetros). Esta região é particularmente indicada para inativação de microrganismos. A energia a ela associada, quando atinge importantes agrupamentos bioquímicos, pode provocar lesões irreversíveis e organismos não hábeis à sobrevivência. Em 260 nm, seu efeito germicida alcança eficiência máxima, atuando principalmente na dimerização de bases nitrogenadas nos ácidos desoxirribonucléico (DNA) e ribonucléico (RNA) (SKOOG; WEST; HOLLER, 1994).

De acordo com o Comitê Internacional de Iluminação ("Commission International de l'Eclairage"), existe uma classificação para cada tipo de irradiação por luz ultravioleta. UV-A (400-320nm), UV-B (320-280nm) e UV-C (280-200nm), (GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS, 2004). De acordo com Diffey (2002) a irradiação ultravioleta está restrita a uma pequena parte de espectro eletromagnético, que também inclui ondas de rádio, microondas, radiação infravermelho, luz visível, raios-X e radiação gama(γ).

A luz ultravioleta reage altamente com radicais hidroxilas e induz a formação de elétrons na superfície dos fotocatalisadores. Os radicais e elétrons podem decompor uma vasta razão de contaminação como química ou biológica em produtos finais inofensivos tal como CO₂ e H₂O (ZHAO; YANG, 2003).

Nucleotídeos e seus constituintes, como purinas e pirimidinas, sofrem reações envolvendo a alteração espontânea da sua estrutura covalente. Essas reações apresentam velocidade geralmente lenta, porém são fisiologicamente significantes, por serem pouco tolerantes para alterações na informação genética. Quando ocorre alteração na estrutura do DNA, podem levar a alterações permanentes na informação genética codificada, podendo ser transmitidas à prole seguinte. Estas alterações são chamadas de mutações (NELSON; COX, 2002).

Algumas reações são desenvolvidas pela radiação de luz ultravioleta ocasionando uma condensação de dois grupos etílenos para formar um anel ciclobutano. Na célula a mesma reação ocorre entre as bases pirimidínicas adjacentes nos ácidos nucléicos, formando dímeros ciclobutano de pirimidinas (figura 2). No entanto, bactéria e outros organismos possuem enzimas de reparo a essa lesão denominadas de fotolases. Elas utilizam a energia da luz visível para separar o dímero novamente nas duas timinas originais. As enzimas clivam as timinas distorcidas com ligação cruzada abrindo um amplo intervalo. Elas preenchem esse intervalo com o DNA recém-sintetizado complementar a fita oposta não-lesada. Assim a seqüência original de pares de bases é armazenada novamente. A última etapa envolve a enzima ligase, que ocasiona a selagem covalente do esqueleto de DNA. Ocasionalmente esse reparo gera um erro, e a seqüência original de bases não é corretamente rearmazenada, processo denominado de mutação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

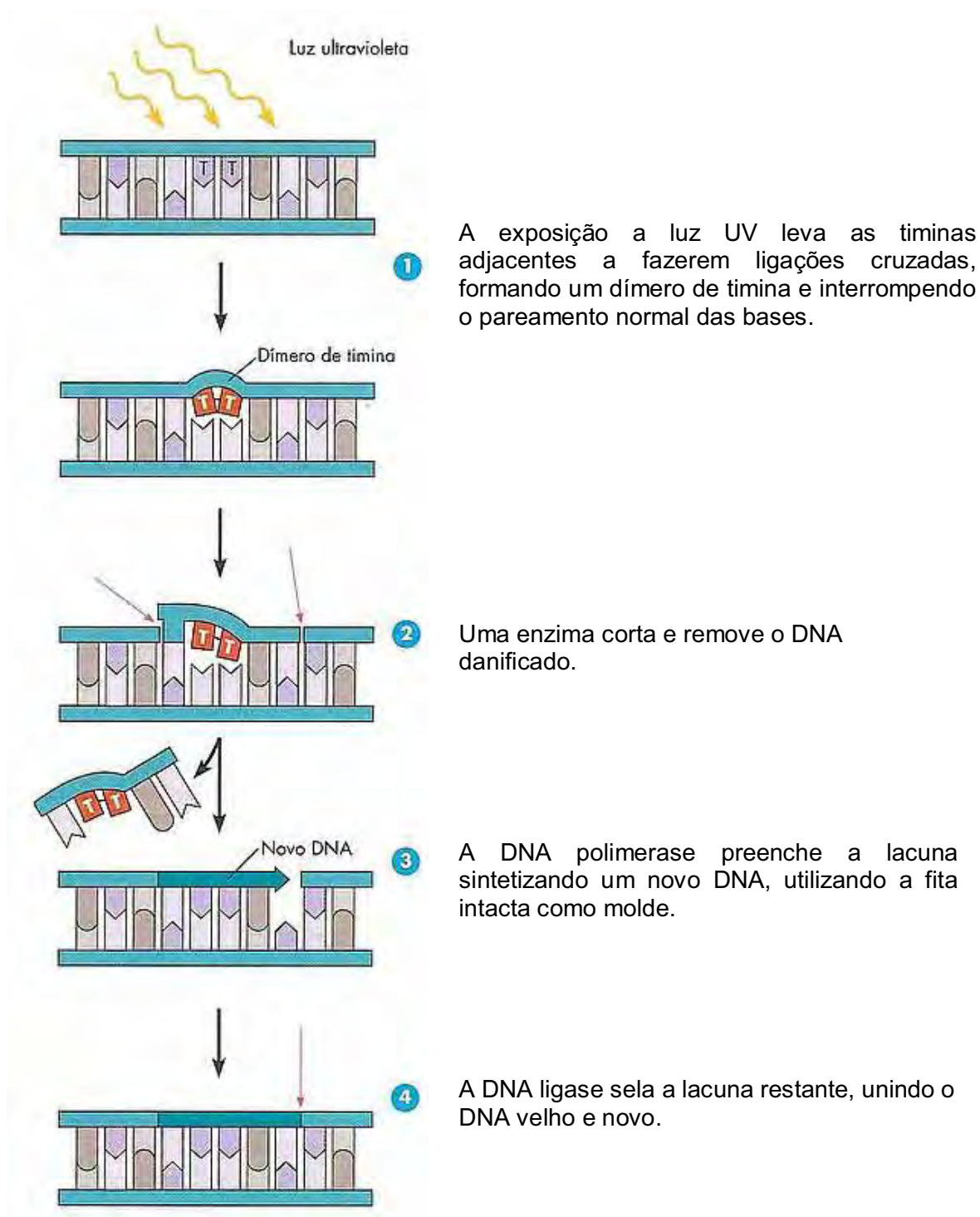


Figura 2. A criação e o reparo de um dímero de timina causado pela luz ultravioleta (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Quando as bases são mutadas a formação de ligações de hidrogênio no filamento oposto é prejudicado. A transcrição do DNA e a replicação são, portanto, bloqueadas, comprometendo assim a função celular e, eventualmente, conduzindo a morte celular. Esta reação ocorre no ácido nucléico e o sistema de desinfecção por UV freqüentemente acarreta a inativação do microrganismo (BLATCHLEY; PEEL, 2001). Entretanto a UV aumenta a transcrição de genes específicos, tal como *uvrA* e *uvrB* em *E. coli* (SANCAR et al., 1982).

A luz ultravioleta é utilizada amplamente como agente antimicrobiano, incluindo desinfecção de água, de ar e desinfecção de superfícies de preparo alimentícios. A inativação de microrganismos como resultado da irradiação UV é quase que totalmente atribuída para reações fotobioquímicas que são induzidas no interior dos microrganismos. As propriedades germicidas da irradiação UV ocorrem devido o DNA absorver a luz ultravioleta causando ligações cruzadas entre as bases de nucleosídeos de pirimidinas vizinhas (timina e citosina) no mesmo filamento de DNA (MILLER; ELASRI, 1999).

Microrganismos suspensos no ar são mais sensíveis à irradiação UV-C do que microrganismos suspensos na água (BINTSIS; LITOPOULOU-ZANETAKI; ROBINSON, 2000). A profundidade de penetração de UV-C na superfície líquida é considerada curta, com a exceção de águas límpidas (SHAMA, 1999). A penetração da luz UV em sucos é aproximadamente 1mm obtendo assim uma absorção de 90% de luz (SIZER; BALASUBRAMANIAN, 1999). O efeito da penetração da irradiação UV-C depende do tipo de líquido que é utilizado, da sua absorção de UV-C, dos sólidos solúveis e das substâncias suspensas em líquidos (GUERRERO-BELTRÁN; BARBOSA-CÁNOVAS, 2005).

A seleção de microrganismos pode ser realizada por mutações espontâneas em meios de cultura seletivos ou podem ser ocasionadas por mutagênese, tal como a luz ultravioleta ou mutagênese química. As mutações mais comumente utilizadas são raios-X, radiação ultravioleta com comprimento de onda de 260nm, agentes químicos: N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina, ácido etilmetanosulfônico e metila, nitrato de sódio, bisulfito de sódio, hidroxilamina, ácidos nucléicos de bases análogos, tais como: 2-aminopurina e 5-bromouracila, e o corante cridina tal como a proflavina. Outros pontos importantes são as inserções de mutação tal como a inserção de seqüências, fago Mu-1, ou transposons tal como: Tn5. As linhagens de *Xanthomonas campestris* podem ser expostas para um ou mais destes mutantes

descritos anteriormente, ou simultaneamente com o crescimento da linhagem no meio de seleção (POLLOCK, 1994).

