



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL**

**TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE XANTANA E NO
PERFIL ELETROFORÉTICO DE *X. campestris* pv pruni.**

ANDRÉA MIRANDA TEIXEIRA

Pelotas, 2005

ANDRÉA MIRANDA TEIXEIRA

**TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DE XANTANA E NO
PERFIL ELETROFORÉTICO DE *X. campestris* pv *pruni*.**

DISSERTAÇÃO apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade
de Agronomia Eliseu Maciel da
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PELOTAS, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Antunes

Co-Orientadores: Prof.^a Dr.^a Claire Tondo Vendruscolo

Prof. Dr. Francisco A. B. Del Pino

Pelotas, 2005

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

T266t

Teixeira, Andréa Miranda

Tempo de fermentação na produção e qualidade de xantana e no perfil eletroforético de *X. campestris* pv *pruni* / Andréa Miranda Teixeira ; orientador Pedro Luiz Antunes ; co-orientador Claire Tondo Vendruscolo, Francisco A. B. Del Pino. – Pelotas, 2005. – 73f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2005.

1.Xantana. 2.*Xanthomonas campestris*. 3.Inóculo. 4.Enzimas. 5.Tempo de fermentação. I.Antunes, Pedro Luiz. II.Vendruscolo, Claire Tondo. III.Del Pino, Francisco A. B. IV.Título.

CDD: 576.162

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Pedro Luiz Antunes

Prof.^a Dr.^a Claire Tondo Vendruscolo

Prof. Dr. Francisco Burkert Del Pino

Prof.^a Dr.^a Maria Isabel Côrrea da Silva Machado

MSc. Caroline Dellinghausen Borges

Dedico, com amor,

Aos meus pais, Kleber e Vera,

Às minhas irmãs, Daniele e Isabella,

Ao meu amor, Franer,

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e às minhas irmãs, por todo amor, apoio, incentivo, e compreensão pois sem eles nada seria possível.

Ao Franer pelo amor, incentivo e compreensão.

À Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A Prof.^a Dr.^a Claire Tondo Vendruscolo, pelos ensinamentos, orientação, apoio, amizade e oportunidade.

A Dr.^a Angelita da Silveira Moreira, pela amizade, apoio e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Francisco Augusto Burkert Del Pino, pela paciência e ensinamentos transmitidos.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, em especial ao Prof. Dr. Pedro Antunes.

À Ellen, minha grande amiga, pelo carinho e amizade, pelo companheirismo, pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis, pelas alegrias compartilhadas, enfim, por todos os momentos que passamos juntas desde o nosso nascimento.

Aos amigos do Laboratório de Biopolímeros, Carol Borges, Bilica, Ruti, Sabrina, Lú, Carol Bastos, Clarice e Rudah, pela amizade, incentivo, apoio e momentos de descontração.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“ O mundo está nas mãos
daqueles que têm coragem de
sonhar e viver seus sonhos.
Cada qual com seu talento.
Cada qual com seu dom.”*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EPS	Exopolissacarídeo
mPa.s	miliPascal segundo
nm	nanômetro
Pa.s	Pascal . segundo
rpm	Rotação por minuto
vvm	Volume/ volume/ minuto
XC	<i>Xanthomonas campestris</i>

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
RESUMO.....	14
INTRODUÇÃO GERAL	15
REVISÃO DE LITERATURA	17
1 Biopolímeros	17
2 Xantana.....	18
2.1 Biossíntese de xantana	19
2.2 Composição química.....	23
2.3 Avaliação da composição química	25
2.4 Propriedades reológicas.....	26
2.5 Produção de xantana	27
OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DE XANTANA	29
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4 CONCLUSÃO	41
5 REFERÊNCIAS.....	41
INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO, NA QUALIDADE DA XANTANA E NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>pruni</i>.	44
RESUMO.....	44
ABSTRACT	46
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4 CONCLUSÃO	65
5 REFERÊNCIAS.....	65

ABSTRACT	68
CONCLUSÕES GERAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via biossintética de produção de xantana.....	20
Figura 2	Estrutura química da xantana.....	24

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XANTANA

Figura 1	Produção de xantana (g.L^{-1}) em diferentes condições de aeração do inóculo.....	36
Figura 2	Viscosidade (mPa.s) do caldo fermentado do inóculo de <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101 submetidos a diferentes condições de aeração.....	38
Figura 3	Viscosidade (mPa.s) de soluções aquosas de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101 em diferentes condições de aeração do inóculo.....	39
Figura 4	Composição química de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101 em diferentes condições de aeração do inóculo.....	41

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO, NA QUALIDADE DA XANTANA E NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE *Xanthomonas campestris* pv pruni.

Figura 1	Produção de xantana, massa celular seca (m.c.s.) e pH do meio fermentado por <i>X. campestris</i> pv pruni 06 e 101 a 28°C, 500rpm, 1vvm, em diferentes tempos de fermentação..	53
Figura 2	Composição química de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC 06 em diferentes tempos de fermentação. Padrões: (P1) ramnose (R) e glicose (G); (P2) ácido glicurônico (AG) e manose (M).....	55
Figura 3	Composição química de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC 101 em diferentes tempos de fermentação. Padrões: (P1) ramnose (R) e glicose (G); (P2) ácido glicurônico (AG) e manose (M).....	56

Figura 4	Teor de acetil e piruvato de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101 a 28°C, 500rpm, 1vvm, em diferentes tempos de fermentação.....	57
Figura 5	Viscosidade (mPa.s) das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06, em diferentes tempos de fermentação, medida a 25°C.	59
Figura 6	Viscosidade (mPa.s) das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC101, em diferentes tempos de fermentação, medida a 25°C.....	60
Figura 7	Viscosidade (Pa.s) vs teor de acetil (%) vs teor de piruvato (%) de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06, em diferentes tempos de fermentação.....	62
Figura 8	Viscosidade (Pa.s) vs teor de acetil (%) vs teor de piruvato (%) de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC101, em diferentes tempos de fermentação.....	63
Figura 9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas secretadas na produção de xantana por <i>X. campestris</i> pv pruni cepa 06.....	64
Figura 10	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas secretadas na produção de xantana por <i>X. campestris</i> pv pruni cepa 101.....	64

LISTA DE TABELAS

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XANTANA

Tabela 1	Proporções de volume de líquido (V_l) / volume do frasco (V_f) do inóculo.....	33
Tabela 2	Crescimento bacteriano (UFC.mL ⁻¹) de <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101 em diferentes condições de aeração do inóculo.....	35
Tabela 3	Viscosidade (mPa.s) de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101 em diferentes condições de aeração do inóculo.....	40

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO, NA QUALIDADE DA XANTANA E NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE *Xanthomonas campestris* pv pruni.

Tabela 1	Produção de xantana por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101, a 28°C, 500rpm, 1vvm, em diferentes tempos de fermentação.....	51
Tabela 2	Teor de acetil e teor de piruvato de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101, a 28°C, 500rpm, 1vvm, em diferentes tempos de fermentação.....	58
Tabela 3	Viscosidade (mPa.s) de soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana sintetizada por <i>X. campestris</i> pv pruni XC06 e XC101, em diferentes tempos de fermentação, medida a 25°C nas taxas de deformação 10, 30, 60 e 100s ⁻¹	61

RESUMO

A variação nos parâmetros de fermentação podem influenciar na produção, composição química e viscosidade da xantana. A produção de xantana é realizada em duas etapas: produção de células (desenvolvimento do inóculo) e produção do biopolímero. Estudou-se a produção de inóculo, em incubador agitador, com três diferentes variações de aeração em função da proporção entre o volume do líquido e o volume do frasco (94, 80 e 60% de volume vazio), tomando-se como referência padrão 94%, condição normalmente utilizada para produção do inóculo. Foram avaliados produção, composição química e viscosidade da xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni cepas 06 e 101. A cepa 101 produziu xantana em maior quantidade e de melhor qualidade em todas as variações testadas. As diferentes variações de aeração não influenciaram a produção e viscosidade das xantanas produzidas pelas duas cepas, sendo possível, portanto, a utilização de quaisquer das variações de aeração testadas. Para a produção de xantana em fermentador, produziu-se o inóculo em incubador agitador, com a proporção de 60% de aeração do frasco, avaliada no experimento anterior. A fermentação foi conduzida a 28°C, 500rpm e 1vvm. Avaliou-se a influência do tempo de fermentação na produção, composição química e viscosidade da xantana e no perfil eletroforético das enzimas de *X. campestris* pv prui cepas 06 e 101. A cepa 06 produziu a maior quantidade de xantana em 66 e 96h ($7,3\text{g.L}^{-1}$), e a cepa 101, em 120h ($7,6\text{g.L}^{-1}$). No biopolímero sintetizado pelas duas cepas foi detectada a presença de glicose, manose, ramnose e ácido glicurônico. O conteúdo de acetil e piruvato variou com o aumento do tempo de fermentação. A viscosidade também variou, sendo maior em 36h (1190mPa.s) e 24h (979mPa.s), para as soluções de xantana das cepas 06 e 101, respectivamente. Foram encontradas bandas diferentes, na caracterização eletroforética, em cada tempo de fermentação, sugerindo a presença de diferentes enzimas em cada tempo. Essas enzimas poderão ser as responsáveis pelas alterações na produção, composição química e viscosidade do biopolímero durante a fermentação.

Palavras-chave: xantana, inóculo, enzimas, tempo fermentação.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção e o uso industrial de polissacarídeos baseava-se, até recentemente, em produtos de origem vegetal e de algas marinhas. Porém, com o avanço das pesquisas, os polissacarídeos de origem microbiana tornaram-se uma alternativa válida, pois possuem propriedades similares aos tradicionais e, em alguns casos mais vantajosos.

A xantana é um polissacarídeo extracelular produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* de grande importância comercial, sendo atualmente o mais utilizado em alimentos por causa de suas excelentes propriedades reológicas. A ampla aplicabilidade da xantana fez com que inúmeras pesquisas venham se desenvolvendo visando à otimização das condições de crescimento celular, de produção e recuperação do biopolímero.

A xantana utilizada comercialmente no Brasil não é produzida em âmbito nacional, dependendo exclusivamente de importações. No Brasil, pesquisas visam a otimização do processo fermentativo na obtenção de biopolímeros extracelulares com potencial aplicação industrial e a seleção de novas cepas bacterianas. Estudos já comprovaram que a variação dos parâmetros de produção tem influência na produtividade e qualidade do biopolímero (VENDRUSCOLO, 1995; MOREIRA, 2002; BORGES, 2004).

O sucesso da xantana no mercado de hidrocolóides está baseado, principalmente, nas suas características reológicas especiais, como a capacidade de exibir alta viscosidade mesmo em baixas concentrações (SUTHERLAND, 1993). As propriedades reológicas da xantana advêm de sua estrutura química e de seu alto peso molecular. Variação nestas características tendem a ser devido mudanças nos níveis de grupos acetil e piruvato presentes na molécula (MORRIS, 1984).

OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da aeração do inóculo na produção, composição química e viscosidade do biopolímero;
- Avaliar a produção, composição química e viscosidade de xantana produzida em diferentes tempos de fermentação por duas cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*;
- Verificar se há diferença nas enzimas secretadas durante o período de fermentação e sua relação com a produção e viscosidade do biopolímero.

REVISÃO DE LITERATURA

1 BIOPOLÍMEROS

O crescente interesse por polissacarídeos microbianos para aplicação científica e industrial deve-se a inúmeros fatores. Além de suas propriedades funcionais únicas, esses polissacarídeos podem ser produzidos sob condições controladas, em menor período de tempo e independem das condições climáticas. Tais fatores têm acelerado o uso de gomas microbianas como a pululana, a curdulana, a dextrana e a xantana (SUTHERLAND, 2001).

Segundo Bobbio e Bobbio (1992), polissacarídeos são macromoléculas naturais formadas pela condensação de monossacarídeos ou seus derivados, unidos entre si por ligações glicosídicas, constituindo-se substâncias de alto peso molecular. Para os autores, os polissacarídeos podem ser provenientes de plantas terrestres, encontrados na própria estrutura (pectina, celulose e amido), nas sementes (goma guar e locusta) ou exudatos (goma arábica); de plantas aquáticas (agar, carragena e alginato); e de microrganismos (xantana, dextrana e gelana), conhecidos como biopolímeros microbianos.

Os microrganismos produzem polissacarídeos de três formas distintas: polissacarídeos extracelulares, componentes estruturais (integrantes da parede celular) e de armazenagem intracelular. Os polissacarídeos extracelulares, ou exopolissacarídeos (EPS), podem, ainda, ser classificados em dois tipos: cápsulas integradas com a parede celular (capsular) ou gomas acumuladas no lado de fora da parede celular e difundidas no meio de cultura (livres). Estes polissacarídeos extracelulares contribuem com uma textura gomosa às colônias de bactéria em meio sólido e um aumento de viscosidade durante o crescimento em meio líquido.

O uso de polímeros carboidratos em soluções aquosas na indústria é devido, principalmente, à sua ampla faixa de propriedades funcionais. A característica mais importante é sua capacidade de modificar as propriedades aquosas do meio, isto é,

sua capacidade de espessar, emulsificar, flocular, intumescer e/ou suspender ou formar géis, filmes e membranas. (BORN, 2002). Morris (1995) afirma que uma das maiores vantagens dos biopolímeros microbianos são suas propriedades físico-químicas reprodutíveis, além das fontes estáveis. Para Maugeri Filho (2001), os polissacarídeos microbianos são uma alternativa válida pois possuem propriedades similares aos tradicionais, não dependem de condições climáticas, contaminação marinha ou falha nas colheitas, que prejudicam as gomas tradicionais e, além disso, são menos suscetíveis à variabilidade em sua qualidade, pois a produção pode ser controlada cuidadosamente. Isto explica a contínua substituição dos polissacarídeos convencionais pelos de origem microbiana.

Sob o ponto de vista comercial, a xantana é o mais importante biopolímero microbiano, foi o segundo a ser produzido em larga escala e o primeiro a ser amplamente utilizado na indústria de alimentos (MORRIS, 1995; MAUGERI FILHO, 2001).

2 XANTANA

A xantana foi descoberta na década de 50, por cientistas do *Northern Regional Research Laboratory* do US Department of Agriculture quando pesquisavam microrganismos que produziam gomas solúveis em água para interesse comercial. Os cientistas verificaram que a bactéria *Xanthomonas campestris*, encontrada em couves, produzia um polissacarídeo extracelular com propriedades reológicas excepcionais (HARDING; CLEARY; IELPI, 1994; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Desde então, a xantana é o mais importante polissacarídeo microbiano comercialmente.

Bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à família *Pseudomoniaceae*, são gram-negativas, estritamente aeróbias e essencialmente fitopatogênicas, com exceção da *Xanthomonas maltophilia* (SUTHERLAND, 1993; SWINGS et al., 1993). As bactérias fitopatogênicas precisam crescer ou sobreviver no solo, em folhas ou raízes de plantas para completar seu ciclo de vida, portanto a proteção contra o meio ambiente hostil pode ser um motivo para que a bactéria produza EPS (SILVA et al., 2001). Após colonizar a superfície, as bactérias produzem EPS que preenche os espaços intercelulares retendo água e congestionando estes espaços (*water*

soaking). Tal fenômeno causa uma contínua desintegração do tecido sendo o primeiro sintoma da infecção. A congestão é progressiva e os danos são agravados, culminando com o murchamento da planta.

O biopolímero xantana é produzido por diversos patovares de *Xanthomonas campestris* e por algumas outras espécies de *Xanthomonas*. O microrganismo mais comumente empregado para produção industrial de xantana é a *Xanthomonas campestris* pv *campestris*, porém vários estudos já demonstraram a capacidade de outros patovares, bem como de outras espécies, produzirem o biopolímero. No Brasil, Scamparini e Rosato (1991) já realizaram estudos para produção de xantana por *Xanthomonas campestris* pv *manihotis*, com ótimos resultados de produção e qualidade. Do mesmo modo pesquisadores já avaliaram *Xanthomonas campestris* pv *pruni* como produtora de xantana (SOUZA, 1999; ANTUNES, 2000; MOREIRA, 2002; BORGES, 2004). O patovar *pruni* infecta, naturalmente, vegetais do gênero *Prunus* como pessegueiros, ameixeiras e cerejeiras, entre outros. É o causador da mancha bacteriana (*Prunus* Bacterial Spot – PBS), ocorrendo com maior frequência em áreas de clima quente e úmido (CIVEROLO; HATTINGH, 1993).

Segundo Galindo (1994) existe correlação entre as características morfológicas da *Xanthomonas* e sua habilidade de produzir xantana. Em seus estudos mostrou que a virulência está correlacionada com a produção de xantana, podendo ser usada como critério para seleção e isolamento de produtores de gomas xantana de alta qualidade.

2.1 Biossíntese de xantana

Durante os anos 80 e 90, inúmeros grupos de pesquisas realizaram extensos trabalhos para identificar a via bioquímica, genética e de regulação da síntese da xantana. Um entendimento destes processos pode conduzir à melhoria do processo de produção e qualidade da xantana (HARDING; CLEARY; IELPI, 1994).

A xantana é construída a partir de açúcares nucleotídeos citoplasmáticos, acetil Co-A e fosfoenolpiruvato com uma membrana interna fosfato polisoprenol como um acceptor (IELPI, 1993). A elucidação da rota de biossíntese foi grandemente ajudada pelo uso de células congeladas de *X. campestris* e descongeladas inúmeras

vezes na presença de EDTA. A série de passos da montagem dos pentassacarídeos repetidos e o processo de polimerização foram resolvidos pela incubação destas células permeabilizadas com combinações de UDP-glicose, GDP-manose e UDP-ácido glicurônico (BECKER et al., 1998).

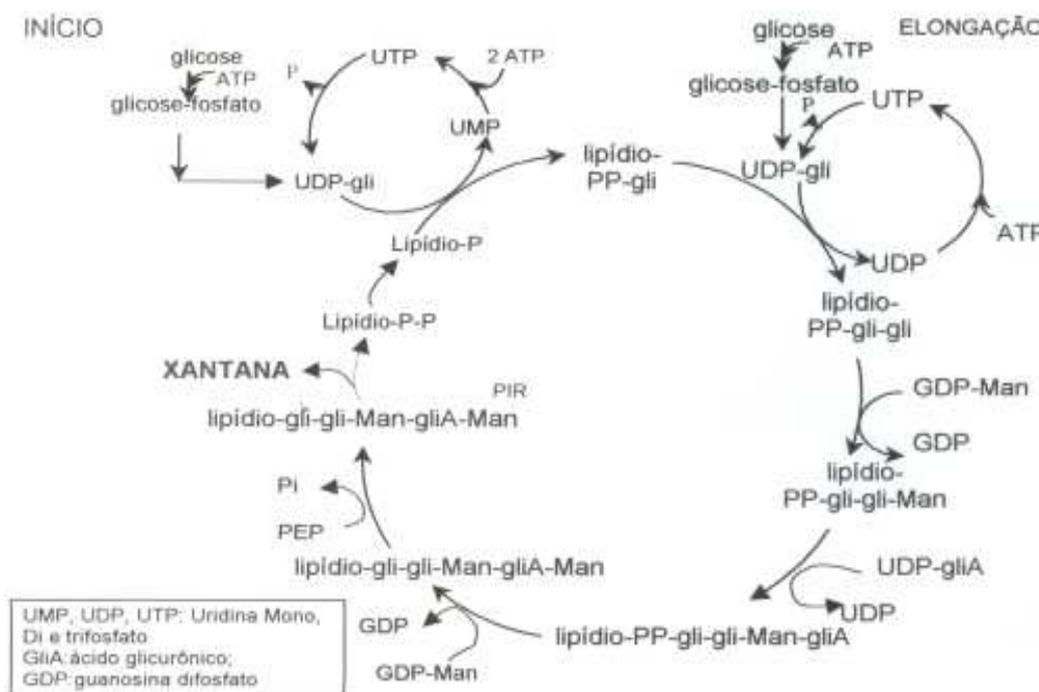


Figura 1 – Via biossintética de produção de xantana (SUTHERLAND; TAIT, 1992).

Os polissacarídeos bacterianos encontrados como componentes da parede celular, ou produtos extracelulares, e compostos de unidades repetidas regulares têm uma forma comum de biossíntese. Uma série de enzimas de membrana utilizam vários doadores carboidratos ativados para formar o polissacarídeo em uma molécula aceptora. As unidades repetidas de oligossacarídeos de xantana são formadas pela adição seqüencial de monossacarídeos a partir de açúcares nucleotídeos de alta energia (usualmente açúcar nucleosídeo difosfato) para uma molécula aceptora de lipídio isoprenoide. Deste modo, a cadeia principal da xantana é formada pela adição seqüencial de D-glicose-1-fosfato e D-glicose, respectivamente, a partir de dois moles de UDP-D-glicose. Depois, D-manose e D-ácido glicurônico são adicionados a partir de GDP-manose e UDP-ácido glicurônico,

respectivamente. Cada passo requer uma enzima específica e um substrato específico. Ausência de enzima (ou de substrato) inibe a síntese do polissacarídeo. Dependendo da cepa usada e das condições fisiológicas sob a qual a bactéria cresceu, e por isso, da estrutura exata do polímero formado, grupos O-acetil são transferidos do acetil Co-A para os resíduos internos de manose e grupos piruvato, do fosfoenolpiruvato, são adicionado à manose terminal (BECKER et al.,1998; SUTHERLAND,1993).

Evidências indicam que as manoses interna e externa da molécula de xantana podem ser acetiladas no carbono 6, variando no conteúdo. O fosfoenolpiruvato atua como um inibidor competitivo da acetilação, sugerindo que a proporção de fosfoenolpiruvato/acetil CoA seja importante na regulação da quantidade de acetilação da xantana. Evidências genéticas indicam que há duas enzimas acetyltransferases específicas para a manose interna e externa. (HARDING; CLEARY; IELPI, 1994)

Depois das unidades pentassacarídicas serem formadas, oligômeros são produzidos pela transferência de outros lipídios intermediários, aumentando gradualmente o tamanho da cadeia de carboidrato. Este estágio da biossíntese foi examinado em *Klebsiella aerogenes*, não em *X. campestris*. Normalmente envolve a adição de uma seqüência de oligossacarídeo mais longa no terminal não-redutor de uma só unidade ligada ao lipídio isoprenóide, simultaneamente liberando um mol de lipídio isoprenóide difosfato. O lipídio inativo mensageiro é defosforilado para produzir fosfato isoprenil o qual pode então reiniciar a seqüência biossintética. Embora a estrutura das unidades repetidas seja determinada pela transferência seqüencial de diferentes monossacarídeos e grupos acetil de seus respectivos doadores por transferases altamente específicas, a enzima polimerase responsável pela polimerização dos pentassacarídeos em uma macromolécula tem baixa especificidade (SUTHERLAND,1993).

O estágio final da secreção do polissacarídeo da membrana citoplasmática, a passagem através do periplasma e membrana externa e finalmente a excreção no meio extracelular, ainda são muito pouco definidos (SUTHERLAND,1993). Segundo alguns autores, primeiro ocorre a polimerização dos polissacarídeos no interior celular e logo após a excreção do polissacarídeo para o exterior da célula (HARDING; CLEARY; IELPI, 1994; KATZEN et al., 1998; SUTHERLAND,2001).

Porém, Koplin et al. (1992) sugere que as unidades pentassacarídicas são secretadas e então polimerizadas.

Para Harding, Cleary e Ielpi (1994), uma razoável, mas ainda improvada suposição, é que a síntese do pentassacarídeo-P-P-poliprenol ocorra na face citoplasmática da membrana interna. O sítio preciso do passo de alongamento da polimerização bem como a regeneração do poliprenol-P, secreção e liberação da xantana no meio precisa ser elucidado.

Cepas produtoras de xantana sintetizam inúmeras enzimas extracelulares como as celulases, as quais podem degradar a xantana. Essas enzimas são geralmente produtos intracelulares localizados no periplasma. Caso ocorra a lise das células durante a cultura, estas enzimas podem ser liberadas no meio extracelular e ocorrer a degradação do polímero (SUTHERLAND, 2001).

Sutherland e McDonald (1986) elaboraram um método para isolamento e purificação de enzimas extracelulares de bactérias produtoras de exopolissacarídeos. Levando em conta que muitos EPS têm alto peso molecular, enquanto enzimas extracelulares têm peso molecular relativamente mais baixo, realizaram sucessivas filtrações para separação inicial das enzimas extracelulares do exopolissacarídeo. O produto final continha celulase e outras proteínas extracelulares, junto com pequena quantidade de material derivado da lise celular. A análise PAGE revelou uma mistura complexa de polipeptídeos de peso molecular variando de 15000 a 90000. O procedimento delineado por estes autores mostra uma separação quantitativa das enzimas do biopolímero em pouco tempo, minimizando o risco de inativação enzimática. Um problema frequentemente encontrado na purificação de enzimas extracelulares de microrganismos é a simultânea produção de proteínas extracelulares e polissacarídeos extracelulares. A cultura é altamente viscosa e dificulta o manuseio. Tentar remover o polissacarídeo pode desnaturar as enzimas ou *entrap* a proteína durante a remoção do polissacarídeo levando à uma reduzida produtividade de enzimas.

Segundo Born, Langendorff e Boulenger (2002) a degradação enzimática da xantana não é muito eficiente, porém, se moléculas estiverem no estado desordenado, podem ser degradadas por uma classe de enzimas chamada *xantanases*. Este grupo de enzimas compreende endo-1,4- β -glucanases e xantana liases. As glucanases podem degradar parcialmente a cadeia celulósica da xantana, e também são capazes de degradar diferentes celulosas. Xantanases liases são

capazes de clivar as ligações β -D-manose-D-ácido glicurônico e ligações da cadeia lateral trissacarídica. A presença de acetato e piruvato impede a ação de celulases, enquanto que a atividade das xantanas liases não mostra ser afetada por estes grupos. É provável que a xantana contenha regiões celulósicas que não carreguem cadeias laterais e são então regiões preferidas para um ataque por celulases.

2.2 Composição química

Exopolissacarídeos produzidos por microrganismos variam consideravelmente em sua estrutura química. Alguns componentes como D-glucose, D-manose, D-galactose e ácido D-glicurônico ocorrem muito freqüentemente, outros como a D-ramnose ou D-fucose são ligeiramente menos comuns, ácido D-manurônico e ácido D-gulurônico são raros. Exopolissacarídeos microbianos podem ser divididos em homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos, compostos por apenas um ou mais de um tipo de monossacarídeo, respectivamente. Destes últimos, quase a totalidade, é composta de unidades repetidas, variando no tamanho, de dissacarídeos a octassacarídeos (SUTHERLAND; TAIT, 1992)

A xantana é um heteropolissacarídeo com estrutura primária composta de repetidas unidades pentassacarídicas, formada por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glicurônico. A cadeia principal consiste de unidades de D-glucose unidas entre si por ligações β 1-4. A cadeia lateral trissacarídica contém uma unidade de ácido D-glicurônico entre duas de D-manose. A unidade interna de manose é acetilada e a manose terminal (externa) pode conter resíduos de ácido pirúvico (JANSSON et al., 1975; MORRIS, 1977; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Algumas manoses externas podem conter ainda um segundo grupo acetil (STANKOWSKI; MUELLER; ZELLER, 1993). Os substituintes acetil e piruvato são ligados à cadeia lateral em quantidades variáveis, dependendo de qual cepa a xantana foi isolada e também das condições de fermentação. A estrutura química da xantana pode ser observada na Figura 2.

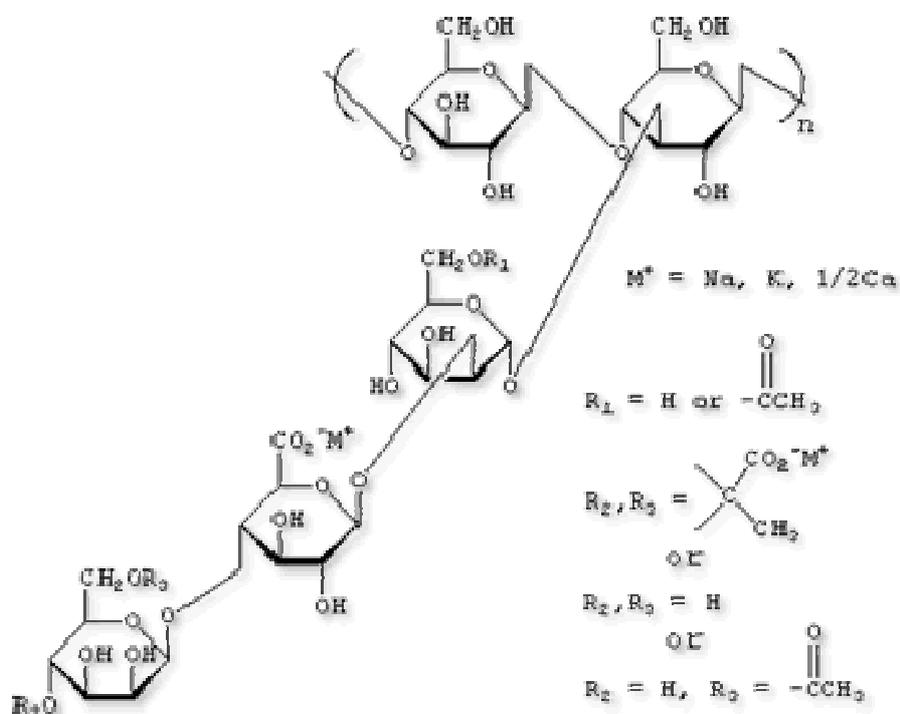


FIGURA 2 - Estrutura química da xantana.

Mudanças quantitativas na composição da xantana podem ocorrer em função da bactéria utilizada e das condições nutricionais e operacionais empregadas, como concentração de inóculo, meio, aeração, agitação, temperatura, pH e tempo de fermentação (CADMUS et al., 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; VENDRUSCOLO et al., 2000; MOREIRA, 2002). Segundo Morris (1984) a variação na estrutura química da xantana tende a ser principalmente devido mudanças nos níveis de piruvato e acetato, porém, também podem ocorrer variações na composição de carboidratos. Morris (1984) relatou a presença de ramnose em xantana produzida por *Xanthomonas juglandis*. Souza e Vendruscolo (1999) verificaram a presença de ramnose em biopolímero sintetizado pelo patovar pruni de *Xanthomonas campestris*.

2.3 Avaliação da composição química

Para a caracterização de xantana, diversos parâmetros podem ser levados em consideração, como estrutura química, conteúdo de acetil e piruvato, peso molecular, estrutura secundária e comportamento reológico. Porém, as características físicas são as determinações mais importantes do comportamento desta molécula na sua aplicação final. Segundo Taylor e Nars-EI-Din (1993), as medidas do conteúdo de acetato e piruvato são também importantes pois estes constituintes têm grande influência no comportamento reológico e adsorção de soluções de xantana.

O método para determinação do conteúdo de ácido pirúvico em xantana, mais antigo descrito, é o procedimento colorimétrico usando 2,4-dinitrophenilhydrazina (DNPH) (SLONEKER; ORENTAS, 1962), embora possa ser determinado por várias técnicas (TAYLOR; NARS-EL-DIN, 1993). Neste método, o conteúdo de ácido pirúvico reage com 2,4-DNPH produzindo 2,4-dinitrophenilhydrazona, a qual é medida colorimetricamente.