Modificações genéticas específicas são capazes de aumentar a produção da xantana por meio de mutantes, causando uma resistência a rifampicina e bacitracina. Além disso, a presença de informações genéticas exógenas controlando a síntese de xantana introduzida no interior da linhagem de *X. campestris* (POLLOCK, 1994).

Combinações de informações genéticas via mutação com técnicas de biologia molecular pode selecionar uma linhagem com alta produção de xantana e utilizar a inserção desses genes modificados em outras linhagens. Essas linhagens poderão possuir como marcadores os genes da resistência a antibióticos como bacitracina e rifampicina (POLLOCK, 1994).

A bactéria *X. campestris pv. campestris* sintetiza uma proteína multifuncional denominada de RecA, sendo envolvida em numerosos processos celulares incluindo recombinação de homólogos, reparo de DNA e coordenação de divisão celular. O gene *rec-A* de *X. campestris* (Xc17) foi clonado pela técnica de PCR que amplificou um segmento interno da proteína em Xc17, utilizando oligonucleotídeos. O PCR revelou a presença de 513 oligonucleotídeos. A mutação em Xc17 ocorreu devido a substituição de um gene por um fragmento denominado de *NsiI-Stul* (VIEIRA; MESSING, 1982). A partir dessa substituição gênica, dois mutantes foram formados: L1 e NT3 sendo sensíveis a irradiação UV, 302nm (LEE; LIN; TSENG, 1996). Quando a dosagem de UV foi superior a 30 Jm⁻² nenhum mutante L1 sobreviveu, enquanto que o Xc17 permaneceu em 55% (LEE; LIN; TSENG, 1996).

Aguilar e Rodriguez (1996) observaram o efeito da irradiação provocado por luz ultravioleta durante 60 segundos no microrganismo *X. campestris pv. campestris*. Os resultados obtidos apresentaram uma queda drástica no número de colônias. De 14.000 colônias sobreviveram apenas 42 após a irradiação, indicando uma morte celular de 99,7%. Os mutantes sobreviventes apresentaram diferenças benéficas em relação ao microrganismo não irradiado. Quatro deles produziram maior viscosidade quando comparados com o microrganismo de origem, dois produziram maior concentração de goma. A alteração genética no mutante denominado M-11 fez com que afetasse o seu metabolismo diminuindo drasticamente seu crescimento celular, no entanto sua produção de goma se destacou, sendo 46% superior a linhagem não irradiada.

A inativação induzida pela luz com ação mutagênica em *E. coli* é atribuída aos danos causados no DNA, o qual pode ser modulado pelo processo de reparo ou tolerância (FRIEDBERG; WALKER; SIEDE, 1995). Esses processos são iniciados quando outros processos normais no interior das células encontram certas dificuldades como: dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD), (o fotoproducto mais comum induzido pela irradiação UV) em DNA durante a replicação do genoma. (SOMMER; BAILONE; DEVORET, 1993; WOODGATE, 2001). O processo de reparo e tolerância presumivelmente beneficia a sobrevivência pela estabilização do genoma livre dos danos da UV para replicação (RUPP, 1968; KUZMINOV, 1999).

Yang et al., Wang et al (2005) pesquisaram o efeito fotocatalítico no DNA do plasmídeo localizado em uma bactéria após uma irradiação provocada por luz ultravioleta em diferentes tempos, e concluíram neste estudo que o tempo da irradiação UV no DNA do plasmídeo tem um significativo efeito, provocando danos maiores de acordo com o aumento do tempo de irradiação fazendo com que o efeito fotocatalítico também seja aumentado.

Os autores Destefano e Rosato (1991) realizaram uma conjugação entre um mutante de *X. campestris pv. campestris* e uma linhagem de *Escherichia coli* contendo o transposon Tn5 de fácil utilização e eficiência (GUINEY, 1982) em *X. campestris*. A partir dessa mutação foram isolados 581 mutantes resistentes aos antibióticos estreptomicina e kanamicina (TURNER; BAEBER; DANIELS, 1984). 90 mutantes foram destacados em relação a viscosidade e tamanho das colônias. Independente da fermentação, esse mutantes foram avaliados de acordo com sua viscosidade, e o teste de *Tukey* apresentou 29 mutantes com viscosidade significativamente maior em relação a linhagem original.

3 OBJETIVO GERAL.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da irradiação por luz ultravioleta em *Xanthomonas campestris pv. campestris* visando maior produção de goma xantana e viscosidade.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Submeter à linhagem *Xanthomonas campestris pv. campestris* a irradiação por luz ultravioleta em diferentes tempos de exposição e avaliar a porcentagem de morte celular.
2. Isolar as linhagens resistentes a UV.
3. Comparar as linhagens selecionadas com aquela não irradiada em relação a viscosidade e rendimento da goma e biomassa obtida.

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 “Julio de Mesquita Filho”.

4.1 Materiais.

4.1.1 Microrganismos utilizados.

Para os experimentos de irradiação foi utilizada a bactéria *Xanthomonas campestris pv campestris* FCLA-B-26 da coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia Industrial da UNESP – Campus de Assis (SP), obtida por isolamento (OLIVEIRA, 2002).

4.1.2 Reagentes.

Sacarose (P.A. Labsynth), glicose (P.A. Labsynth), peptonas (Oxoid), Agar-agar (DIFCO), ácido clorídrico, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de amônia, ácido cítrico, ácido bórico, óxido de zinco, cloreto férrico, carbonato de cálcio (todos provenientes da Labsynth), extrato de malte (Oxoid), extrato de levedura (Oxoid), HCl (Labsynth), NaOH e etanol comercial 99° GL.

4.1.3 Equipamentos.

Incubadora orbital com controle de temperatura (TECNAL, Modelo TE-421), centrífuga refrigerada (FANEM-Modelo 215), balança analítica (TECNAL-Modelo TP 2000), estufa de cultura (FANEM-Modelo 002CB), estufa de secagem e esterilização (FANEM-modelo 315SE), autoclave vertical (FABBE-PRIMAR, Modelo 103), espectrofotômetro (PHARMACIA-LKB - Ultrospec III), viscosímetro BROOKFIELD (modelo LVDV II+), Câmara asséptica (Tecnal, Modelo TE - 100) contendo Lâmpada Ultravioleta (UV-C, 253,7nm, PHILIPS, Tuv 15W/ G15 T8, Long Life, Made in Holland), bico de bunsen e vidrarias em geral.

4.2 Métodos.

4.2.1 Etapas da metodologia utilizada.

O fluxograma apresenta as etapas desenvolvidas no presente trabalho.

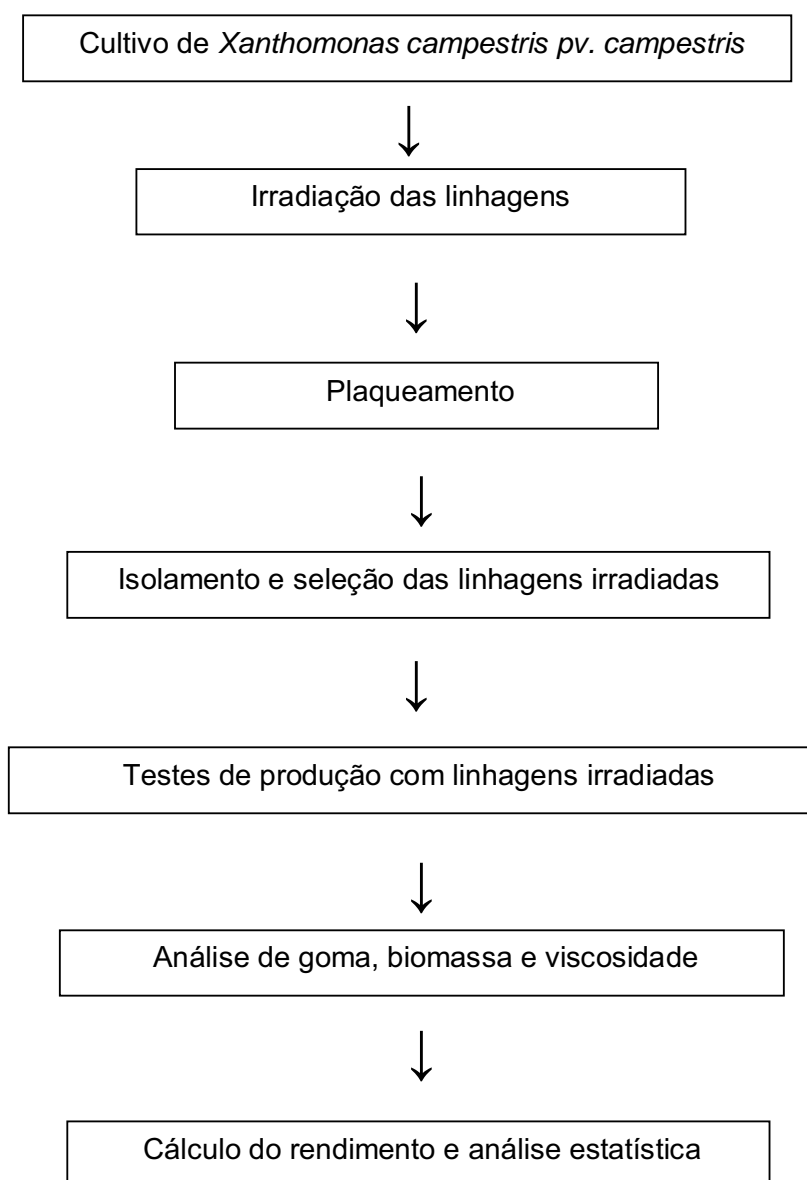


Figura 3: Fluxograma das etapas para obtenção de *Xanthomonas campestris* irradiadas.