Para determinação de acetil, o método mais comumente usado é o do ácido hidroxâmico. O grupo éster da xantana reage com hidroxilamina e produz ácido hidroxâmico, a temperatura ambiente, que forma com o íon férrico um complexo insolúvel vermelho. Entretanto, o ácido hidroxâmico reage com o acetato da xantana e produz ácido acetohidroxâmico, formando, com o ferro, um complexo vermelho solúvel em água que absorve luz a 520nm (McCOMB; McCREADY, 1957).

Cadmus et al. (1978) sugere que o melhor indicador da qualidade do polissacarídeo é a quantidade de ácido pirúvico. Kennedy et al. (1982) ao avaliarem fatores que afetam o crescimento microbiano e a produção de polissacarídeo por culturas de *Xanthomonas campestris*, verificaram que a variação no conteúdo de ácido pirúvico não teve correlação com a variação dos parâmetros reológicos.

2.4 Propriedades reológicas

A xantana é amplamente utilizada na indústria de alimentos devido suas propriedades de emulsificação, suspensão, estabilização, floculação e de formar soluções pseudoplásticas, mesmo em baixas concentrações. Pode ainda ser empregada na indústria farmacêutica, em pesticidas agrícolas, na fabricação de tintas e indústria têxtil. (SUTHERLAND, 1993; DE VUYST; VERMEIRE, 1994)

Na indústria de alimentos, a utilização de polissacarídeos como espessante requer que este, em baixas concentrações gere uma alta viscosidade, promovendo a suspensão das partículas. Além disso, os produtos alimentícios devem possuir fluidez ao serem agitados e vertidos e, portanto, a viscosidade deve decrescer sob agitação, mas recuperar-se prontamente após qualquer tensão de cisalhamento. Outra exigência é que essas propriedades se mantenham sob extremos de temperatura, pH e força iônica, e na presença de outros ingredientes do alimento. É por apresentar essas propriedades reológicas que a xantana tornou-se o primeiro biopolímero a ser amplamente usado na indústria de alimentos (MAUGERI FILHO, 2001). A pseudoplasticidade da xantana melhora as qualidades sensoriais do alimento, realçando o sabor e diminuindo a sensação de gomosidade percebida na boca. Além disso, em taxas de cisalhamento entre 50 e 200s⁻¹, taxa da mastigação, a xantana exhibe baixa viscosidade, fazendo com que o produto pareça menos viscoso ao paladar e o sabor seja melhor percebido (CHALLEN, 1994; KATZBAUER, 1998).

A xantana é solúvel em água fria ou quente. Como muitos outros hidrocolóides necessita de intensa agitação ao introduzi-la no meio aquoso para evitar a formação de coágulos (KATZBAUER, 1998). O seu sucesso no mercado de hidrocolóides é devido, principalmente, às suas características reológicas especiais e notável estabilidade, quando em solução (GALINDO, 1994).

A sua estrutura ramificada e o alto peso molecular conferem à xantana uma alta viscosidade, mesmo em baixas concentrações. Com relação às propriedades reológicas, as soluções de xantana mostram comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido. A viscosidade das soluções praticamente não se altera com a temperatura entre 4 e 93°C, com pH entre 1 e 13 e com forças iônicas equivalentes a concentrações de cloreto de sódio entre 0,05 e 1% (MAUGERI FILHO, 2001).

Muitas das propriedades reológicas da xantana derivam de sua conformação dupla-hélice adotada em solução. A cadeia lateral trissacarídica alinha-se com a cadeia celulósica principal, estabilizando a conformação por interações não-covalentes (SUTHERLAND, 1998)

2.5 Produção de xantana

Reguly (2000) classifica os processos fermentativos em função da condução (contínua ou descontínua) e do modo de cultivo (fermentação em superfície ou em profundidade). Processos fermentativos em superfície – ou estado sólido – são aqueles em que tanto o crescimento do microrganismo como a formação do produto acontecem no meio sólido ou semi-sólido. No processo em profundidade, ou submerso, o crescimento do microrganismo e a formação do produto se desenvolvem em meio nutritivo líquido.

Stredanski et al. (1998) compararam a produção de EPS em cultivo submerso e sólido encontrando maior produção neste último. Explica-se pelo fato da limitação de oxigênio no cultivo submerso pelo aumento da viscosidade do caldo dificultando a eficiência da mistura e distribuição de oxigênio. Fermentação em meio sólido permite solucionar problemas relacionados à viscosidade do caldo além da possibilidade de utilizar substratos baratos, como subprodutos industriais.

A produção de xantana conduzida em fermentação contínua ou intermitente tem sido reportada por numerosos estudos. Embora as mais altas produtividades tenham sido obtidas em fermentação contínua, a maior parte, senão a totalidade, da produção comercial de xantana é feita em batelada (TAIT; SUTHERLAND; CLARKE-STURMAN, 1986; SUTHERLAND, 1993; STREDANSKI et al., 1998). Apesar das vantagens da fermentação contínua, o processo não é fácil de ser montado, muitas vezes, a agitação é insuficiente e, além disso, é difícil manter a esterilidade do processo (HARDING; CLEARY; IELPI, 1994; BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

Na condução de uma fermentação, o preparo do inóculo e a fermentação propriamente dita se distinguem como as principais etapas do processo. Na primeira, multiplica-se o microrganismo em quantidade suficiente e com sistemas enzimáticos em condições adequadas para assegurar o desenvolvimento da etapa seguinte. É

comum que o desenvolvimento do inóculo ocorra em múltiplos estágios (*inoculum build-up*) de modo a suprimir a produção de xantana enquanto aumenta-se a concentração de massa celular. Isto é requerido porque a xantana ao redor das células impede o transporte de nutrientes e estende a fase lag de crescimento. Desta forma, o microrganismo é transferido de um meio sólido para um volume pequeno de um meio líquido complexo, com incubação limitada a não mais que sete horas, então essa cultura é transferida para um meio contendo alguns sais inorgânicos, onde as células se adaptam as novas condições da fase de produção. O volume de inóculo para produção em fermentador deve ser entre 5 e 10% do volume total de caldo fermentado (GARCÍA-OCHOA et al., 2000)

O meio de cultura e as condições operacionais influenciam tanto na produção de xantana quanto na sua estrutura (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Tait, Sutherland e Clarke-Sturman (1986) comprovaram que a produção, composição e viscosidade da xantana são influenciadas pelo tempo de fermentação e exaustão de um nutriente do meio, em fermentação intermitente.

O meio padrão para produção de xantana deve conter fonte de nitrogênio, fonte de carbono, íons fosfato e magnésio, e elementos traços.

Xanthomonas campestris é uma bactéria estritamente aeróbica, sendo o oxigênio, portanto, requerido para o crescimento e produção de xantana. O suprimento de oxigênio suficiente é pré-requisito para a eficiente produção do polímero e boa produtividade (BORN, LANGENDORFF, BOULENGUER, 2002). A agitação e aeração têm por objetivo fundamental fornecer oxigênio aos microrganismos para que possam exercer suas atividades metabólicas e também para mantê-los em suspensão. Além disso, a agitação é importante não apenas na produção de células, mas também tem influência na formação do produto, sendo por isso, essencial o controle da agitação adequada a ser fornecida.

A agitação e a aeração em frascos agitados são conseguidas pelo movimento de rotação ou ação recíproca dos agitadores. Em fermentadores em escala piloto ou industrial, a aeração e agitação são proporcionados por meio de ar comprimido e por dispositivos mecânicos. Papagianni et al (2001) demonstrou a influência da agitação na produção do polímero em fermentador. Ao testar diferentes velocidades de agitação a uma mesma taxa de aeração obteve um aumento nos níveis de produção com o aumento da velocidade de agitação.

1ºARTIGO

OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DE XANTANA

A. M. Teixeira¹; E. P. Pinto¹; P. L. Antunes¹; C. T. Vendruscolo²; A. S. Moreira²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

²Laboratório de Biopolímeros - Centro de Biotecnologia - UFPel

Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

RESUMO

O biopolímero bacteriano xantana, produzido por cepas de *Xanthomonas campestris* é amplamente utilizado na indústria alimentícia. É importante investigar os parâmetros de produção e sua influência na qualidade do biopolímero. Estudou-se a influência de diferentes condições de aeração de inóculo na produção e qualidade da xantana sintetizada pelas cepas 06 e 101 de *X. campestris* pv pruni. Foram desenvolvidas três condições de aeração com variação na proporção volume do líquido / volume do frasco: A (0,056 V_l/V_f), B (0,20 V_l/V_f) e C (0,40 V_l/V_f), avaliando-se produção do biopolímero ($g.L^{-1}$), viscosidade (mPa.s) e composição química. A cepa 101 produziu xantana em maior quantidade e de melhor qualidade em todas as condições testadas. Ao analisar a produção de cada cepa em separado, não houve diferença entre as condições. A maior produção foi obtida pela cepa 101 na condição B ($5,9g.L^{-1}$), porém, a maior viscosidade foi demonstrada pelas soluções aquosas da xantana produzida na condição padrão (945mPa.s, taxa de deformação $10s^{-1}$). As menores produção e viscosidade foram obtidas pela cepa 06 com a utilização da condição C, sendo $4,1g.L^{-1}$ e 470mPa.s (taxa de deformação $10s^{-1}$), respectivamente. As diferentes condições de aeração de inóculo não influenciaram a produção e viscosidade das xantanas produzidas pelas duas cepas utilizadas, sendo possível a substituição da condição padrão (A) por quaisquer das outras condições.

Palavras-chave: xantana, inóculo, aeração.

OPTIMIZATION OF XANTHAN PRODUCTION

A. M. Teixeira¹; E. P. Pinto¹; P. L. Antunes¹; C. T. Vendruscolo²; A. S. Moreira²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

²Laboratório de Biopolímeros - Centro de Biotecnologia - UFPel

Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

ABSTRACT

Xanthan, a bacterial biopolymer, produced by *Xanthomonas campestris* strains, is widely used in food industry. It is important to investigate the production parameters and its influence in the biopolymer quality. It was studied the influence of different conditions of inoculum aeration in the production and quality of the xanthan synthesized by strains 06 and 101 of *X. campestris* pv *pruni*. Three methodologies had been developed: (0.056 VI/Vf), B (0.20 VI/Vf) and C (0.40 VI/Vf), evaluating biopolymer production (g.L^{-1}), viscosity (mPa.s) and chemical composition. The strain 101 produced xanthan in bigger amount and of better quality in all the tested methodologies. When analyzed the production of each strain separately, did not have difference between the methodologies. The highest production was gotten by strain 101 in methodology B (5.9g.L^{-1}), however, highest viscosity was demonstrated by the aqueous solutions of xanthan produced in standard methodology (945mPa.s , shear rate 10s^{-1}). The smallest production and viscosity had been gotten by strain 06 using methodology C, being 4.1g.L^{-1} and 470mPa.s (shear rate 10s^{-1}), respectively. The different conditions of inoculum aeration had not influenced the production and viscosity of xanthans produced by either strains, being possible the substitution of standard methodology (A) by any other methodologies.

Key words: xanthan, inoculum, aeration.

1 INTRODUÇÃO

Biopolímeros são produtos microbianos que podem ser produzidos comercialmente a partir de fontes renováveis, como o açúcar de cana, de baterraba, melaço, etc., são biodegradáveis, e tornam-se alternativas às tradicionais gomas de plantas e algas. Alguns já são produtos biotecnológicos bem estabelecidos e com um mercado considerável (SUTHERLAND; TAIT, 1992). Dentre o grande número de polissacarídeos produzidos na natureza, por plantas, algas, e bactérias, a xantana é uma das poucas com propriedades funcionais únicas, como a capacidade de espessar e estabilizar (HARDING; CLEARY; IELPI, 1993). É produzida pela bactéria Gram-negativa *Xanthomonas campestris*, pertencente à família *Pseudomonaceae* (CIVEROLO; HATTINGH, 1993).

O sucesso da xantana está baseado nas suas importantes propriedades reológicas. É muito utilizada na indústria de tintas, petroquímica e farmacêutica, ou como agente suspensivo e estabilizante em produtos agrícolas. Na indústria de alimentos é utilizada por um número importante de razões, incluindo estabilização de emulsões, estabilidade à temperatura, compatibilidade com outros ingredientes, e propriedades reológicas (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Devido à grande importância industrial da xantana, torna-se necessário investigar os fatores envolvidos na produção e sua conseqüente influência na qualidade deste biopolímero. Estudos já comprovaram que a variação dos parâmetros de produção influencia na produtividade e qualidade do biopolímero.

O processo de fermentação da *Xanthomonas campestris* envolve dois estágios: crescimento celular e produção do biopolímero. O crescimento celular, normalmente, também envolve dois ou mais estágios (CADMUS et al., 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Durante o desenvolvimento do inóculo o objetivo é aumentar a concentração de células mas minimizar a produção de xantana, porque o biopolímero ao redor da célula impede o transporte de nutrientes e estende a fase lag do crescimento. Então, para evitar a produção de xantana o volume de inóculo é progressivamente aumentado (*inoculum build-up*), de 5-7mL, no primeiro estágio, para 40-100mL, em um estágio intermediário, terminando em 500mL ou mais (CADMUS et al., 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). O crescimento celular e a produção de biopolímero são afetados pela diluição ou mistura do caldo de fermentação (KENNEDY et al., 1982). A realização das condições ótimas de

fermentação para produção de polissacarídeos é particularmente importante devido à ampla aplicabilidade industrial da goma xantana. Contudo, o processo precisa ser viável economicamente.

Frascos sob agitação são usados muitas vezes em estágios anteriores ao bioprocessamento, geralmente com o propósito de seleção de meios, cepas e/ou condições operacionais. Estudos mostraram que, sob velocidade de agitação constante, a taxa de transferência de oxigênio é principalmente em função da proporção entre o volume do líquido e o volume do frasco (V_l/V_f), e da forma do frasco (SERRANO-CARREON et al., 1995; REGULY, 2000).

A proposta deste trabalho foi estudar a produção, composição química e viscosidade do biopolímero sintetizado por *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, cepas 06 e 101, usando inóculo obtido em estágio único com diferentes condições de aeração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, cepas 06 e 101, fornecida pelo Centro de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado (CPACT-EMBRAPA) localizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. A bactéria foi mantida por repiques mensais em meio SPA, incubadas a 28°C, por 24 horas e armazenadas a 4°C.

2.2 Inóculo

O pré-inóculo em meio YM (HAYNES et al., 1955) contendo 1.2×10^9 e 1.6×10^9 UFC.mL⁻¹ das cepas 06 e 101, respectivamente, foi inoculado em três diferentes proporções de volume de líquido (V_l) por volume do frasco (V_f), como mostrado na Tabela 1. Os frascos foram incubados em agitador orbital (New Brunswick, Scientific, modelo Innova 4230) a 28°C e 150rpm, por 24 horas.

Tabela 1 – Proporções de volume de líquido (V_l) / volume do frasco (V_f) do inóculo.

Condição	Vol. líquido (V_l)	Vol. frasco (V_f)	(V_l/V_f)	Vol. livre (%)
A	7 mL	125 mL	0,056	94
B	50 mL	250 mL	0,20	80
C	100 mL	250 mL	0,40	60

2.3 Crescimento microbiano

A concentração microbiana foi estimada através de plaqueamento de diluição em série. A medida foi expressa em unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC.mL⁻¹). A contagem do inóculo foi realizada em zero e 24 horas.