4.2.2 Produção de goma xantana.

4.2.3 Cultivo de *Xanthomonas campestris* para testes de irradiação.

Para o crescimento da bactéria, utilizou-se uma cultura estoque, devidamente descongelada sendo posteriormente inoculada em condições assépticas em placas contendo o meio 4 descrito por Silva (2004) sendo: 0,30% de extrato de levedura, 2,50% de sacarose, 0,01% de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,15% de K_2HPO_4 , 0,25% de $(NH_4)_2 HPO_4$ e Agar (meio sólido a 2,0%) e pH ajustado a 6.0. A cultura foi incubada em estufa de cultura a 27°C por um período de 24 a 48 horas.

4.2.4 Preparo da suspensão de *Xanthomonas campestris pv. campestris* e irradiação UV.

Após sucessivos repiques (conforme 4.2.3), foi obtida uma cultura de *X. campestris* a qual foi quantificada por diluições sucessivas em água peptonada e contadas em Câmara de Newbauer. A cultura correspondente a 10^7 cel/mL, foi pipetada de maneira asséptica numa placa de petri contendo 5mL de solução NaCl a 0.9%. Esta placa foi posicionada a uma altura de 10 cm da lâmpada UV (253,7nm) e submetida à irradiação nos tempos de 0, 120, 240 480 e 600 segundos.

4.2.5 Plaqueamento das suspensões de *Xanthomonas campestris pv. campestris* submetidas à irradiação UV.

Foram coletadas, assepticamente, amostras de 1mL das placas de petri contendo soluções fisiológicas de *Xanthomonas campestris* irradiadas. Em seguida, estas foram diluídas em tubos estéreis contendo 9mL de água peptonada a 0.1% e submetida a diluições sucessivas de 10^{-1} a 10^{-6} .

Para o plaqueamento foram utilizadas placas contendo 20 mL do meio 4 citado no item 4.2.3, e os tubos com as diluições de 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} e 10^{-6} . Os testes foram realizados em duplicata.

As placas foram incubadas na estufa durante 120 horas e temperatura de 27°C. A contagem das colônias foi feita preferencialmente em placas possuindo entre 30 e 300 colônias.

4.2.6 Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* irradiadas para a produção de goma xantana.

As linhagens presentes nas placas contendo entre 10 e 100 colônias foram selecionadas e estocadas. O isolamento foi feito através de inoculação asséptica destas culturas em placas contendo o meio 4 (SILVA, 2004), nas condições descritas no item 4.2.3 Após o crescimento das linhagens em placas e verificação de presença de um padrão único de colônias, realizou-se a conservação das mesmas em Nitrogênio Líquido. Esse procedimento foi realizado através da precipitação do inóculo, sendo retirado o sobrenadante e adicionado uma quantia de 10% de glicerol estéril sobre o precipitado. Este foi transferido para ependorfs e armazenados em nitrogênio líquido a temperatura de - 280 °C.

4.2.7 Produção do inóculo de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* para a produção da goma xantana.

Para o crescimento da bactéria foi utilizado o inóculo estoque devidamente descongelado e inoculado em condições assépticas em placas contendo meio 4 descrito por SILVA (2004) descrito na pagina 43. A cultura foi inoculada em estufa de cultura a 27°C por um período de 24 a 48 horas.

Apenas as linhagens submetidas a irradiação por luz ultravioleta (UV-C) no tempo de 600 segundos e a linhagem não irradiada foram utilizadas para testes de produção de biomassa, goma formada, viscosidades do caldo e da solução de goma 1%.

4.2.8 Produção da goma xantana.

Para a produção da goma xantana utilizou-se o meio descrito por Souw; Demain (1979) cuja composição em g/L é apresentada como: Sacarose 40,0; K_2HPO_4 5,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2; $(NH_4)_2SO_4$ 2,0; Ácido cítrico 2,0; H_3BO_3 0,006; ZnO 0,006; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,0024; $CaCO_3$ 0,02. O pH do meio foi ajustado a 7,0 com solução de hidróxido de sódio 1 mol/L antes da esterilização em autoclave 121°C por 15 minutos. Após a inoculação, o meio foi incubado a 29°C em agitador orbital com velocidade de 160 rpm e controle de temperatura, iniciando assim o processo de fermentação com duração de 72 horas.

4.3 Análises físicas e químicas.

4.3.1 Determinação da biomassa.

Ao término do processo fermentativo, foi retirado 50 mL do caldo de fermentação no tempo inicial e após 72 horas de produção da linhagem não irradiada (controle) e das 11 colônias irradiadas de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. O fermentado foi centrifugado a 4000rpm durante 30 minutos e temperatura de 6°C. Após o descarte do sobrenadante, a massa celular obtida foi transferida para uma placa de petri e seca em estufa a 105°C até peso constante. Os resultados foram obtidos em g/L.

4.3.2 Tratamento do caldo da fermentação centrifugado para obtenção de goma.

Para a obtenção da goma, foi retirada 50 mL do sobrenadante do fermentado centrifugado e a este foi adicionado etanol 99°GL (1:4, v/v) para a precipitação da goma. Após, a goma xantana foi retirada com um bastão de vidro e seca em estufa a 45°C durante três dias.

Após a secagem da goma, a mesma foi triturada e reidratada com água destilada a 1% (m/v) para posterior medição de viscosidade. Este procedimento foi

realizado para o caldo de fermentação retirado no tempo inicial e após as 72 horas de fermentação.

4.3.3 Determinação da viscosidade aparente.

A viscosidade aparente do caldo de fermentação no tempo inicial e após 72 horas de fermentação da solução 1% de goma xantana, foi determinada utilizando o viscosímetro rotacional Brookfield LVDVII+, com dispositivo para pequenas amostras, velocidades rotacionais de 20 e 30 rpm e spindles 18 no tempo 0h de fermentação e 31 no tempo de 72 horas de fermentação. A temperatura da amostra foi mantida constante a 25°C.

4.3.4 Análise de Açúcares Redutores Residuais Totais

Para a determinação de Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT) foi empregado o método de Somogy (1945), Nelson (1944). As amostras foram inicialmente hidrolisadas com HCl 2 mol/L, neutralizadas com NaCl 2 mol/L e resfriadas. Após a adição do reativo de Somogy, as soluções foram mantidas em banho-Maria durante 10 minutos e resfriadas novamente. Posteriormente, foi utilizado o reativo de Nelson com a complementação de água destilada para a leitura em espectrofotômetro. Todo experimento foi realizado em triplicata.

4.3.5 Cálculo do rendimento.

O rendimento da goma xantana (Y_p/s) foi calculado pela diferença entre a massa da goma produzida e a presente no início da fermentação, dividido pela massa de açúcar total presente no início subtraído do açúcar residual no final da fermentação.

O rendimento celular (Y_x/s) foi determinado pela divisão entre a biomassa produzida durante a fase de crescimento e o açúcar consumido nesta fase.

4.3.6 Análise estatística.

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio do programa GRAPHAD INSTAT (Rutgers University). Foram utilizados os testes de análise de variância ANOVA (One Way Analysis of Variance) e o teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. O nível de significância adotado pelo programa é de 5%.

4.4 Teste de irradiação com *Xanthomonas campestris pv. campestris* irradiada.

Após análises citadas entre os itens 4.2.3 a 4.3.6, e verificação que a linhagem de *Xanthomonas campestris pv. campestris* irradiada (I₉) se destacou em termos de produção de goma após 72 horas de fermentação, esta foi submetida a uma nova irradiação, com o objetivo de selecionar linhagens mais resistentes a UV e com melhor produção e qualidade de goma.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito de mutações em *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

A Tabela 1 apresenta a porcentagem de redução de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de *Xanthomonas campestris pv. campestris* irradiadas por luz ultravioleta (253,7 nm) nos tempos 0, 120, 240, 480 e 600 segundos. A partir desta Tabela, pode-se verificar que houve um grande aumento de morte celular de acordo com o aumento do tempo de irradiação. O que mais se destacou foi no tempo de 600 segundos de irradiação, onde a taxa de UFC diminuiu drasticamente em 99,2%.

TABELA 1. Efeito de irradiação UV no número de colônias viáveis de *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

Tempo de irradiação (s)	Nº UFC*	% de Redução de UFC
0	1200	—
120	110	90.8%
240	40	96.7%
480	15	98.9%
600	11	99.2%

UFC* Unidade formadora de colônia

De acordo com Woolsey et al. (2005), a inativação dos microrganismos ocasionada por luz UV, ocorreu em função das reações fotobioquímicas levando a mutação. A formação de dímeros de timina causa o bloqueio da transcrição e replicação do DNA, comprometendo a função celular e conduz principalmente para a morte das células. *E.coli* foi inativada quando exposta a irradiação UV, com doses de 30 a 62 J/m², fazendo com que o número de células de *E.coli* diminuíssem drasticamente (WOLFE, 1990). Keyser et al (2007) sugere que a contaminação no suco de frutas pode ser eliminada com a utilização da lâmpada UV, a qual ocasiona uma redução do número de microrganismos presente no mesmo.