2.4 Produção de xantana

De cada condição testada (A, B, C) foi transferido 7mL de inóculo para erlenmeyers de 250mL contendo meio de produção MPII (CADMUS et al. 1978 modificado por VENDRUSCOLO et al. 2000), incubado a 28°C e 200rpm, por 72 horas. Ao final do tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas (Sorvall Instruments RC-5C) a 16.000g durante 45 minutos para remoção das células. Ao sobrenadante foi adicionado etanol 96°GL na proporção 1:4 para precipitação do exopolissacarídeo que foi então seco em estufa a 56°C. O produto seco foi triturado, pesado e a medida de produção expressa em g.L⁻¹ de meio. Todas as amostras foram feitas em triplicata.

2.5 Viscosidade

As soluções de xantana em água deionizada a 1% (m/v) foram agitadas por duas horas, aquecidas a 60°C por 20 minutos e mantidas em temperatura ambiente por 24 horas sob repouso (XUEWU et al.,1996). A medida de viscosidade do caldo fermentado e das soluções aquosas foi determinada em reômetro rotacional (HAAKE RS150), a 25°C, utilizando-se sistema de cilindros coaxiais, sensor DG41, taxa de deformação de 0,01 – 100s⁻¹, com tempo de 300 segundos para cada análise, com total de 50 pontos.

2.6 Composição química

Os biopolímeros foram suspensos em HCl 2N na concentração de 3% (m/v) e hidrolisadas a 80°C por 16 horas. O produto hidrolisado foi analisado por Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC) em placas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck). Foram aplicados 3µL das amostras hidrolisadas e dos padrões, utilizando como eluente clorofórmio – metanol – ácido acético – água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Utilizou-se como revelador o reagente de detecção anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 100°C por 5min (MOREIRA; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1998). Os constituintes dos biopolímeros foram comparados aos padrões autênticos de glicose, ramnose, manose e ácido glicurônico.

2.7 Análise Estatística

A análise estatística dos dados de produção de xantana foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, admitindo nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento microbiano

A Tabela 2 contém os resultados do crescimento microbiano durante as primeiras 24 horas de fermentação, fase de desenvolvimento do inóculo. Houve multiplicação celular em todos os tratamentos, observando-se maior desenvolvimento na condição A, onde foi utilizada maior proporção de volume livre do frasco e, portanto, maior concentração de oxigênio. As condições B e C, inoculadas com a mesma concentração celular, porém submetidas a aeração diferentes, não apresentaram diferença na multiplicação celular.

Tabela 2 – Crescimento bacteriano (UFC.mL⁻¹) de *Xanthomonas campestris* pv pruni XC06 e XC 101 obtida em diferentes condições de aeração do inóculo.

Cepa	Tempo (h)	Crescimento microbiano (UFC.mL ⁻¹)		
		Aeração		
		A (94%)	B (80%)	C (60%)
06	0	1,7 . 10 ⁸	2,4 . 10 ⁸	2,4 . 10 ⁸
	24	1,7 . 10 ⁹	1,4 . 10 ⁹	1,5 . 10 ⁹
101	0	2,3 . 10 ⁸	3,2 . 10 ⁸	3,2 . 10 ⁸
	24	2,1 . 10 ⁹	1,9 . 10 ⁹	1,9 . 10 ⁹

Na literatura pertinente não há referências com relação à condições de aeração do inóculo, porém vários autores se referem à concentração de células do inóculo. Pan, Moreira e Vendruscolo (2000) analisaram o efeito da concentração do inóculo na produção de xantana e verificaram que o número de células iniciais tem influência sobre a produção e qualidade do biopolímero sintetizado por *X. campestris* pv pruni cepa 06. Avaliaram o crescimento celular em 0 e 24h e observaram diminuição de células viáveis durante esse período, diferentemente do encontrado neste estudo.

3.2 Produção de xantana

As diferentes proporções de aeração de inóculo testadas não apresentaram diferença significativa na produção de xantana por uma mesma cepa, como mostra a Figura 1. Porém, quando analisada uma única condição, observa-se diferença entre a xantana produzida por cada cepa. Esse resultado mostra que, neste caso, a variação na concentração do polímero foi determinada pela cepa e não pela aeração do frasco. Os maiores resultados de produção de xantana foram obtidos pela cepa 101, sendo significativamente maior, ao nível de 5%, que a cepa 06 em todas as condições de inóculo testadas. O maior resultado observado foi obtido pela cepa 101 condição B (5,9g.L⁻¹) e o menor resultado foi obtido pela cepa 06 (4,1g.L⁻¹) na condição com menor porcentagem de volume livre (C). Vale ressaltar que, as diferentes proporções de aeração foram testadas apenas na fase de crescimento

celular sendo possível afirmar que, nesta etapa da produção de xantana, a aeração do meio não influenciou significativamente na quantidade de polímero produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni cepas 06 e 101.

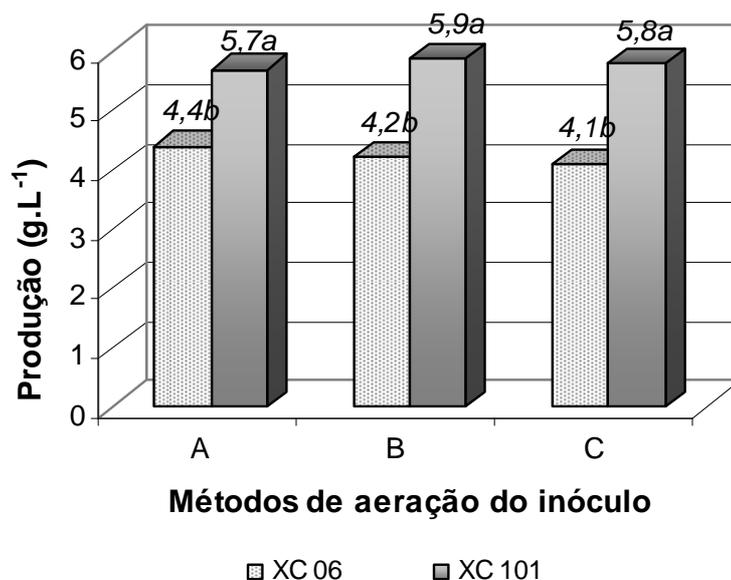


Figura 1 – Produção de xantana (g.L⁻¹) em diferentes condições de aeração de inóculo.

*Médias seguidas por letras iguais, não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis, em nível de 5% de significância.

Os resultados de produção de xantana estão em concordância com Moreira et al. (2001), que estudaram seleção de 18 cepas de *X. campestris* pv pruni, incluindo a cepa 06, obtendo 4,0g.L⁻¹ para esta cepa usando a condição padrão. Borges (2004) também selecionou cepas de *X. campestris* pv pruni pela condição padrão encontrando 6,1g.L⁻¹ para cepa 101, valor muito próximo aos encontrados neste experimento.

Como discutido por García-Ochoa et al. (2000), e confirmado por outros autores, a produção e propriedades da xantana são influenciadas pela cepa (MOREIRA et al., 2001; BORGES, 2004), meio de produção (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; ANTUNES et al., 2000), além de outros parâmetros de

produção (PAN; MOREIRA; VENDRUSCOLO, 2000; BORGES, 2004). Swings e Civerolo (1993) descreveram que como a *X. campestris* é aeróbia estrita, o oxigênio é necessário tanto para o crescimento como para a produção de xantana devido o aumento de viscosidade do caldo.

3.3 Viscosidade

A fermentação da xantana é acompanhada pelo aumento na viscosidade do caldo devido a acumulação extracelular do biopolímero, que diminui a transferência de oxigênio para a célula. Durante o crescimento celular, o ideal é evitar este acúmulo ao redor da célula a fim de se obter o máximo desenvolvimento do microrganismo na etapa inicial de produção de xantana (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Por esta razão, torna-se importante verificar a viscosidade do caldo durante a produção do biopolímero.

As viscosidades determinadas nos caldos fermentados das diferentes condições de aeração testadas em duas cepas de *X. campestris* pv pruni são mostradas na Figura 2. Ao analisar essa figura, observa-se uma relação direta da viscosidade do caldo com a porcentagem de volume livre do frasco. Na condição A, onde havia 94% de espaço vazio, e portanto, maior aeração, as viscosidades foram mais altas, sendo cerca de 200mPa.s para ambas as cepas, na taxa de deformação 10s^{-1} . Do mesmo modo, a condição C, com menor aeração, mostrou viscosidade ao redor de 24 e 20mPa.s (taxa de deformação 10s^{-1}), para cepas 06 e 101, respectivamente.

Segundo Reguly (2000), em fermentações laboratoriais, normalmente conduzidas em *shaker*, o sistema de agitação e aeração é um só, onde o ar atmosférico estéril contido no interior dos frascos é incorporado ao caldo através do mecanismo de agitação. Desta forma, como não tem injeção de ar, a eficiência do suprimento de ar é determinada pela velocidade de agitação, volume livre e forma do frasco.

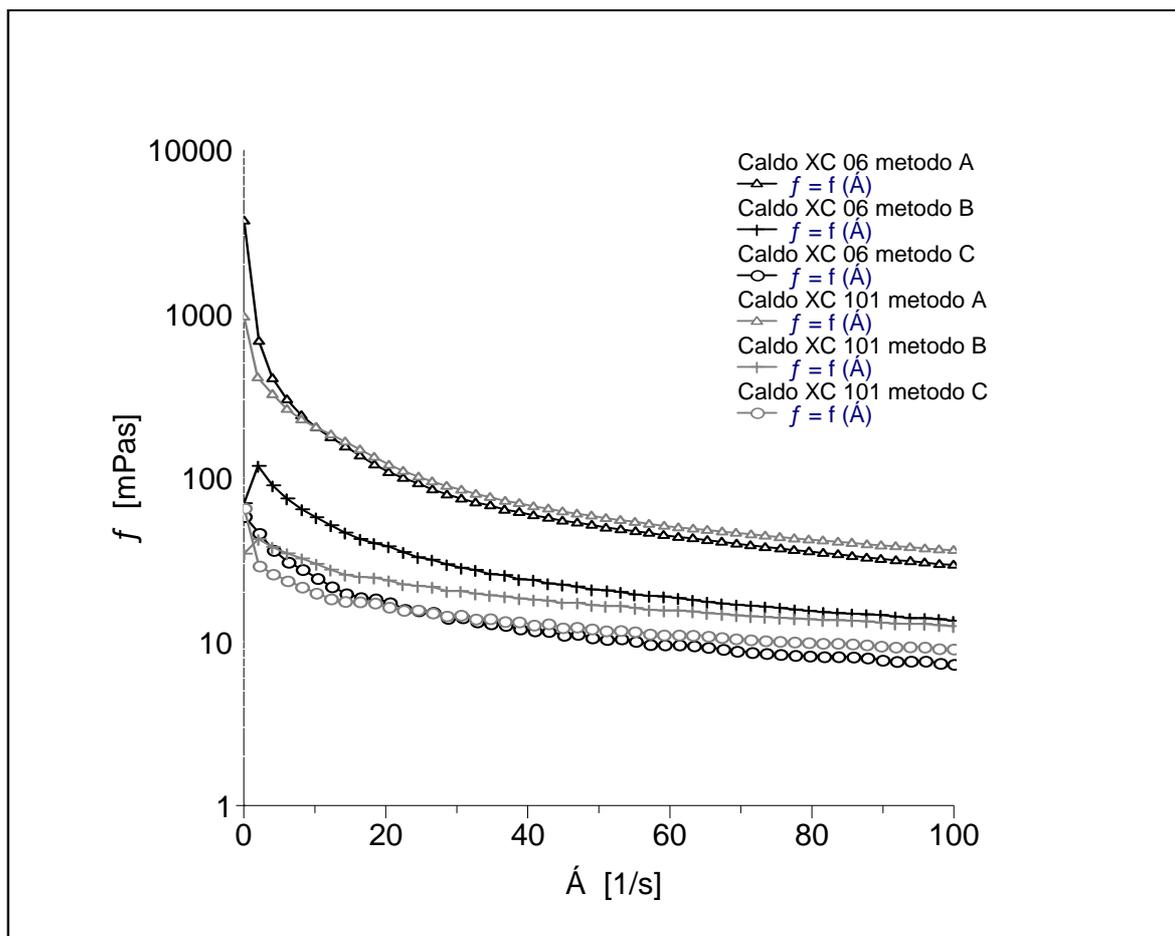


Figura 2 – Viscosidade (mPa.s) do caldo fermentado do inóculo de *X. campestris* pv pruni XC06 e XC101 submetidos a diferentes condições de aeração.

Lotter & Büchs (2004) também verificaram um aumento na viscosidade do caldo ao cultivar *X. campestris* em frascos erlenmeyers 250mL com um volume de 25mL, onde as maiores viscosidades significaram maior concentração de xantana no caldo, sendo que após 24h, a viscosidade do caldo alcançou aproximadamente 120mPa.s.

Após recuperação e secagem do biopolímero, a viscosidade das soluções aquosas de xantana sintetizada pelas cepas 06 e 101 foi determinada. As soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana produzida sob diferentes condições de aeração de inóculo apresentaram comportamento pseudoplástico (Fig. 3). Esse comportamento é típico de soluções de xantana e caracteriza-se pela diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de deformação.

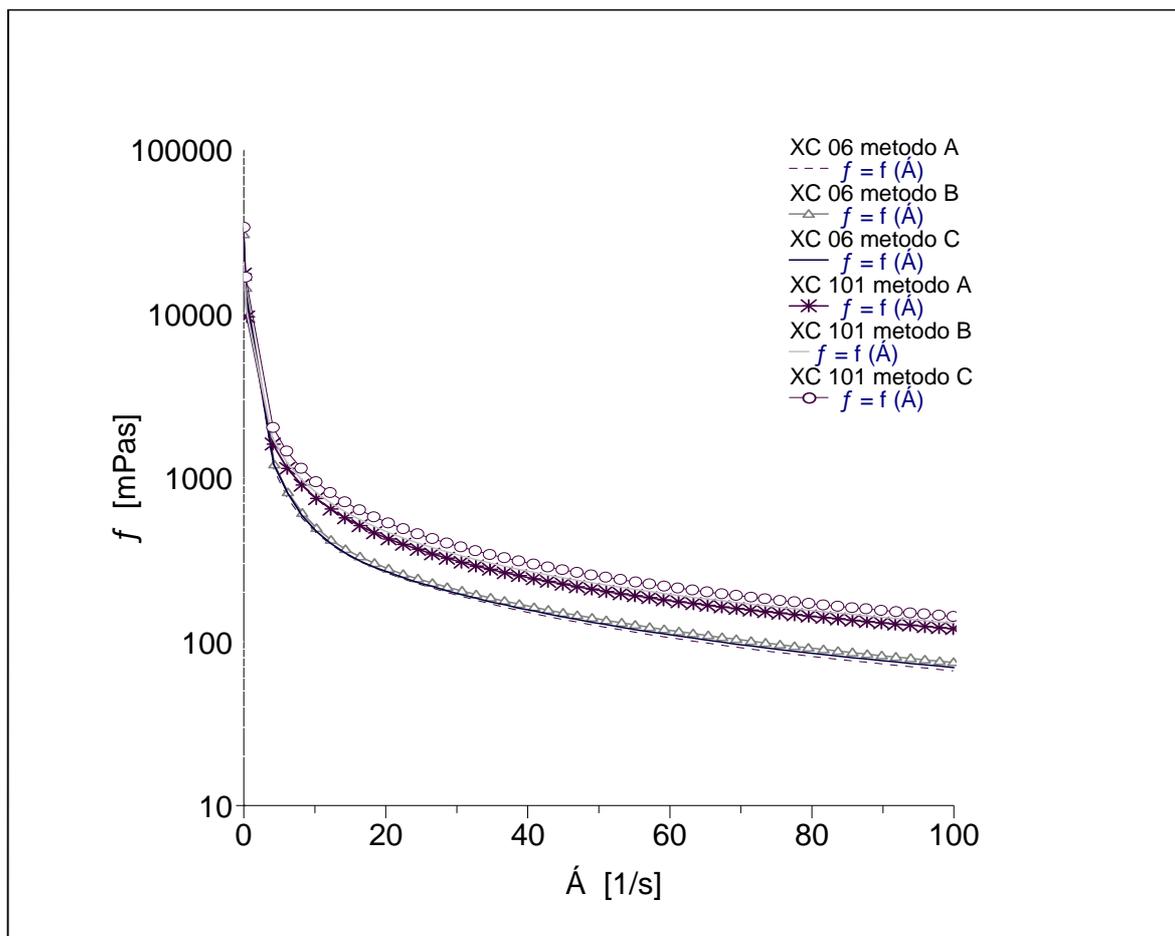


Figura 3 – Viscosidade (mPa.s) de soluções aquosas de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC06 e XC101 em diferentes condições de aeração do inóculo.

A viscosidade das soluções de uma mesma cepa praticamente manteve-se com a variação das condições de inóculo. A cepa 101 apresentou viscosidade aproximadamente duas vezes maior que a cepa 06, em todas as condições testadas (Tab. 3). A viscosidade da xantana sintetizada pela cepa 06 variou entre 470 e 490mPa.s, em $10s^{-1}$, já a xantana produzida pela cepa 101 apresentou valores entre 926 e 945mPa.s, na mesma taxa de deformação.

Borges (2004) determinou a viscosidade de biopolímeros sintetizados por 30 cepas de *X. campestris* pv pruni, em solução a 3%, e obteve resultados que variaram entre 1370 e 12700mPa.s, na taxa de deformação $10s^{-1}$, demonstrando que o comportamento reológico também foi dependente da cepa. A solução aquosa (3%) da xantana produzida pela cepa 101 apresentou a maior viscosidade (12700mPa.s).

Diaz et al. (2001) estudou a influência de sais do meio de cultivo na produção e viscosidade do biopolímero sintetizado pela cepa 06 de *X. campestris*. Na análise da viscosidade aparente das soluções aquosas do biopolímero, utilizando viscosímetro Brookfield, encontrou valores entre 2100 e 5100cP a 6rpm.

Tabela 3 – Viscosidade (mPa.s) de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC06 e XC101 em diferentes condições de aeração de inóculo.

Cepas	Aeração	Viscosidade (mPa.s)			
		Taxas de deformação (s ⁻¹)			
		10	30	60	100
06	A (94%)	470	190	110	70,9
	B (80%)	490	200	120	78,4
	C (60%)	470	190	110	70,9
101	A (94%)	945	377	217	141
	B (80%)	926	374	215	137
	C (60%)	937	374	213	137

3.4 Composição química

Os biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv pruni, cepas 06 e 101 apresentaram perfil cromatográfico similar em todas as condições testadas. Pela análise cromatográfica foi verificada a presença das seguintes substâncias: glicose, manose, ramnose e ácido glicurônico (Fig.4).

A análise cromatográfica provou que a xantana produzida pelo patovar pruni tem a presença do monossacarídeo ramnose, diferentemente da xantana produzida pelo patovar campestris, usada industrialmente (VENDRUSCOLO et al., 2000). A presença deste açúcar pode ser uma característica desejável, em geral, o biopolímero no qual este se apresenta possui capacidade geleificante, quando em solução aquosa. Isto esclarece o fato da xantana comercial não ter capacidade gelificante em solução aquosa, mesmo em altas concentrações.

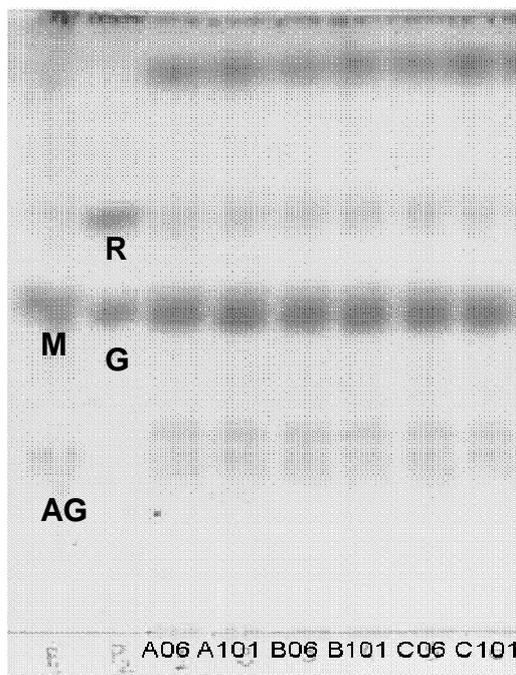


Figura 4 – Composição química de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC06 e XC101 em diferentes condições de aeração do inóculo. Padrões: (P1) ramnose (R) e glicose (G); (P2) ácido glicurônico (AG) e manose (M).

4 CONCLUSÃO

As diferentes condições de aeração do inóculo testadas não influenciaram a produção de xantana pelas cepas 06 e 101 de *X. campestris* pv pruni, assim como a viscosidade das soluções aquosas deste polímero. Porém houve variação em função da cepa utilizada. A composição química não sofreu qualquer alteração quanto a presença dos monossacarídeos.

5 REFERÊNCIAS

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6, n.2, 123-125, mai-ago, 2000.

BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv pruni e das condições operacionais**. 2004. 49f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

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

DIAZ, P. S.; BRITES, P. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Efeito da concentração de sais $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, MgSO_4 e K_2HPO_4 na produção e viscosidade de xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros / IX International Macromolecular Colloquium**. Gramado, 2001.

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

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**, VCH, 1994, p. 495-514.

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

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

LOTTER, S.; BÜCHS, J. Utilization of specific power input measurements for optimization of culture conditions in shaking flasks. **Biochemical Engineering Journal**, v.17, p.195-203, 2004.

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

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

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

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. v.3. Pelotas: Gráfica Universitária, 2000. 218p.

SERRANO-CARREON, L.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M. E.; GALINDO, E. kinetics and broth rheology evolution during xanthan production by *Xanthomonas campestris* cultured in shake flasks. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v.3, n.1, p.67-73, 1995.

SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T.; Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv pruni cepas 24 e 58. **Revista Ciência e Engenharia (Science Engineering Journal)**, v.8, n.2, 115-123, 1999.

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

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R. C.; SCMAPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv rpuni C24. in: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**, v.1, Elsevier, 2000, p. 187-191.

XUEWU, Z.; XIN, L.; DEXIANG, G.; WEI, Z.; TONG, X.; YONGHONG, M. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v.27, p. 203-209, 1996.

2ºARTIGO

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DA XANTANA E NO PERFIL ELETROFORÉTICO DE *Xanthomonas campestris* pv pruni.

A. M. Teixeira¹; P. L. Antunes¹; C. T. Vendruscolo²; F. A. B. Del-Pino³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

²Laboratório de Biopolímeros - Centro de Biotecnologia – UFPel

³Departamento de Bioquímica – UFPel

Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

RESUMO

A produção de biopolímero e a viscosidade podem variar em função da bactéria utilizada e do tempo de fermentação. Da mesma forma os níveis de substituição dos grupos acetil e piruvato da molécula de xantana. Estudou-se a influência do tempo de fermentação na produção, composição química e viscosidade do biopolímero, e no perfil eletroforético das enzimas secretadas durante a fermentação. O processo foi conduzido em fermentador a 28°C, 500rpm e 1vvm. O microrganismo utilizado foi a bactéria *X. campestris* pv pruni cepas 06 e 101. A determinação da composição química da xantana foi em monossacarídeos, avaliados por cromatografia de camada delgada comparativa, e grupos acetil e piruvato, por avaliação colorimétrica. A viscosidade das soluções de xantana (1%) foi determinada em reômetro rotacional a 25°C, com sistema de cilindros coaxiais e taxa de deformação 0,01 a 100s⁻¹. O perfil eletroforético foi caracterizado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A maior quantidade de xantana produzida pela cepa 06 ocorreu em 66 e 96h (7,3g.L⁻¹). A cepa 101 produziu mais xantana em 120h (7,6g.L⁻¹). Os biopolímeros sintetizados pelas duas cepas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, não diferindo na composição dos açúcares glicose, manose, ramnose e ácido glicurônico. Quanto ao teor de acetil e piruvato, as duas cepas sintetizaram biopolímeros com composição diferenciada. A xantana produzida pela cepa 06 apresentou teor de acetil entre 2,73 e 4,03%, e piruvato entre 2,19 e 4,12%. A cepa 101 produziu xantana com teor de acetil superior a 5%

em todos os horários e com teor de piruvato quase nulo (0,25 a 0,5%). A viscosidade também variou ao longo da fermentação, sendo maior em 36h (11190mPa.s) e 24h (979mPa.s), para soluções de xantana sintetizada pelas cepas 06 e 101, respectivamente. No perfil eletroforético, identificou-se diferentes enzimas presentes nos tempos de fermentação, provavelmente, responsáveis pela variação de produção, composição química e viscosidade do biopolímero produzido.

Palavras-chave: xantana, tempo de fermentação, eletroforese.

INFLUENCE OF FERMENTATION TIME IN PRODUCTION AND QUALITY OF XANTHAN AND IN ELETROPHORETIC PROFILE OF *Xanthomonas campestris* pv pruni.

A. M. Teixeira¹; C. T. Vendruscolo²; P. L. Antunes¹; F. A. B. Del-Pino³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial - UFPel

²Laboratório de Biopolímeros - Centro de Biotecnologia – UFPel

³Departamento de Bioquímica – UFPel

Universidade Federal de Pelotas, CP 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

ABSTRACT

Biopolymer production and viscosity can vary in function of microorganism used and the fermentation time. In the same way the levels of acetyl and piruvate groups of the xanthan molecule. It was studied the influence of fermentation time in biopolymer production, chemical composition and viscosity, and in the profile eletrophoretic of enzymes during the fermentation. The process was carried in fermentor at 28°C, 500rpm and 1vvm. The microorganism used was *X. campestris* pv pruni strains 06 and 101. The determination of xanthan chemical composition was in monosaccharide, evaluated for comparative thin layer chromatography, and acetyl and piruvate groups, for colorimetric analysis. The viscosity of xanthan solutions (1%) was determined in rheometer at 25°C, with system of coaxial cylinders and shear rate 0.01 to 100s⁻¹. The profile eletrophoretic was characterized by SDS-PAGE. The highest amount of xanthan produced by strain 06 occurred in 66 and 96h (7.3g.L⁻¹). Strain 101 produced more xanthan in 120h (7.6g.L⁻¹). Biopolymers synthesized by both strains had presented similar chromatographic profiles, not differing in the composition from the sugars glucose, mannose, ramnose and glucuronic acid. The acetyl and piruvate content, both strains had synthesized biopolymers with different composition. The xanthan produced by strain 06 presented acetyl content between 2.73 and 4.03%, and piruvate between 2.19 and 4.12%. Strain 101 produced xanthan with acetyl content higher than 5% in all fermentation times and piruvate content between 0.25 and 0.5%. The viscosity also varied during the fermentation, being highest in 36h (11190mPa.s) and 24h (979mPa.s), for solutions of xanthan synthesized by strains 06 and 101, respectively. In the profile eletrophoretic, it was identified different enzymes in the fermentation times, probably, are responsible for the variation of production, chemical composition and viscosity of biopolymer produced.

Key words: xanthan, fermentation time, eletrophoresis.

1 INTRODUÇÃO

A xantana é um polissacarídeo extracelular secretado pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Esse polímero é o mais importante polissacarídeo microbiano produzido industrialmente, sendo amplamente aplicado na indústria de alimentos, bem como na indústria petrolífera, têxtil, farmacêutica, etc.

A xantana é composta por uma cadeia principal celulósica com cadeia lateral trissacarídica ligada a resíduos alternados de glicose. A cadeia lateral consiste de D-ácido glicurônico entre duas unidades de D-manose. Alguns grupos da manose interna são substituídos, no C-6, por grupos acetil e a manose externa pode carregar grupos piruvato.

Segundo Harding, Cleary e Ielpi (1994), o fosfoenolpiruvato atua como um inibidor competitivo da acetilação, sugerindo que a proporção de fosfoenolpiruvato/acetil CoA seja importante na regulação da quantidade de acetilação da xantana. Evidências genéticas indicam que há duas enzimas acetyltransferases específicas para a manose interna e externa.

Os níveis de substituição de acetato e ácido pirúvico na molécula podem variar com as condições de crescimento bacteriano, condições operacionais e também com a espécie de *Xanthomonas*. Variação nos grupos substituintes pode ter um efeito dramático nas propriedades do polímero e, portanto, nas suas aplicações (MORRIS, 1984). Da mesma forma, já foram relatados estudos comprovando que a produção de biopolímero, assim como a viscosidade, podem variar em função da bactéria utilizada e das condições operacionais (VENDRUSCOLO et al., 2000; MOREIRA, 2002; BORGES, 2004).

As cepas produtoras de xantana sintetizam inúmeras enzimas extracelulares que podem degradar o biopolímero, como as celulasas. Geralmente, essas enzimas são produtos intracelulares localizados no periplasma e, caso ocorra a lise das células durante a cultura, estas enzimas podem ser liberadas no meio extracelular e ocorrer a degradação do polímero (SUTHERLAND, 2001).

O objetivo foi avaliar a influência do tempo de fermentação na produção, na composição química, na viscosidade do biopolímero sintetizado e no perfil das proteínas celulares da bactéria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, cepas 06 e 101, fornecida pelo Centro de Pesquisa Agropecuária Clima Temperado (CPACT-EMBRAPA) localizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. A bactéria foi mantida por repiques mensais em meio SPA, incubadas a 28°C, por 24 horas e armazenadas a 4°C.

2.2 Produção do biopolímero

O processo de fermentação foi realizado em duas etapas: produção de células, em agitador orbital, e produção de biopolímero, em fermentador. Na primeira etapa do processo utilizou-se erlenmeyers de 500mL contendo 200mL de meio YM (Yeast Malt) inoculados com $7 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹. Os frascos foram incubados em agitador orbital (New Brunswick Scientific, modelo Innova 4230) a 150rpm, 28°C por 24h. Após a multiplicação celular, 700mL deste cultivo foi transferido para fermentador contendo 6300mL de meio MPII (CADMUS et al,1978 modificado por VENDRUSCOLO et al, 2000) para produção do biopolímero. O processo foi conduzido a 500rpm, 1vvm, 28°C por 120h, sem controle de pH.

Durante a produção do biopolímero foram coletadas amostras nos tempos 0, 12, 24, 36, 48, 54, 66, 72, 84, 96 e 120h. O caldo fermentado coletado nestes tempos foi centrifugado, para remoção das células, em centrífuga (Sorvall Instruments, RC-5C) a 16.000.g, 4°C durante 40min. Ao sobrenadante foi adicionado etanol 96°GL, na proporção de 1:4 (v/v) para precipitação dos biopolímeros, os quais foram secos em estufa a 56°C até peso constante. O precipitado foi ressuspenso em solução salina 0,9% e centrifugado por mais duas vezes. Após a lavagem das células, a massa celular foi retirada dos tubos com a adição de 2mL da mesma solução salina. As células foram lisadas por sonicação (3 pulsos de 10seg), centrifugadas por 10min a 16.000.g. Liofilizou-se 1mL do sobrenadante, seguindo suspensão em 200µL de água deionizada e congelamento.

2.3 Produção de xantana e massa celular seca

A produção de biopolímero foi avaliada em gramas de biopolímero seco por litro de caldo fermentado.