Os autores Aguilar e Rodriguez (1996) induziram uma irradiação UV em 14.000 colônias de *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Entretanto, 42 colônias

permaneceram sobreviventes tornando-se mutantes. Isto demonstra que houve uma redução de 300% em relação à linhagem original (não irradiada).

Os autores Vieira e Messing (1982) induziram uma mutação na proteína multifuncional recA de *X. campestris pv. campestris* (Xc17) pela substituição de um gene por um fragmento denominado de *NsiI-Stul*. Dois mutantes foram formados devido a substituição gênica: L1 e NT3. Ambos os mutantes foram sensíveis a irradiação UV (302 nm). Com o aumento da dosagem de UV, a taxa de sobrevivência diminuiu drasticamente. Em doses superiores a 30 Jm⁻² não houve sobrevivência do mutante L1, enquanto que Xc17 obteve aproximadamente 55% de sobrevivência (LEE; LIN; TSENG, 1996). Estes testes apresentaram semelhança com os resultados obtidos neste trabalho, comprovando que a irradiação UV diminuiu drasticamente o número de colônias bacterianas.

5.2 Irradiação UV na produção de biomassa de *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

De acordo com Aguilar e Rodriguez (1996) um mutante denominado M-11 da linhagem de *X. campestris* irradiada por 60 segundos mostrou um baixo crescimento celular, comparado com a linhagem controle (*Xanthomonas campestris* não irradiada). A concentração de biomassa na linhagem não irradiada (3,37 g/L) foi superior (129%) em relação a média das linhagens irradiadas (I6, I7, I9 e I10) destacadas na produção de goma. Isto demonstra que a irradiação diminuiu o metabolismo para a produção de biomassa, porém estimula a produção do biopolímero (Tabela 2, 3 e 4).

5.3 Irradiação UV na produção de goma de *Xanthomonas campestris pv. campestris*.

De acordo com as Tabelas 2, 3 e 4 verifica-se que houve um expressivo aumento na produção de goma com utilização do meio Souw e Demain (1979) em algumas linhagens irradiadas (I6, I7, I9 e I10) em relação ao controle não irradiado. Enquanto o controle apresenta 3,15 g/L de goma xantana, a média das linhagens destacadas foi de 6,41 g/L, ou seja, um aumento de 102%. Oliveira (2002) encontrou resultados semelhantes em linhagens de *Xanthomonas* isoladas, porém não

irradiadas. As linhagens que mais produziram biomassa eram as que menos produziam xantana. Aguilar e Rodriguez (1996), observaram que houve uma alta produção de goma nas linhagens irradiadas sendo esta superior em 33% quando comparadas com a linhagem selvagem. Estes resultados provam que o açúcar foi convenientemente desviado para a produção de goma em detrimento de biomassa, sendo coerentes com os resultados obtidos neste trabalho.

TABELA 2. Produção da biomassa nas linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* antes e após irradiação UV.

<i>Xanthomonas campestris</i>	Biomassa g/L					
	0h			72h		
	\bar{X}	\pm	DP	\bar{X}	\pm	DP
NI	0,83	\pm	0,65	4,2	\pm	0,82
I1	1,03	\pm	0,23	4,07	\pm	0,36
I2	2,05	\pm	0,63	3,43	\pm	0,59
I3	1,71	\pm	0,36	3,11	\pm	0,97
I4	2,01	\pm	0,38	4,39	\pm	1,48
I5	1,83	\pm	0,36	2,65	\pm	0,48
I6	1,37	\pm	0,47	2,14	\pm	0,39
I7	1,14	\pm	0,45	3,11	\pm	0,05
I8	1,61	\pm	0,25	3,77	\pm	0,31
I9	1,79	\pm	0,62	3,71	\pm	0,14
I10	2,9	\pm	0,63	3,94	\pm	0,66
I11	2,99	\pm	0,25	4,07	\pm	0,67

NI: Linhagem não irradiada; I1 Linhagem irradiada; \bar{X} : Média e DP: Desvio Padrão.

TABELA 3. Produção de goma obtida pela linhagem de *X. campestris* antes e após irradiação UV.

<i>Xanthomonas campestris</i>	Goma g/L					
	\bar{X}	0h	DP	\bar{X}	72h	DP
NI	1,38	±	0,37	4,54	±	0,37
I1	0,91	±	0,40	6,03	±	0,63
I2	1,33	±	0,21	6,27	±	0,57
I3	1,00	±	0,53	6,19	±	0,29
I4	1,70	±	0,23	5,76	±	1,01
I5	0,49	±	0,41	5,95	±	0,55
I6	0,18	±	0,06	6,71	±	0,05
I7	0,38	±	0,04	7,01	±	0,19
I8	2,31	±	0,43	6,41	±	0,22
I9	0	±	0	6,28	±	0,07
I10	0,11	±	0,01	6,23	±	0,34
I11	1,30	±	0,37	6,12	±	0,66

NI: Linhagem não irradiada; I1 Linhagem irradiada; \bar{X} : Média e DP: Desvio Padrão.

A Tabela 4 e Figura 4 apresentam em g/L a produção de biomassa e de goma produzida pelas linhagens não irradiadas e irradiada por luz UV de *X. campestris*. A linhagem mutante foi benéfica em termos de produção de goma em relação à linhagem não irradiada. As análises estatísticas (Teste de *Tukey*) comprovaram que a produção de biomassa e goma foram significativas.

TABELA 4. Média de biomassa e goma produzida em g/L.

<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i>	Biomassa g/L			Goma (g/L)		
	\bar{X}	DP	<i>Tukey</i> *	\bar{X}	DP	<i>Tukey</i> *
NI	3,37	0,20	a	3,15	0,69	a
I1	3,04	0,35	a	5,13	0,34	a
I2	1,38	0,60	a	4,94	0,25	a
I3	1,40	1,0	a	5,19	0,73	a
I4	2,38	1,64	a	4,1	1,10	a
I5	0,79	0,50	b	5,47	0,45	b
I6	1,23	0,81	a	6,59	0,14	b
I7	1,97	0,42	a	6,63	0,22	b
I8	2,16	0,20	a	3,37	1,27	a
I9	1,62	0,07	a	6,28	0,07	b
I10	1,04	1,18	a	6,15	0,38	b
I11	1,08	0,87	a	5,25	1,13	b

NI: Linhagem não irradiada; I1 Linhagem irradiada; \bar{X} : Média e DP: Desvio Padrão; Produção de goma (ANOVA, F= 8.361, P= < 0.0001); Produção de biomassa (ANOVA, F=3.157, P= 0.0090); * Médias das linhagens de *X. campestris* com letras iguais não diferem estatisticamente (*Tukey* p<0.05).

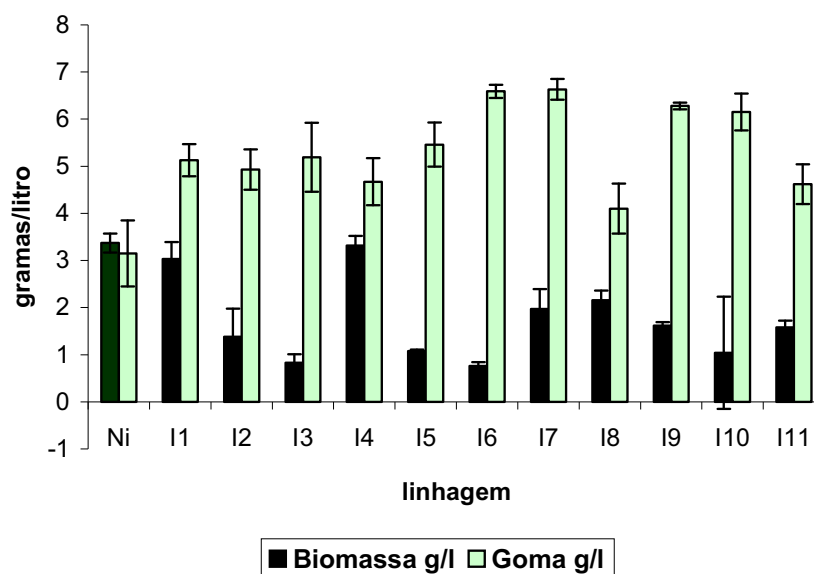


FIGURA 4 Concentração de biomassa e goma xantana com desvio padrão das 11 linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* irradiadas por luz UV e a linhagem da mesma não irradiada, produzida durante a fermentação após 72h e a 29 °C.

5.4 Viscosidade aparente do caldo de fermentação das linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* irradiadas e não irradiada.

A Tabela 5 e Figura 5 apresentam a comparação entre a viscosidade aparente do caldo de fermentação obtido utilizando linhagens irradiadas de *X. campestris pv. campestris* e linhagem não irradiada, nas velocidades rotacionais de 20 e 30 rpm.