Para a determinação da concentração de massa celular seca foram utilizados 20mL de caldo fermentado, centrifugado a 15200.g, por 10min e descartado o sobrenadante. A biomassa foi então ressuspensa em solução salina 0,9% e centrifugada novamente. Após, seca a 56°C até peso constante e avaliada em gramas de células secas por litro de caldo fermentado.

2.4 Composição química

2.4.1 Determinação de açúcares

Os biopolímeros foram suspensos em HCl 2N na concentração de 3% (m/v) e hidrolisados a 80°C por 16 horas. O produto hidrolisado foi analisado pela técnica de Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC) em placas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck). Aplicou-se 3µL das amostras hidrolisadas e dos padrões, as quais foram eluídas com clorofórmio-metanol-água-ácido acético, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Utilizou-se como revelador o reagente de detecção anisaldeído-sulfúrico e aquecimento à 100°C por 5min (MOREIRA; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1998). Os constituintes foram comparados aos padrões autênticos de glicose, ramnose, manose e ácido glicurônico.

2.4.2 Determinação do teor de acetil

A determinação do teor de acetil da molécula de xantana foi realizada pelo método do ácido hidroxâmico (McCOMB; McCREADY, 1957), uma reação colorimétrica com leitura em comprimento de onda 520nm. Foi realizada uma curva padrão com β-D-glicose pentacetato nas concentrações 60, 120, 180, 240, 300 e 420µg/mL. As amostras de 0,1g de xantana foram dissolvidas em 25mL de cloridrato de hidroxilamina e 25mL de hidróxido de sódio 94% (m/v) sob agitação. Após, foram transferidos 2mL desta solução para balão volumétrico de 25mL e adicionados 5mL de água destilada e 5mL de solução metanólica ácida,

completando o volume final com perclorato férrico. As leituras foram realizadas após cinco minutos, em espectrofotômetro a 520nm.

2.4.3 Determinação do teor de piruvato

A determinação do teor de piruvato na xantana foi por reação colorimétrica pelo método da 2-4 dinitrophenilhidrazina (SLONECKER; ORENTAS, 1962). Para a curva padrão foi utilizado piruvato de sódio nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2mmol L⁻¹. As amostras de xantana foram previamente hidrolisadas como no item 2.4.1. Após, em 200µL do hidrolisado foram adicionados 19,8mL de água destilada. Desta solução, transferiu-se 1mL a tubo de ensaio e se adicionou 1mL da solução 2,4-dinitrofenilhidrazina e 1mL de água destilada. Os tubos foram agitados e aquecidos a 37°C por dez minutos, em banho-maria, com imediato resfriamento. Na seqüência, adicionou-se 5mL de hidróxido de amônio 0,6M em cada tubo. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 420nm.

2.4.4 Viscosidade

As soluções de xantana em água deionizada (1% m/v) foram agitadas por duas horas, aquecidas a 60°C por 20 minutos e mantidas em temperatura ambiente por 24 horas sob repouso (XUEWU et al., 1996). A medida de viscosidade das soluções aquosas foi realizada em reômetro rotacional (HAAKE RS150), a 25°C, utilizando-se sistema de cilindros coaxiais, sensor DG41, taxa de deformação de 0,01 – 100s⁻¹, com tempo de 300 segundos para cada análise, com total de 50 pontos.

2.4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page)

A caracterização das proteínas extracelulares foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram utilizadas as amostras congeladas obtidas no item 2.2. As amostras foram desnaturadas a 95°C por oito minutos em solução de β-mercaptoetanol. A eletroforese foi conduzida em gel com gradiente de 12%, imerso em solução tampão tris 0,025M; glicina 0,192M; SDS 0,1% (pH 8,3). Para identificação das

proteínas presentes nas amostras utilizou-se padrões BIO RAD. as bandas foram reveladas com corante Coomassie Blue.

2.5 Análise estatística

A análise estatística dos dados de produção de xantana e teores de acetil e piruvato foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, admitindo nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de xantana e massa celular seca

A produção de xantana pelas duas cepas testadas foi influenciada pelo tempo de fermentação, sendo crescente, com pequenas oscilações durante as 120 horas de fermentação. A maior quantidade de xantana produzida pela cepa 06 ($7,3\text{g.L}^{-1}$) ocorreu em 66 e 96h, sendo diferente da xantana obtida no tempo zero ($0,3\text{ g.L}^{-1}$). Não houve diferença estatística entre os demais tempos. Já a cepa 101 produziu mais xantana em 120h ($7,6\text{g.L}^{-1}$), diferindo de 0 e 12h, onde a quantidade de xantana sintetizada foi menor (Tab.1).

Tabela 1 – Produção de xantana (g.L^{-1})* por *X. campestris* pv pruni XC06 e XC101, a 28°C , 500rpm, 1vvm, em diferentes tempos de fermentação.

Fermentação (horas)	Produção de xantana (g.L^{-1})			
	Cepas de <i>X. campestris</i> pv pruni			
	XC ⁺ 06		XC ⁺ 101	
0	0,3	B	0,3	C
12	3,7	AB	2,7	BC
24	5,4	AB	5,2	ABC
36	6,0	AB	6,7	ABC
48	6,4	AB	6,3	ABC
54	7,2	AB	6,7	ABC
66	7,3	A	7,1	ABC
72	7,1	AB	7,0	ABC
84	7,2	AB	7,4	AB
96	7,3	A	7,2	ABC
120	6,7	AB	7,6	A

*Médias da mesma coluna seguidas por letras iguais, não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis, em nível de 5% de significância.

**Xanthomonas campestris*

A cepa 06 de *X. campestris* pv *pruni* também foi estudada por Moreira (2002), em volume de 3L, com duas combinações de velocidade de agitação e taxa de aeração. Na condição A (250rpm, 1,5vvm) a produção de xantana atingiu $5,5\text{g.L}^{-1}$ em 48h, e na condição B (350rpm, 2vvm) a maior quantidade de xantana produzida foi em 66h, alcançando $6,5\text{g.L}^{-1}$.

Borges (2004) estudou a produção de xantana por *X. campestris* pv *pruni* cepa 101 em fermentador (3L), sob duas condições: 300rpm e 3vvm (A); 200rpm e 2vvm (B). Assim como Moreira (2002), obteve maior produção de xantana ($8,15\text{g.L}^{-1}$) em 66h na condição de maior agitação e aeração (A), e em 48h na condição de menor agitação e aeração ($7,15\text{g.L}^{-1}$). Na condição de 200rpm e 2vvm (B), obteve $2,7\text{g.L}^{-1}$ em 12h e $7,0\text{g.L}^{-1}$ em 66h, valores muito similares ao encontrados neste estudo nos mesmos tempos, com a mesma cepa.

Pan, Moreira e Vendruscolo (2000), na produção de xantana pela cepa 06, em *shaker*, utilizando seis diferentes concentrações de inóculo obtiveram valores que variaram de $3,4$ a $4,2\text{g.L}^{-1}$, em 72 horas de fermentação, enquanto que Antunes et al. (2000), em fermentação com diferentes meios de cultura, obtiveram as maiores produções de seu estudo com as cepas 06 ($11,7\text{g.L}^{-1}$) e 46 ($12,8\text{g.L}^{-1}$).

Casas, Santos e García-Ochoa (2000) conduziram quatro fermentações com velocidade de agitação constante (100, 300, 500 e 800rpm) ao longo do tempo de fermentação, sob fluxo de ar de 1L/L/min . Na fermentação realizada a 500rpm, observaram a maior produção e crescimento de biomassa. Sánchez et al. (1997) realizaram seleção de cepas produtoras de xantana em frascos agitados, analisaram vários patovares, inclusive *pruni* e obtiveram $7,4\text{g.L}^{-1}$ de xantana sintetizada por *X. campestris* deste patovar.

O tempo de fermentação é fator limitante na produção de xantana, assim como a cepa e os meios também são capazes de influenciar na quantidade e qualidade da xantana produzida. Por esta razão é importante comparar os resultados com os de outras espécies e/ou patovares pois a pesquisa busca sempre analisar diferentes parâmetros dos já divulgados na literatura.

Rottava (2005) selecionado diversas linhagens de *Xanthomonas* sp, em 96 horas de fermentação, obteve os seguintes resultados de produção: $7,2\text{g.L}^{-1}$ para *X. campestris*; $8,83\text{g.L}^{-1}$, para *X. campestris* pv. *magiferaeindicae*; $6,14\text{g.L}^{-1}$ para *X. campestris* pv. *arracaciae*; $7,97\text{g.L}^{-1}$ com *X. campestris* pv. *manihotis*; $7,01\text{g.L}^{-1}$ *X. melonis*; $5,86\text{g.L}^{-1}$ para *Xanthomonas* sp e $7,49$; $8,19$; $9,41$ e $9,6\text{g.L}^{-1}$ para quatro

diferentes linhagens de *X. campestris* pv *campestris*. Esses resultados são, em sua maioria, superiores aos encontrados com o patovar *pruni*, neste estudo. No entanto, Mayer et al. (2005), em seu estudo de produção de xantana, em *shaker* (72 horas), também com diferentes linhagens, obteve resultados inferiores aos deste experimento, sendo nulo para *X. citris*; 5,85g.L⁻¹ para *X. campestris* pv *vesicatoria*; 5,65g.L⁻¹ para *X. axonopodis* UFLA2; 5,30 g.L⁻¹ para *X. axonopodis* couwelo; 3,3 e 4,2g.L⁻¹ de xantana produzida com *X. axonopodis* pv *phaseoli* cepas 3 e 40.

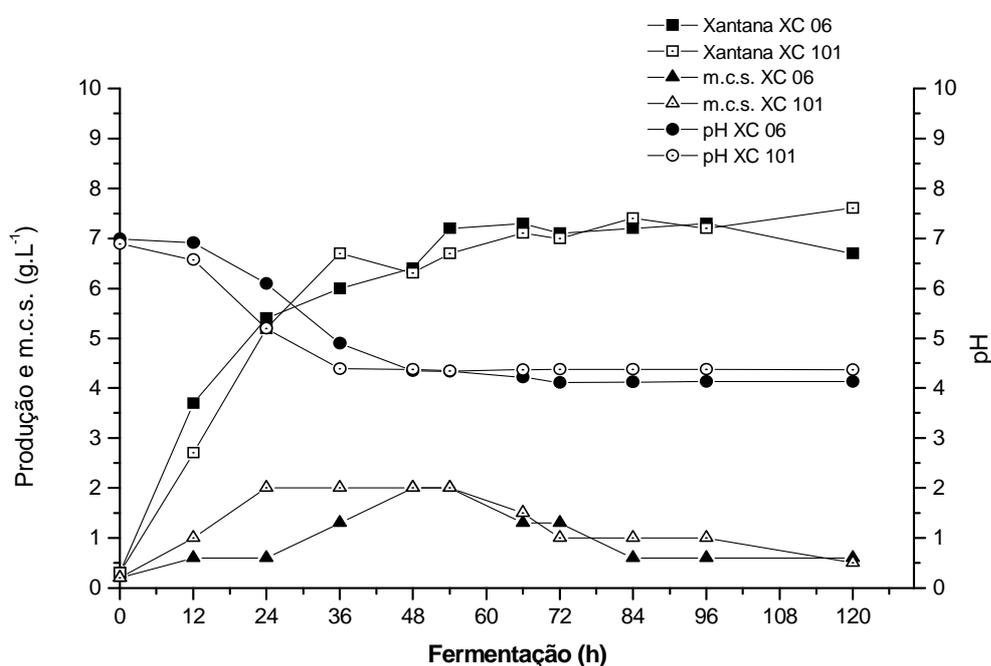


Figura 1 – Produção de xantana, massa celular seca (m.c.s.) e pH do meio fermentado por *X. campestris* pv *pruni* XC06 e XC101 a 28°C, 500rpm, 1vvm, em diferentes tempos de fermentação.

A Figura 1 mostra os resultados de massa celular seca obtidos durante as 120h de fermentação das duas cepas de *X. campestris* pv *pruni*. Observa-se que a produção de xantana tornou-se relevante a partir do final da fase estacionária, contudo, a síntese de biopolímero continuou durante a fase de declínio, das duas cepas testadas. Moreira (2002) verificou comportamento semelhante em seu estudo. Embora a literatura relate que a xantana é produzida durante a fase de crescimento bacteriano, assim como na fase estacionária (BORN; LANGENDORFF; BOULENGUER, 2002).

Durante o processo de fermentação da xantana, o pH do meio tende a cair devido à formação de metabólitos ácidos e da própria xantana, que contém grupos funcionais ácidos. Isto foi confirmado neste estudo, onde o pH do meio diminuiu durante a fermentação pelas duas cepas, partindo de valores próximo à neutralidade até atingir 4,13 e 4,37, em 48h, pelas cepas 06 e 101, respectivamente. A partir desse tempo manteve-se praticamente constante. Borges (2004) também verificou queda de pH em seu estudo, caindo para 4,8, em 48h, mantendo-se inalterado até o final da fermentação (72h).

3.2 Composição química

A composição química dos biopolímeros sintetizados pelas duas cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* foi avaliada pela determinação dos açúcares e dos conteúdos de acetil e piruvato da molécula de xantana.

Observa-se nas Figuras 2 e 3 que os biopolímeros sintetizados pelas duas cepas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, não havendo diferença na composição de açúcares. Nas duas cepas, independente do tempo de fermentação, foram identificados glicose, manose, ácido glicurônico e ramnose, composição já comprovada por outros autores para o patovar *pruni* (MOREIRA; SOUZA; VENDRUSCOLO, 1998; ANTUNES et al., 2000). Estes resultados confirmam aqueles obtidos por Moreira (2002) e Borges (2004) utilizando as cepas 06 e 101, respectivamente. Quando analisados qualitativamente, os biopolímeros apresentam a mesma composição, porém observa-se diferença no tamanho e intensidade das manchas, sugerindo quantidades variáveis dos constituintes.

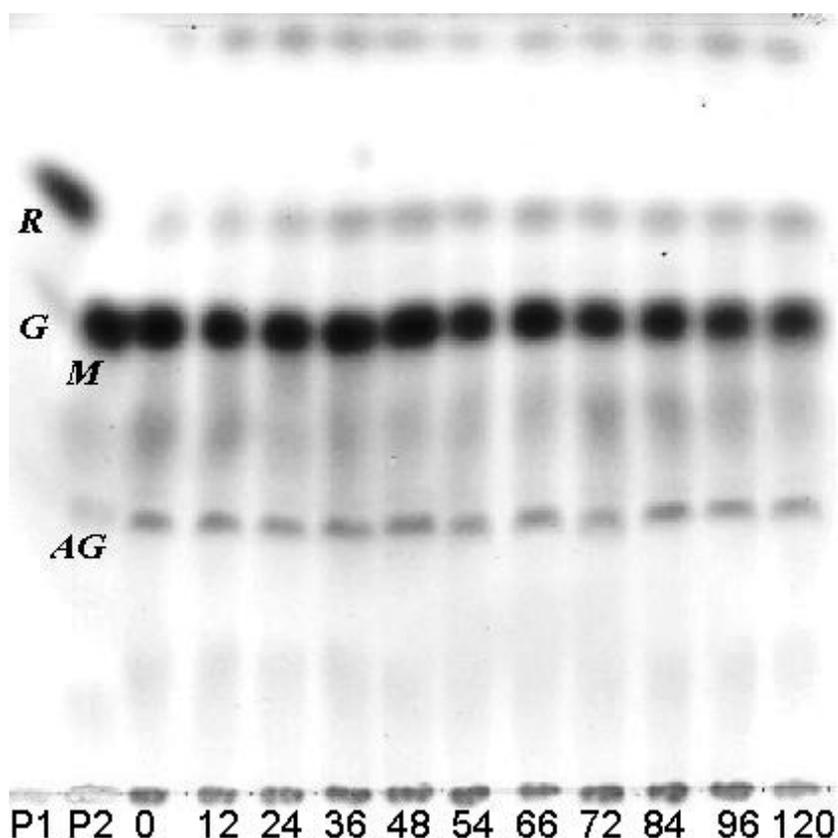


Figura 2 – Composição química de xantana sintetizada por *X. campestris* pv *pruni* XC06 em diferentes tempos de fermentação. Padrões: (P1) ramnose (R) e glicose (G); (P2) ácido glicurônico (AG) e manose (M).