A linhagem que apresentou maior viscosidade aparente foi a irradiada I4 independente da velocidade rotacional. Na rotação de 20rpm a linhagem I4 obteve um aumento de 97% na viscosidade em relação a NI, enquanto que na rotação de 30 rpm o aumento foi na ordem de 90%. A média do total das linhagens irradiadas apresentou a viscosidade 48% superior a NI em ambas taxas de cisalhamento. Estes resultados demonstraram que a técnica de irradiação UV foi eficiente no aumento da viscosidade aparente. No entanto, os autores Destefano e Rosato (1991) concluíram em suas pesquisas que a mutação ocasionada pelo plasmídeo Tn5 de *E. coli* WR 6060 em *Xanthomonas campestris* ocasionou uma viscosidade com uma taxa de 173% superior quando comparada com a linhagem mutante por

UV apresentada neste trabalho. Tais resultados irão contribuir para o aperfeiçoamento da tecnologia de produção da goma xantana, já que viscosidade é um atributo que reflete na qualidade da goma. Os resultados estão coerentes com as pesquisas realizadas por Aguilar e Rodriguez (1996), que verificaram também um aumento de 15,4% na viscosidade do caldo fermentado utilizando mutantes (por luz UV durante 60 segundos) da linhagem *X. campestris pv. campestris*. De acordo com análises de ANOVA e *Tukey*, a viscosidade aparente do caldo de mutantes e selvagens não apresentaram diferenças significativas.

TABELA 5. Viscosidade aparente do caldo após fermentação de *X. campestris pv. campestris* antes e após irradiação por luz UV.

<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i>	Viscosidade aparente do Caldo (cP)							
		20 rpm				30 rpm		
	\bar{X}	\pm	DP	<i>Tukey</i> *	\bar{X}	\pm	DP	<i>Tukey</i> *
NI	181	\pm	106	a	163	\pm	86	a
I1	248	\pm	29	a	226	\pm	24	a
I2	277	\pm	46	a	249	\pm	35	a
I3	254	\pm	12	a	230	\pm	10	a
I4	356	\pm	251	a	309	\pm	208	a
I5	344	\pm	105	a	304	\pm	82	a
I6	296	\pm	59	a	296	\pm	52	a
I7	277	\pm	146	a	247	\pm	118	a
I8	202	\pm	48	a	185	\pm	41	a
I9	243	\pm	72	a	221	\pm	58	a
I10	201	\pm	44	a	185	\pm	41	a
I11	248	\pm	32	a	223	\pm	27	a

NI: Linhagem não irradiada; I1 Linhagem irradiada; \bar{X} : Média e DP: Desvio Padrão; * Médias das linhagens de *X. campestris* com letras iguais não diferem estatisticamente (*Tukey* $p < 0.05$).

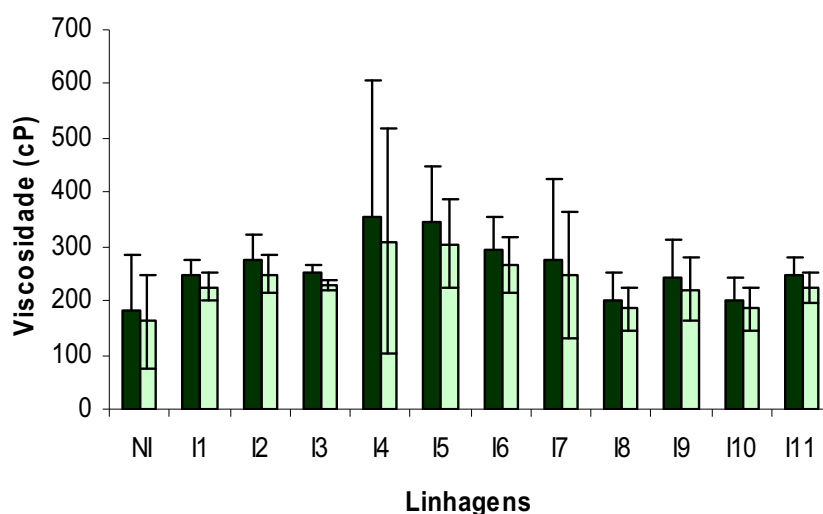


FIGURA 5 Viscosidade aparente do caldo em 20 e 30 rpm após fermentação de 72h a 29°C, de 11 linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* submetidas à irradiação por luz UV e linhagem não irradiada com média e desvio padrão.

5.5 Viscosidade aparente da solução de xantana 1% das linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* irradiadas e não irradiada.

A Tabela 6 e Figura 6 mostram a viscosidade da solução de goma 1% utilizando NI e linhagens irradiadas de *X. campestris*. A I9 foi superior a NI na ordem de 17% e 16% respectivamente nas rotações de 20rpm e 30rpm. De acordo com os autores Aguilar e Rodriguez (1996), *Xanthomonas campestris pv. campestris* mutantes apresentaram um exopolissacarídeo sendo 40% mais viscoso quando comparado com a mesma NI. Portanto, há concordância entre os resultados desses autores com os do presente trabalho, porém o tempo de irradiação descrito pelos autores foi de 60 segundos.

De acordo com os autores Destefano e Rosato (1991), a conjugação entre um mutante de *Xanthomonas campestris pv. campestris* e uma linhagem de *Escherichia coli*, contendo o transposon Tn5, apresentou uma linhagem com viscosidade da solução de xantana 1% superior a 78% analisadas em 20 rpm em relação a linhagem irradiada por luz UV obtida neste trabalho. Isso comprova que a mutação realizada por conjugação foi mais eficaz em relação à viscosidade do que a mutação por UV.

TABELA 6 Viscosidade aparente da solução de xantana 1% após fermentação de *X. campestris pv. campestris* antes e após irradiação por luz UV.

<i>Xanthomonas campestris</i>	Viscosidade aparente da solução de xantana 1% (cP)							
	20 rpm				30 rpm			
	\bar{X}	\pm	DP	Tukey*	\bar{X}	\pm	DP	Tukey*
NI	495	\pm	112	a	423	\pm	94	a
I1	391	\pm	150	a	341	\pm	127	a
I2	299	\pm	127	a	271	\pm	104	a
I3	288	\pm	141	a	264	\pm	115	a
I4	449	\pm	111	a	381	\pm	89	a
I5	461	\pm	105	a	401	\pm	86	a
I6	247	\pm	50	a	235	\pm	43	a
I7	257	\pm	62	a	240	\pm	51	a
I8	385	\pm	57	a	337	\pm	41	a
I9	577	\pm	241	a	489	\pm	171	a
I10	282	\pm	92	a	263	\pm	69	a
I11	463	\pm	101	a	401	\pm	84	a

NI: Linhagem não irradiada; I1 Linhagem irradiada; \bar{X} : Média e DP: Desvio Padrão; Viscosidade da solução de xantana 1% em 20 rpm (ANOVA, $F= 2.304$), $p < 0.05^*$ Médias das linhagens de *X. campestris* com letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey $p < 0.05$).

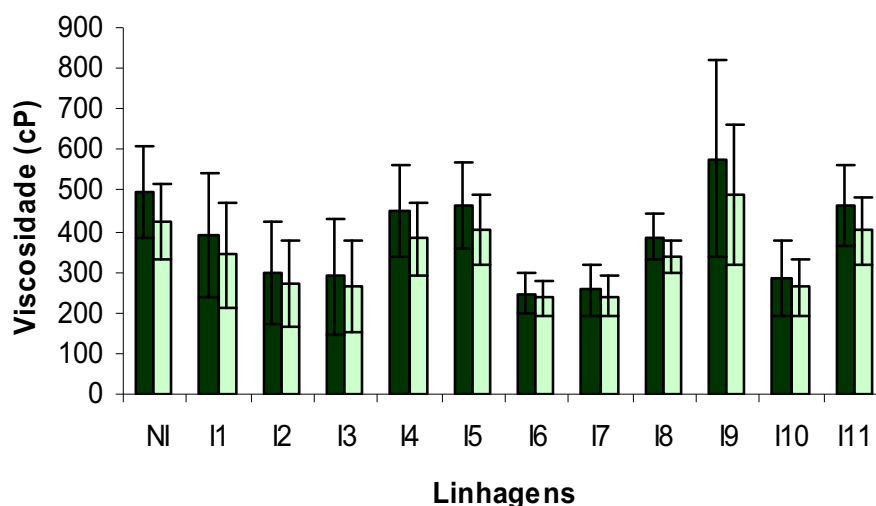


FIGURA 6 Viscosidade aparente da solução de xantana 1% em 20 e 30 rpm após fermentação de 72 h a 29°C, de 11 linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* submetidas à irradiação por luz UV e linhagem não irradiada com média e desvio padrão.

5.6 Efeito da irradiação UV no rendimento de biomassa das linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* irradiadas e não irradiada.

O resultado do rendimento da biomassa (Y_x/s) está coerente com os padrões esperados, pois durante a fermentação esperou-se que não ocorresse aumento de biomassa, mas sim uma maior produção de goma, devido o meio Souw e Demain (1979) ser eficaz na produção do biopolímero. O maior rendimento de biomassa ocorreu nas linhagens I₄ e I₉ sendo 300% superior em relação à não irradiada (Tabela 7 e Figura 7).

5.7 Efeito da irradiação UV no rendimento de goma das linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* irradiadas e não irradiada.