A literatura relata que mudanças na composição do biopolímero podem ocorrer em função das condições operacionais empregadas, bem como pela bactéria utilizada. Essas mudanças são, na maioria das vezes, principalmente nos níveis dos grupos acetil e piruvato ligados à estrutura básica do biopolímero. (MORRIS, 1995; PAPAGIANNI et al., 2001).

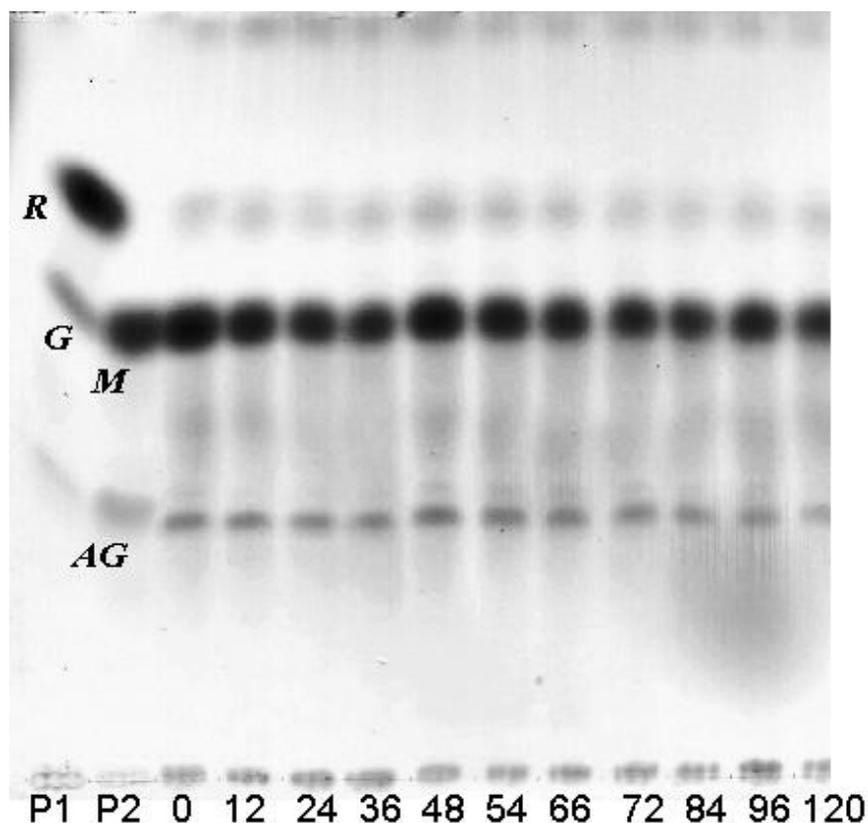


Figura 3 – Composição química de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC101 em diferentes tempos de fermentação. Padrões: (P1) ramnose (R) e glicose (G); (P2) ácido glicurônico (AG) e manose (M).

Os grupos acetil e piruvato da molécula dos biopolímeros produzidos por *X. campestris* pv pruni 06 e 101 foram influenciados pela cepa e pelo tempo de fermentação. Observa-se na Fig. 4 que os biopolímeros sintetizados pelas duas cepas têm composição diferenciada de acetil e piruvato.

A xantana sintetizada pela cepa 06 tem teor de acetil e piruvato semelhantes, com variação durante a fermentação. Os valores variaram entre 2,73 e 4,03%, para o teor de acetil, e entre 2,19 e 4,12% para piruvato. O maior teor de acetil ocorreu em 36h e o de piruvato em 12h. A cepa 101 produziu xantana com alto teor de acetil, sendo superior a 5% em todos os tempos de fermentação e com maior valor em 96h (6,87%). O teor de piruvato verificado na xantana da cepa 101 variou entre 0,25 e 0,5%.

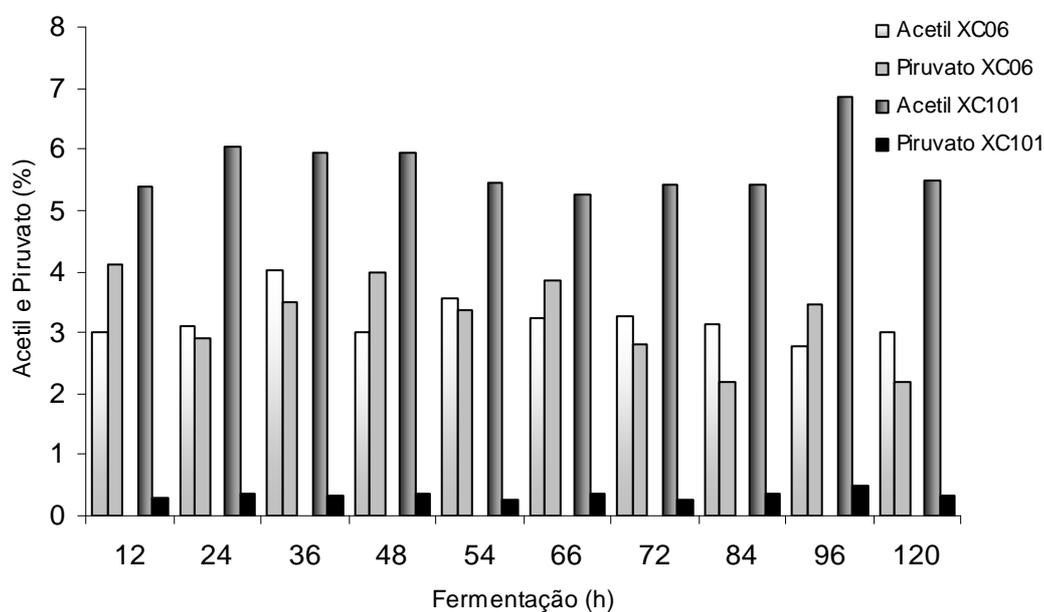


Figura 4 – Teor de acetil e piruvato de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC06 e XC101 a 28°C, 500rpm, 1vvm, em diferentes tempos de fermentação.

Sánchez et al. (1997), ao selecionarem cepas produtoras de xantana, também encontraram baixo teor de piruvato em xantanas sintetizadas por dois isolados de *X. campestris* pv *campestris*, sendo 0,24 e 0,5%. Casas, Santos e García-Ochoa, (2000) encontraram 4,44% de grupos acetil e 1,78% de piruvato em xantana sintetizada por *X. campestris* NRRL B 1459, sob as mesmas condições deste estudo (28°C, 500rpm, 1L/L/min).

Tabela 2 – Teor de acetil e teor de piruvato de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC06 e XC101, a 28°C, 500rpm, 1vvm, em diferentes tempos de fermentação.

Fermentação (horas)	Acetil (%)				Piruvato (%)			
	XC ⁺ 06		XC ⁺ 101		XC ⁺ 06		XC ⁺ 101	
12	3,00	AB	5,38	AB	4,12	A	0,28	AB
24	3,10	AB	6,04	A	2,89	AB	0,37	AB
36	4,03	A	5,95	AB	3,50	AB	0,32	AB
48	3,02	AB	5,95	AB	3,99	AB	0,37	AB
54	3,55	A	5,45	AB	3,37	AB	0,25	B
66	3,22	AB	5,26	B	3,84	AB	0,36	AB
72	3,25	AB	5,42	AB	2,81	AB	0,26	B
84	3,15	AB	5,42	AB	2,19	B	0,36	AB
96	2,76	B	6,87	A	3,45	AB	0,50	A
120	3,00	AB	5,50	AB	2,19	B	0,33	AB

*Médias da mesma coluna seguidas por letras iguais, não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis, em nível de 5% de significância.

**Xanthomonas campestris*

3.3 Viscosidade

Os resultados de viscosidade são apresentados de duas formas, para melhor entendimento. Os gráficos (Fig. 5 e 6) permitem a avaliação do comportamento pseudoplástico das soluções, enquanto que na tabela (Tab. 3) pode-se avaliar a intensidade da pseudoplasticidade e a viscosidade pontual. A pseudoplasticidade caracteriza-se pela diminuição da viscosidade à medida que aumenta-se a taxa de deformação (NAVARRO, 1997). Esse comportamento é típico de soluções de xantana e pode ser observado nas Fig. 5 e 6, que apresentam os resultados de viscosidade de soluções de xantana, obtidas em diferentes tempos de fermentação, sintetizada pelas cepas 06 e 101, respectivamente.

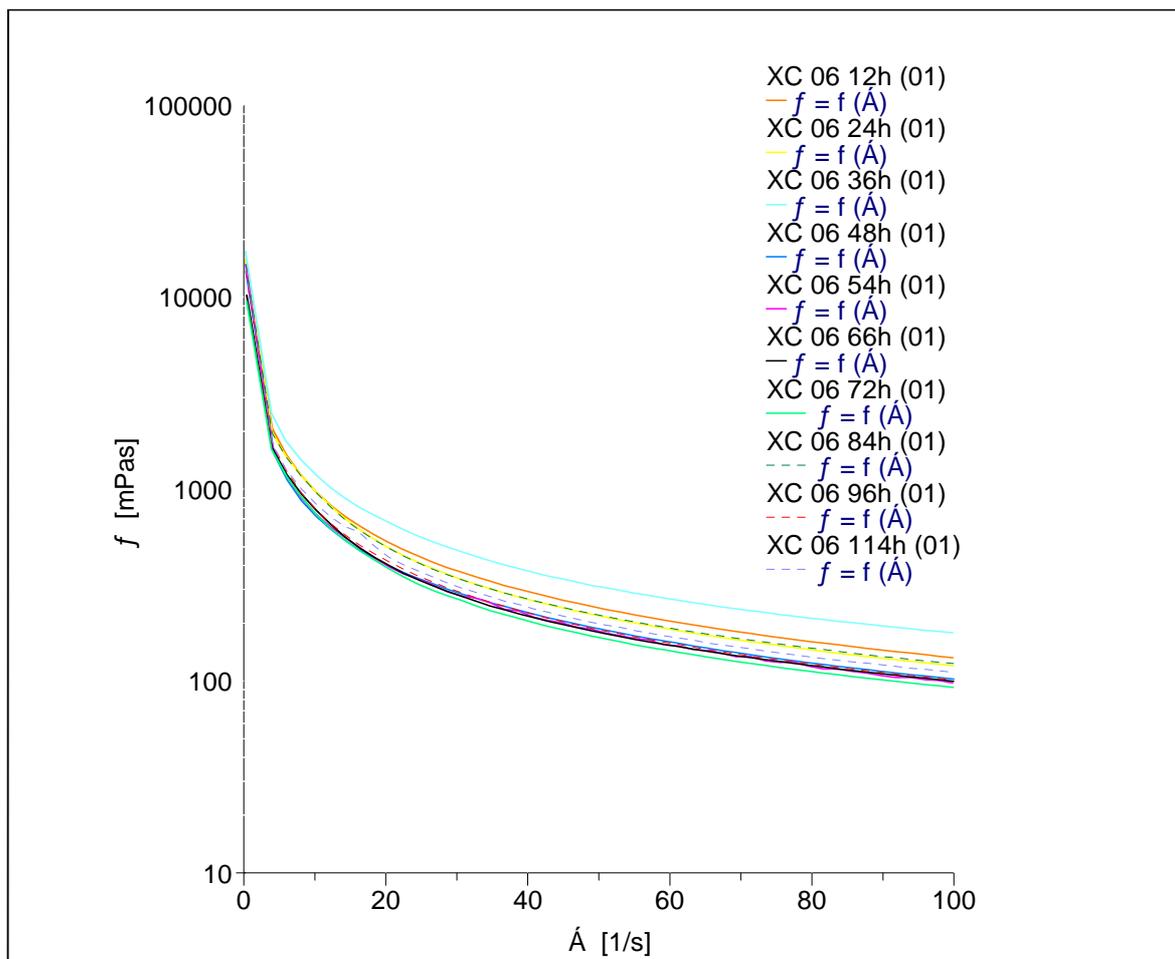


Figura 5 – Viscosidade (mPa.s) das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC06, em diferentes tempos de fermentação, medida a 25°C.

Pode-se observar que as soluções aquosas da xantana produzida pela cepa 06 em 36h apresentou maior viscosidade, porém, menor pseudoplasticidade, o que em muitos casos é desfavorável para utilização em produtos que necessitam ser bombeados (Fig. 5). As soluções de xantana produzidas pela cepa 101 apresentaram maior viscosidade quando produzidas em 24h, no entanto sua pseudoplasticidade foi praticamente a mesma das demais soluções (Fig. 6).

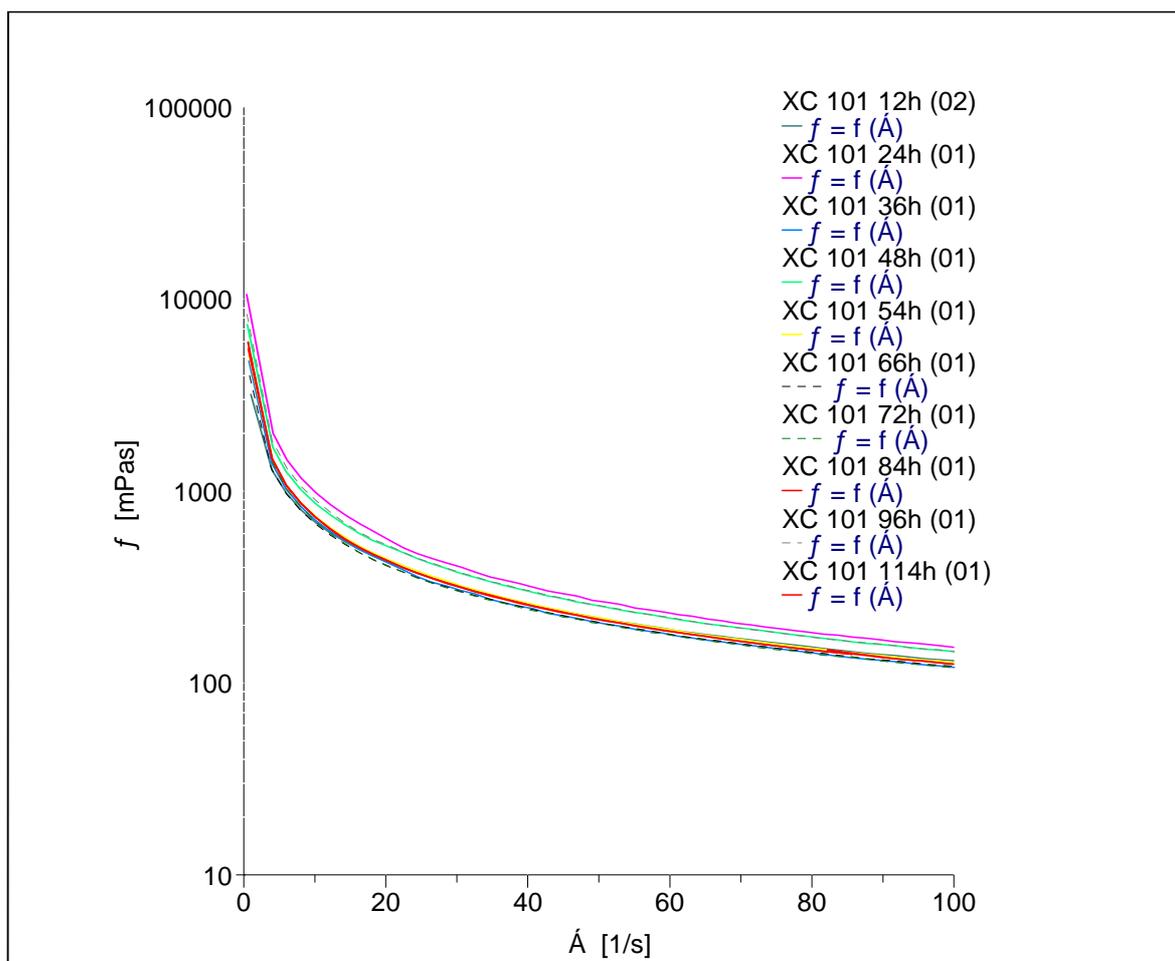


Figura 6 – Viscosidade (mPa.s) das soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana sintetizada por *X. campestris* pv *pruni* XC101, em diferentes tempos de fermentação, medida a 25°C.