A média do rendimento de goma nas linhagens irradiadas por UV foi de 46% superior em relação a linhagens modificadas pelo método de conjugação descrito por Destefano e Rosato (1991). No entanto, ambas metodologias (UV e conjugação) mostraram um maior rendimento nas linhagens modificadas em relação a linhagem padrão (não modificada). A média das linhagens irradiadas I₅, I₆ e I₇ foi 32% superior a NI (linhagem não irradiada). Apesar do teste ANOVA ter apresentado significância no rendimento de goma, na avaliação de *Tukey* essa significância não foi confirmada (Tabela 7 e Figura 8).

TABELA 7. Rendimento de biomassa e goma de *X. campestris* irradiada e não irradiada.

<i>Xanthomonas campestris</i>	$Y_{x/s}$ (g/g)				$Y_{p/s}$ (g/g)			
	\bar{X}	\pm	DP	Tukey*	\bar{X}	\pm	DP	Tukey*
NI	0,04	\pm	0,02	a	0,34	\pm	0,23	a
I1	0,11	\pm	0,10	a	0,35	\pm	0,03	a
I2	0,10	\pm	0,06	a	0,31	\pm	0,06	a
I3	0,11	\pm	0,06	a	0,33	\pm	0,02	a
I4	0,16	\pm	0,02	a	0,15	\pm	0,08	a
I5	0,05	\pm	0,01	a	0,48	\pm	0,16	a
I6	0,12	\pm	0,05	a	0,42	\pm	0,09	a
I7	0,12	\pm	0,01	a	0,44	\pm	0,01	a
I8	0,11	\pm	0,06	a	0,33	\pm	0,02	a
I9	0,15	\pm	0,03	a	0,36	\pm	0,04	a
I10	0,09	\pm	0,045	a	0,34	\pm	0,01	a
I11	0,07	\pm	0,02	a	0,39	\pm	0,04	a

NI: Linhagem não irradiada; I1 Linhagem irradiada; \bar{X} : Média e DP: Desvio Padrão; Rendimento da biomassa (ANOVA, $F= 1.263$, $p> 0.05$); Rendimento da goma (ANOVA $F=2.455$, $p < 0.05$); * Médias das linhagens de *X. campestris* com letras iguais não diferem estatisticamente (Tukey $p<0.05$).

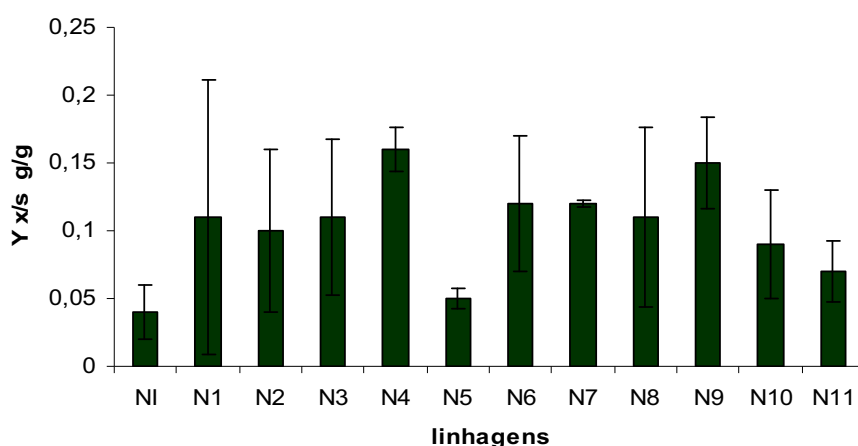


FIGURA 7 A comparação do rendimento e o desvio padrão da biomassa, nas linhagens irradiadas de *Xanthomonas campestris pv. campestris* e a linhagem padrão (não irradiada).

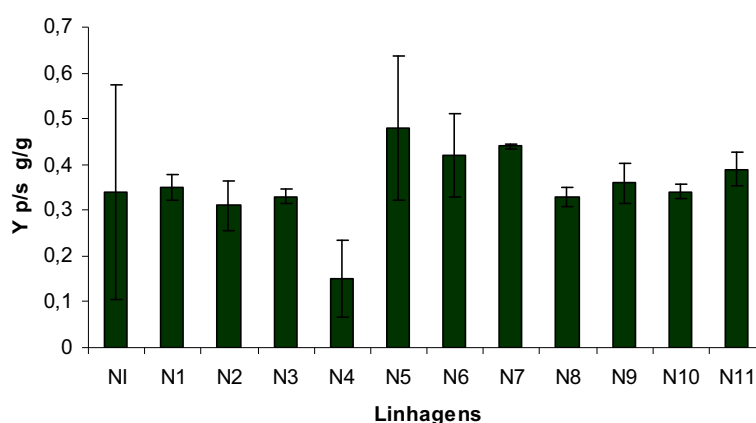


FIGURA 8 A comparação do rendimento de goma e o desvio padrão nas linhagens irradiadas de *Xanthomonas campestris pv. campestris* e a linhagem padrão (não irradiada).

5.8 Linhagem irradiada I9 submetida a uma nova irradiação UV por 600 segundos.

A linhagem irradiada durante 600 segundos e que foi novamente irradiada utilizando as mesmas técnicas e o mesmo tempo de irradiação, mostrou ser mais sensível à luz UV, ocorrendo à morte total das células, não permitindo novas análises de produção, viscosidade e rendimento de goma.

6. CONCLUSÃO

A técnica de irradiação empregada é eficaz na morte celular e na seleção de linhagens com capacidade metabólica diferente da linhagem não irradiada. O crescimento celular é afetado, diminuindo a produção da biomassa. No entanto, a irradiação permite a seleção de linhagens com maior produção e qualidade do biopolímero mensurada pela viscosidade.

A linhagem I9, a qual sofreu duas irradiações sucessivas, demonstra que linhagens irradiadas são mais sensíveis a novas irradiações ocasionando 100% de morte celular.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, L.; RODRIGUEZ, H. Detection of *Xanthomonas campestris* mutants with increased xanthan production. **Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology**, Cuba, v.18, p. 232-234, 1996.

ANTUNES, A. E. C. **Produção, viscosidade e composição de xantana por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* em meios convencionais e alternativos**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO: **Compêndio da Legislação de Alimentos**: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos (Decreto lei nº55871; 1965). 5 ver. São Paulo, v. 1, 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO: **Compêndio de Legislação de Alimentos**. São Paulo. ABIA, 1989/1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO, disponível em www.Abia.org.Br, consultado em 15.10.2004.

ATKINS, P. **Princípios de Química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. São Paulo: Bookman, 2001. p. 698-701.

BAIRD, J.K.; PETTITT, D.J. Biogymns used in food and made by fermentation. In: GOLDBERG, I.; WILLIAMS, R. **Biotechnology and food Ingredients**. 9.ed New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. cap. 9, p. 223-263.

BARBER, C.E.; TANG, J.L.; FENG, J.X.; PAN, M.Q.; WILSON, T.J.G.; SLATER, H.; DOW, P.; DANIELS, M.J. A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. **Mol. Microbiol.** n. 24, p. 555–566, 1997.

BARRERE, G. C.; BARBER, C. E.; DANIELS, M. J. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 8, p. 372-374, 1986.

BERWANGER, A. L. S. **Produção e Caracterização de Biopolímero Sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechin, 2005.

BETZ, D.A. Xanthan gum, a biosynthetic polysaccharide for the food industry. **Food Technology in Austrália**, p.11-16, jan.; 1979.

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

BINTSIS, T., LITOPOULOU-TZANETAKI, E., ROBINSON, R. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – A critical review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, p. 637-645, 2000.

BLATCHLEY III, E.R., PEEL, M.M., Disinfection by ultraviolet irradiation. In: Block, S.S. **Disinfection, Sterilization, and Preservation**. New York: Lippincott Williams e Wilkins, 2001, cap.41, p.823-851.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F.O. Dispersões e Reologia. In: _____. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Varela, 3. ed., 2001, p.24-29.

BRADBURY, J. F. *Xanthomonas*. Dowson. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, v.1,1984. p.199-210.

CAPAGE, M.R.; DOHERTY, D.H.; BETLACH, M.R.; VANDERSLICE, R.W. Recombinant-DNA mediated production of xanthan gum. **International patent WO87/05938**, 1987.

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

CHOU, F.L.; CHOU, H.C.; LIN, Y.S.; YANG, N.T.; LIN, N.T.; WENG, S.F.; TSENG, Y.H. The *Xanthomonas campestris gumD* gene required for synthesis of xanthan gum is involved in normal pigmentation and virulence in causing black rot. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** n. 233, p. 265–269, 1997.

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

CIVEROLO, E. L.; HATTINGH, M. J. *Xanthomonas campestris pv pruni*: cause of prunus bacterial spot. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman e Hall, 1993. p. 60-64.

CONTI, E.; FLAIBANI, A.; REGAN, M.; SUTHERLAND, I. W. Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: production and properties. **Microbiology**, New York, v. 140, p. 1128 -1132, 1994.

COPLIN, D.L.; COOK, D. Molecular Genetics of Extracellular Polysaccharide Biosynthesis in Vascular Phytopathogenic Bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, n. 5, p. 271-279, 1990.

COTTRELL, I.W. KANG, K. S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 19, p. 117-131, 1978.

CROSSMAN, L. C.; DOW, J. M.; FINDLAY, K.; HE, Y.- Q.; FENG, J. X.; TANG, J. L. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signalling and is required for full virulence to plants. **Proc. Natl. Acad. Sci.** p. 10995–11000, 2003.

CRUZ, C. H. G. **Contribuição ao estudo dos fatores envolvidos na produção da goma xantana por *Xanthomonas manihotis***. 1983. 41 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 1983.

DANIELS, M.J.; BARBER, C.E.; TURNER, P.C.; SAWCZYC, M.K.; BYRDE, R.J.W.; FIELDING, A.H. Cloning of genes involved in pathogenicity of *Xanthomonas campestris pv. campestris* using the broad host range cosmid pLAFR1. **EMBO J.** v.3, p. 3323–3328, 1984.

DA SILVA, A.C.; FERRO, J.A.; REINACH, F.C.; FARAH, C.S.; FURLAN, L.R.; QUAGGIO, R.B. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. **Nature (London)**. n. 417, p. 459–463, 2002.

DA SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **Fed Eur Microbiol Soc Lett.** n. 203, p. 165-171, 2001.

DENNY, T.P. Involvement of bacterial polysaccharide in plant pathogenesis. **Annu Rev Phytopathol.** v. 33, p. 173–197, 1995.

DESTEFANO, S.A.L.; ROSATO, Y.B. Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. **Rev. Brasil. Genet.** n. 14, v. 3, p. 599-607, 1991.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B.; VANINGELGEM, F. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 2, p. 687-707, 2001.

DHARMAPURI, S. SONTI, R. V. A transposon insertion in the *gumG* homologue of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causes loss of extracellular polysaccharide production and virulence. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.)**, n. 179, p. 53-59, 1999.

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

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

DRAHOVSKÁ, H.; TURNA, J. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* with a minimum derivative. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 811-812, 1995.

DRUZIAN, J.I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.).** 2000. 179 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2000.

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

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

FOOD and DRUG ADMINISTRATION. Food additives permitted in food for human consumption: xanthan gum. **Federal Register**, Washington, v. 34, n. 53, p. 5376, 1969.

FORESTI, A. P. **Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* em meios modificados**.2003. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2003.

FRIEDBERG, E.C.; WALKER, G.C.; SIEDE, W. DNA Repair and Mutagenesis, **ASM Press**, Washington DC, 1995.

FU, J. F.; TSENG, Y. H. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. **Appl Environ Microbiol.** v. 56, p. 919-923, 1990.

FU, J. F.; CHANG, R. Y.; TSENG, Y. H. Construction of stable lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* by chromosomal integration of cloned *lac* genes using filamentous phage ϕ Lf DNA. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 225-229, 1992.

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

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

GARCIA-CRUZ, C. H. Uso de hidrocolóides em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 87, p. 19-29, 2001.

GARCIA-OCHOA, F.; CASA, A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 1-31, 2000.

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

GREEN, M.; SHELEF, G.; BILANOVIC, D. The effect of various citrus waste fractions of xanthan fermentation. **The Chemical Engineering Journal**, v. 56, p. 37- 41, 1994.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. **Food Science and Technology International**, v. 10, p. 137-148, 2004.

GUERRERO-BELTRÁN, J.A.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Reduction of *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. **Journal of Food Process Engineering**, v. 28, p. 437-452, 2005.

GUINEY, D. G. Host range of conjugation and replication functions of the *Escherichia coli* sex plasmid. **J. Mol. Biol.** n. 162, p. 699-703, 1982.

HARDING, N. E., CLEARY, J. M., IELPI, L. Genetic and Biochemistry of Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris*, L. In: HUI, Y. H., KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**. USA: VCH, 1995, p. 495-514.

HARDING, N.E.; CLEARY, J.M.; CABANAS, D.K.; ROSEN, I.G.; KANG, K.S. Genetic and physical analysis of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.** n. 169, p. 2854-2861, 1987.

HARDING, N.E.; RAFFO, S.; RAIMOND, A.; CLEARY, J.M.; IELPI, L. Identification, Genetic and Biochemical Analysis of Genes Involved in Synthesis of Sugar Nucleotide Precursors of Xanthan Gum. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 447-457, 1993.

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

HOTTE, B.; RATH-ARNOLD, I.; PUHIER, A.; SIMON, R. Cloning and analysis of a 35.3 kilobase DNA region involved in exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **J. Bacteriol.** n. 172, p. 2804-2807, 1990.

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

IELPI, L.R.; COUSO, R.O.; DANKERT, M.A. Xanthan gum biosynthesis: acetylation occurs at the prenyl-phospho-sugar stage. **Biochem. Int.** n. 6, p. 323-333, 1983.

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

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

KAMOUN, S.; KADO, C.L. Phenotypic switching affecting chemotaxis, xanthan production and virulence in *Xanthomonas campestris*. **Appl Environ Microbiol.** n. 56, p. 3855-3860, 1990.

KANG, K. S.; PETTIT, D.J. Xanthan, gellan, welan, and rhamnan. In: WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. **Polysaccharides and their derivatives**. 3.ed. USA, San Diego: Academic Press, 1993, p. 341-349.

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

KATZEN, F. D.; FERREIRO, U.; ODDO, C.G.; IELMINI, M.V.; BECKER, A.; PUHLER, A.; IELPI, L. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **J. Bacteriol.** 1998. p.1607-1617.

KEYSER, M.; MULLER, I.A.; CILLIERS, F.P.; NEL, W.; GOUWS, P.A. Ultraviolet Radiation as a Non-Thermal Treatment for the Inactivation of Microorganism in Fruit Juice. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, p. 127, 2007.

KÖPLIN, R. ARNOLD, W.; HOTTE, B.; SIMONI, R.; WANG, G.E.; PULHER, A. Genetics of Xanthan Production in *X. campestris*: the xanA and xanB Genes are Involved In UDP-Glucose and GDP-Mannose Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**. v. 174, n. 1, p. 191-199, 1992.

KREVELEN, D. W. V. Properties of polymers. São Paulo: **Elsevier**, 3. ed ,1990.

KUZMINOV, A. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 63, p. 751-813,1999.

LANEUVILLE, S. I.; PAQUIN, P.; TURGEON, S. L. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein xanthan gum complexes. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 14, p. 305-314, 2000.

LAWS, A., GU, Y., MARSHALL, V. Biosynthesis, characterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 597-625, 2001.

LEE, T.C.; LIN, N.T.; TSENG, Y.H. Isolation and characterization of the *recA* gene Of *Xanthomonas campestris pv. campestris*. **Biochem Biophys Res Commun**. n. 221, p. 459-465, 1996.

LEE, J. D. Química Inorgânica: um novo texto conciso. São Paulo: **Edgard Blucher**, p.133-258, 1980.

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

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

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

MADI, N. B.; MCNEIL, B.; HARVEY, M. Effect of exogenous calcium on morphological development and biopolymer synthesis in the fungus *Aureobasidium pullulans*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 21, p.102-107, 1997.

MARTINS, L. O.; BRITO, L. C.; SÁ-CORREIA, I. Roles of Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} n alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 12, p. 794-799, 1990.

MAUGERI, F. Produção de polissacarídeos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda. v. 3, 2001.

MAURY, A.; ROQUE, J. Lês Polysaccharides. **Biofutur**. n. 49, v. 32, p. 17-31, 1986.

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

MILLER, R.; ELASRI, M. O. Bacteria responses to ultraviolet light. **Am. Soc. Microbiol.** v. 65, p. 535-541, 1999.

MISAKI, A. Structural Aspects of Some Functional Polysaccharides. In: NISHINARI, K.; DOI, E. **Food hydrocolloids: structures, properties, and functions**. New York: Plenum Press, 1993. p. 1-19.

MONSAN, P.; BOZONNET. C.; ALBENNE, C.; JOUCLA, G.; WILLWMOT, R. M.; RENAUD-SIMÉON, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 673-683, 2001.

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

_____. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH-control. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 13, p. 381-391, 1971a.

_____. Xanthan biopolymer production at increased concentration by pH-control. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 13, p. 381-391, 1971b.

_____. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. p. 12-17, 1966.

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

MORRIS, E. R. Molecular origin of xanthan solution properties. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, Washington, v. 172, p. 19-19, 1976.

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

_____, V. J. Science, structure and applications of microbial polysaccharides. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P.A. **Gums and Stabilisers for the Food Industry**. Oxford: IRL Press, 1992, p. 315-328.

NAMPOOTHIRI, K. et al. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1513-1519, 2003.

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

NAVARRO, F.N. Aplicação de um Modelo Reológico. **Fundamentos de Reologia de Polímeros**, Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, p. 265, 1997.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. In: _____. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002, p. 270.

NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **J.Biol.Chem.** , v. 153, p. 375-80, 1944.

OHLWEILER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**. 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1982. p. 65-70.

OLIVEIRA, L.H. S. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de goma xantana**. 2002. 193 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)-Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

PACE, G. Polímeros microbianos. In: BU'LOOCK, J.; KRISTIANSEN, B. **Biotecnologia Básica**. Zaragoza: Acríbia, 1991, p. 449-462.

PADILHA, F.F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microrganismos**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

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

PAPOUTSOPOULOU, S.V., EKATERINIADOU, L. V., KYRIAKIDIS, D. A., Genetic construction of *Xanthomonas campestris* and xanthan gum production from whey. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 1235-1240, 1994.

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

PELLETIER, E.; VIBKE, C.; MEADOWS, J.; WILLIAMS, P. A. Arheological study of the orderdisorder conformational transition of xanthan gum. **Biopolymers**, New York, v. 59, p. 339-346, 2001.

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

POLLOCK, T. J. THORNE, L.; YAMAZAKI, M.; MIKOLAJCZAKI, M.G.; ARMENTROUT, R. W. Mechanism of Bacitracin Resistance in Gram-Negative Bacteria That Synthesize Exopolysaccharides. **Journal of Bacteriology**. n. 20, v.120, 1994.

POPLAWSKY, A.R.; CHUN, W. *Xanthomonas campestris pv. campestris* requires a functional pigB for epiphytic survival and host infection. **Mol. Plant-Microbe Interact.** v. 11, p. 466-475, 1998.

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

PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório Técnico nº 84 396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI/CTPP). São Paulo, 2006.

RAJESHWARI, K. V.; PRAKASH, G.; GHOSH, P. Improved process for xanthan production and intermittent feeding strategy. **Letters in Applied Microbiology**. v. 2, p. 173-175, 1995.

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

RINAUDO, M. On the structure-properties of some polysaccharides used in the food industry. In: NISHINARI, K. e DOI, E. **Food hydrocolloids**. New York: Plenum Press, 1993. p. 510.

ROCHETTE, P.J. THERRIEN, J.P.; DROUIN, R.; PERDIZ, D.; BASTIEN, N.; DROBTESKY, E. A.; SAGE, E. UV-A induced cyclobutane pyrimidine dimmers form predominantly at thymine-thymine dypirimidines and correlate with the mutation spectrum in rodente cells, **Nucleic Acids**. v. 31, p. 2786-2794, 2003.

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.

ROITMAN, D. E; SCHRAG, J. L. In **Polymer-Flow Interaction**; Rabin, Y., Ed.; American Institute of Physics Conference Proceedings. New York: AIP.1985. n. 137, p. 77.

ROSEIRO, J.C.; ESGALHADO, M.E.; CALDEIRA, A.T.; EMERY, A.N. Kinetic and metabolic effects of nitrogen, magnesium and sulphur restriction in *Xanthomonas campestris* bach culture. **Journal of Applied Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 381-386, 1993.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas sp* para produção de goma xantana**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões-URI, Erechim, 2005.

RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman e Hall, 1993, p. 193-245.

RUPP, W.D. Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *Escherichia coli* following ultraviolet irradiation, **J. Mol. Biol.** v. 31, p. 291-304,1968.

RUSSEL, J. B. **Química geral**. São Paulo: Makron Books, 1994. v. 1, p. 307-524.

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

SANCAR, G.B.; SANCAR, A.; LITTLE, J.W.; RUPP, W.D. The *uvrB* gene of *Escherichia coli* has both *lexA*-repressed and *lexA*-independent promoters. **Cell** n. 28, p. 523-530, 1982.

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

_____; CLARK, R. C. Laboratory-produced microbial polysaccharide has many potential food applications as a gelling, stabilizing and texturizing agent. **Food Technology**, n. 37, p. 63-70. 1983.

SANDFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. **Advance in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, New York, v. 36, p. 265-313, 1979.

SCAMPARINI, A. R. P. Modification of xanthan gum. In: **WORLD CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**, 8., 1991, Toronto. Abstracts.Toronto, 1991. p.177.

SEVIOUR, R. J.; GIBBS, P.A. Biotechnology: Legislation and Regulation. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 12, p. 279, 1992.

SHAMA, G. Ultraviolet light. In: ROBINSON, R.K., BATT, C., PATEL, P. **Encyclopedia of food Microbiology**. 3. ed. London: Academic Press, 1999, p. 2208-2214.

SHATWELL, K. P.; SUTHERLAND, I.W.; ROSS-MURPHY, S.B. The influence of acetyl and piruvate substituents on the helix-coil transition behavior of xanthan. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, 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: effect of dilution rate. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 14, p. 23-31, 1972.

_____. Continuous fermentation to produce xanthan biopolymer: laboratory investigation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 12, p. 75-83, 1970.

SILVA, C. R. **Estudo das condições de produção de xantana através de diferentes formulações de meio de cultura**, Monografia (trabalho de conclusão de curso), Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Assis, 2004.

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

SIZER, C.E., BALASUBRAMANIAN, V.M. New intervention processes for minimally processed juices. **Food Technology**. v. 53, p. 64-67, 1999.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Analytical chemistry**, Saunders College Pub, 6. ed.,1994.

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

SOMMER, S.; BAILONE, A.; DEVORET, R. The appearance of the UmuD_C protein complex in *Escherichia coli* switches repair from homologous recombination to SOS mutagenesis, **Mol. Micro**. v. 10, p. 963-971, 1993.

SOMOGY, M. A New Reagent for Determination of Sugars. **A new Sugar Reagent**, May p. 61-68, 1945.

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

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

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**. v. 23, p. 80-142, 1982.

_____. Microbial biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration e Biodegration**, p. 249-261, 1997.

_____. Microbial exopolysaccharides: structural subtleties and their consequences. **Pure e Applied Chemistry**, Oxford, v. 69, n. 9, p.1911-1917, 1997.

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

_____. The role of acylation in exopolysaccharides including those for food use. **Food Biotechnology**. v. 6, n. 1, p. 75-86, 1992.

_____. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman e Hall, 1993, p. 363-388.
SUTHERLAND, I. W.; KENNEDY, L. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. *Microbiology*, New York, n. 142, p. 867-872, 1996.

SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman e Hall, 1993. p. 60-64.

SZCZESNIAK, A.S. Rheological basis for selecting hydrocolloids for specific applications. In: PHILLIPS, G.O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P.A. **Gums and stabilizers for the food industry**. 3. ed. London: Elsevier, 1985, p. 311-323.

_____; CLARKE-STURMAN, A. J. Effect of growth condition on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1483-1492, 1986.

THORNE, L.; TANSEY, L.; POLLOCK, T. J. Clustering of mutations blocking synthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.** n. 169, p. 3593-3600, 1987.

TURNER, P.; BARBER, C.; DANIELS, M.J. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.; **Molec. Gen. Genet.** n. 195, p. 101-107, 1984.

VANDERSLICE, R.W.; DOHERTY, D.H.; CAPAGE, M. A.; BETACH, M.R.; HASSLER, R.A.; HENDERSON, N.M.; RYAN—GRANIERO, J.; TECKLENBURG, M. Genetic engineering of polysaccharide structure in *Xanthomonas campestris*. In: **V. CRESCENZI; DEA, I.C.M.; PAOLETTI, S.; STIVALI, S.S.; SUTHERLAND, I.W.** Biomedical and Biotechnological advances in industrial polysaccharides. Gordon and Breach Science Publishers, New York, N.Y.1988, p. 145-157.

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

VENDRUSCOLO, C.T.; MOREIRA, S.; SCAMPARINI, A.R.P.; ZAMBIAZI, R.; SOUZA, A. S. **Produção e caracterização o biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo da região de Ribeirão Preto-SP Brasil.** 1995.

Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M. Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 80, n. 6, p. 599- 602, 1995.

VIEIRA, J., MESSING, J. **Gene**. v. 19, p. 259–268, 1982.

VOJNOV, A.A.; SLATER, H.; DANIELS, M.J.; DOW, J.M. Expression of the *gum* operon directing xanthan biosynthesis in *Xanthomonas campestris* and its regulation in planta. **Mol Plant Microbe Interact.** v. 14, p. 768–774, 2001.

YANG, P.H.; LU, T.; XUE, K.; SUN, S.; LU, G.; CHEN, S. The electro-catalytic reduction of artemisinin by either hemin or layer-by-layer films of hemoglobin/poly(vinyl sulfanate). **Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects**, Amsterdam, v. 257-258, p. 467-472, 2005.

YOUNG, R. J. **Introduction to polymer**. New York: Chapman e Hall, 1981.

WANG, S.F.; CHEN, T.; ZHANG, Z.L.; SHEN, X.C.; LU, Z.X.; PANG, D. W.; WONG, K.Y. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins entrapped in agarose hydrogel films in room-temperature ionic liquids. **Langmuir**, Washington, v. 21, p. 9260-9266, 2005

WHITFIELD, C.; ROBERTS, I. S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, n. 31, p. 1307-1319, 1999.

WOLFE, R. L. Ultraviolet Disinfection of Potable Water; Current Technology and Research. **Environ. Sci. Technol.**v. 24, n. 6, p. 768-773, 1990.

WONG, T. Y. Effects of calcium on sugar transport in *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 1, p. 89-92, 1993.

WOODGATE, R. Evolution of the two-step model for UV mutagenesis, **Mutat. Res.** v. 485, p. 83–92, 2001.

WOOLSEY, G.A.; WANG, T.; MACGREGOR, S. J.; ANDERSON, J.G. Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli*. **Science**. v. 39, p. 2921-2925, 2005.

ZHANG, L.; CHEN, H.; QU, Z.; XIE, B. Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. In:____. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 58, p. 2172, 2002.

ZHANG, X.; LIU, X.; GU, D.; ZHOU, W.; XIE, T.; MO, W. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, Kidlington, v.2 7, p. 203-209, 1996.

ZHAO J, YANG X. Photocatalytic oxidation for indoor air purification: a literature review. **Building and Environment**. v. 38, p. 645–654, 2003.