Na Tabela 3 constam os resultados de viscosidade das soluções aquosas do biopolímero a 1% obtido em diferentes tempos de fermentação medida a 25°C, nas taxas de deformação 10, 30, 60 e 100s⁻¹. O tempo de fermentação, assim como a cepa, influenciou a viscosidade das soluções. A maior viscosidade encontrada foi 1190mPa.s, em 36h de fermentação para cepa 06. Nas 12 horas seguintes (48h) houve um decréscimo na viscosidade. De 48 até 84h a viscosidade tornou a ser crescente, alcançando 956mPa.s, nesse último horário. Nos tempos seguintes ocorreu nova queda nos valores de viscosidade. As soluções aquosas da cepa 101 também apresentaram variações na viscosidade durante as 120 horas de fermentação. Atingiu 979mPa.s em 24h, caindo para 702mPa.s em 36h e subindo novamente em 48h. Entre 48 e 66h houve nova queda com posterior aumento até 96h (895mPa.s).

Tabela 3 – Viscosidade (mPa.s) de soluções aquosas a 1% (m/v) de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC06 e XC101 em diferentes tempos de fermentação, medida a 25°C, nas taxas de deformação 10, 30, 60 e 100s⁻¹.

Cepa	Fermentação (horas)	Viscosidade (mPa.s)			
		Taxa de deformação (s ⁻¹)			
		10	30	60	100
06	12	966	370	208	132
	24	972	339	189	120
	36	1190	473	270	178
	48	718	284	161	102
	54	741	277	154	97,4
	66	774	276	155	99,6
	72	737	263	145	92,5
	84	956	337	191	123
	96	787	288	159	101
	120	840	305	172	111
101	12	682	298	181	121
	24	979	401	233	153
	36	702	304	182	120
	48	860	371	221	146
	54	733	319	192	128
	66	673	298	180	120
	72	685	298	180	122
	84	729	313	187	125
	96	895	374	222	145
	120	729	315	188	125

Moreira et al. (2001) ao avaliar a viscosidade de soluções aquosas a 1% de xantana obtida pela cepa 06 também em diferentes tempos de fermentação obteve valores entre 610 e 770mPa.s, sendo que em 42h obteve 710mPa.s, valor semelhante ao encontrado neste estudo em 48h.

Borges (2004) analisou a viscosidade de soluções a 3% de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni cepa 101 em diferentes tempos de fermentação sob duas combinações de aeração e agitação. Alcançou 7100mPa.s em 54h, na condição de maior agitação e aeração, e 5400mPa.s, em 48h, na condição de menor agitação e aeração, ambas a 25°C, na taxa de deformação 10s⁻¹.

Mayer et al. (2005), estudaram a viscosidade para as soluções aquosas a 3% das xantanas obtidas com cepas de diferentes linhagens e obtiveram resultados com variação de 2.680 a 4.940mPa.s, quando analisadas na taxa de deformação 10s⁻¹. Rottava (2005), também nas mesmas condições de preparo e leitura, avaliou a viscosidade de soluções aquosas a 3% de xantana sintetizada por diversas

linhagens de *Xanthomonas* sp, obtendo resultados inferiores, entre 71 e 1.818mPa.s.

Comparando dados da produção com dados de viscosidade pontuais, ficou comprovado que a partir de 36h e 48h ambas as cepas testadas estabilizaram sua produção e neste mesmo intervalo de tempo obteve-se os melhores resultados de viscosidade para ambas as cepas. Estes resultados são produzidos quando ocorre a estabilização do pH.

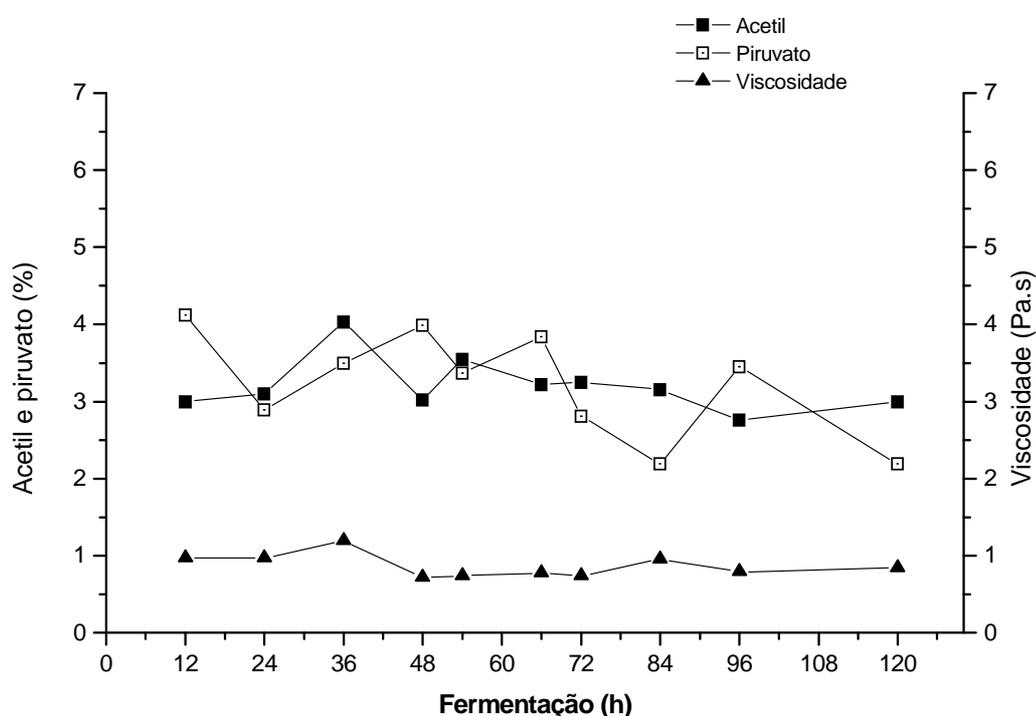


Figura 7 – Viscosidade (Pa.s) vs teor de acetil (%) vs teor de piruvato (%) de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC06, em diferentes tempos de fermentação.

Também em relação a viscosidade alguns autores sugerem que o teor de piruvato é indicador das propriedades reológicas do biopolímero. Entretanto, no presente estudo esta relação foi verificada para o conteúdo de acetil. As soluções aquosas de xantana das duas cepas apresentaram uma tendência de incremento de viscosidade com o aumento do conteúdo de acetil, e decréscimos de viscosidade para teor de acetil menores, não apresentando qualquer relação com o teor de

piruvato. A maior viscosidade da xantana produzida pela cepa 06 ocorreu em 36h, juntamente com o maior teor de acetil, e a menor viscosidade das soluções da cepa 101 foi para o menor teor de acetil, ocorrido em 66h.

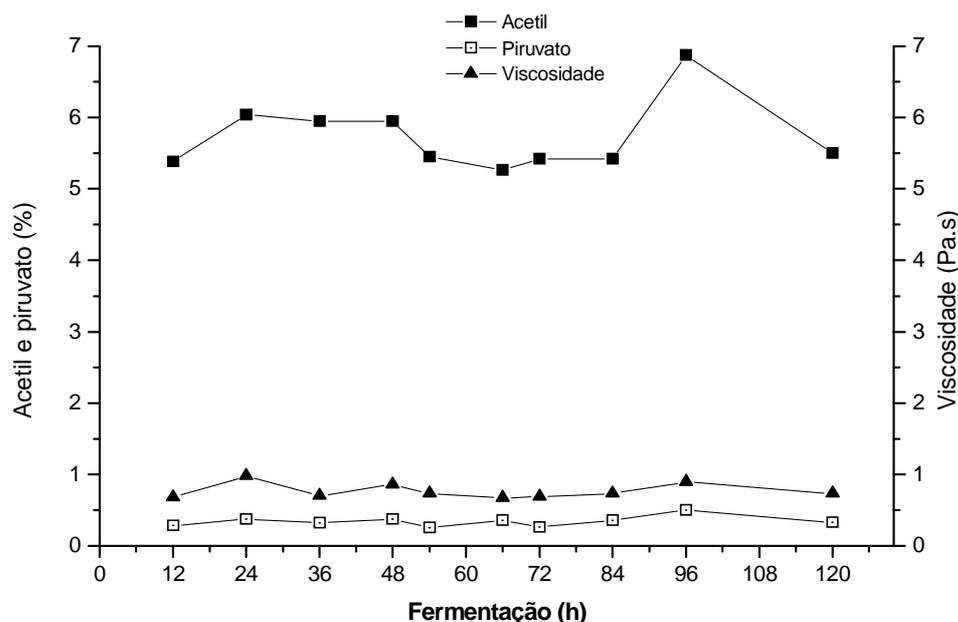


Figura 8 – Viscosidade (Pa.s) vs teor de acetil (%) vs teor de piruvato (%) de xantana sintetizada por *X. campestris* pv pruni XC101, em diferentes tempos de fermentação.

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As Figuras 9 e 10 apresentam o perfil eletroforético das enzimas durante a produção de xantana pelas cepas 06 e 101 de *X. campestris* pv pruni, respectivamente. Observa-se que cada horário diferiu no número de bandas apresentadas, indicando a presença de diferentes enzimas e, possivelmente em diferentes concentrações, dependendo do tempo de incubação.

Isto possivelmente seja a explicação das variações que ocorrem na produção e na composição química do biopolímero nos diferentes tempos de fermentações. Também a presença das diferentes proteínas encontradas na caracterização enzimática pode estar influenciando ora, de forma positiva, ora de forma negativa, a viscosidade das soluções aquosas.

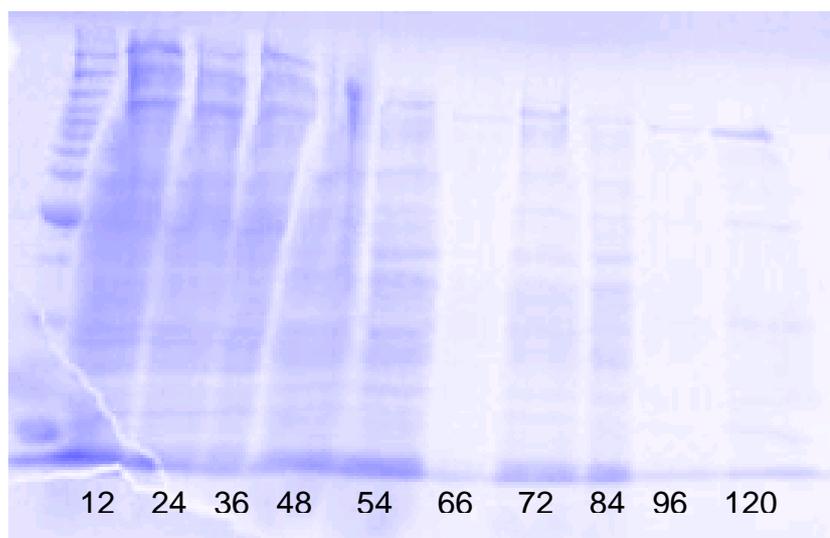


Figura 9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas secretadas na produção de xantana por *X. campestris* pv pruni cepa 06.

Na literatura pertinente não há referência à relação entre o perfil eletroforético e tempo de fermentação de xantana. Padilha (1997) verificou a mesma relação entre as enzimas secretadas e o tempo de fermentação na produção de biopolímero por *Beijerinckia* sp 7070.

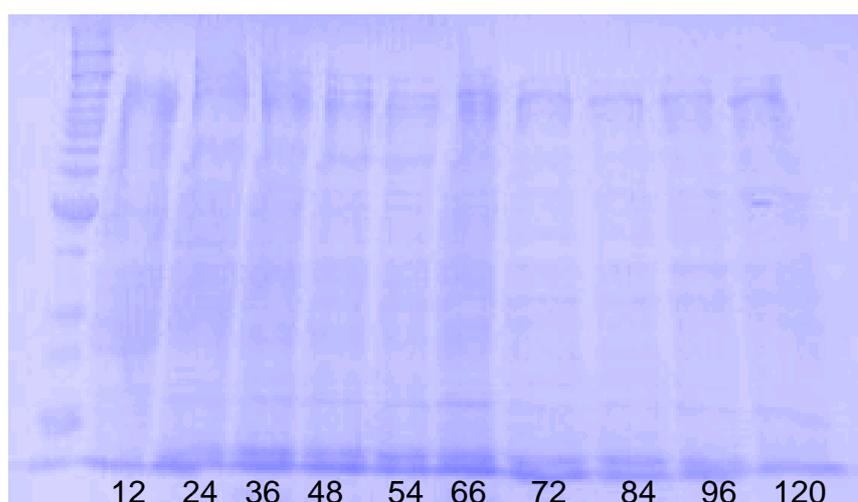


Figura 10 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das proteínas secretadas na produção de xantana por *X. campestris* pv pruni cepa 101.

4 CONCLUSÃO

O tempo de fermentação e a cepa influenciaram a produção, composição química, viscosidade dos biopolímeros e o perfil eletroforético das proteínas celulares. A produção de xantana foi crescente até 54h. A partir desse tempo, o pH e a produção de biopolímero mantiveram-se praticamente constante. A maior viscosidade para polímero da cepa 101 foi em 24h enquanto que para cepa 06 foi em 36h. Comparando produção e viscosidade, conclui-se que a fermentação para obtenção de xantana pode ser finalizada em 36h para cepa 06 e 48 para cepa 101 pela qualidade dos polímeros apresentados.

5 REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6, n.2, 123-125, mai-ago, 2000.
- BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* e das condições operacionais**. 2004. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers - biology, chemistry, biotechnology and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. p. 259-291.
- CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1003-1014, 1978.
- CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.282-291, 2000.
- HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**. VCH, 1994. p.495-514.
- MAYER, L.; VENDRUSCOLO, C.; MICHELS, R.; BASTOS, C. P.; BITENCOURT, A. Correlação entre produção, viscosidade e teor de piruvato no biopolímero de 5 cepas de *Xanthomonas*. **XIV Congresso de Iniciação Científica**, UFPel, Pelotas, 2005.

McCOMB, E. A.; McCREADY, R. M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. **Analytical Chemistry**, v.29, n.5, p.819-821, 1957.

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

MORRIS, V. J. Bacterial Polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharide and their applications**. New York: Basel Marcel Dekker, 1995, p.341-375.

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

NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: EDUCS, 1997. 256p.

PADILHA, F. F. **Síntese e caracterização de biopolímeros por *Beijerinckia* sp 7070**. 1997. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

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

ROTTAVA, i. **Caracterização molecular e seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana**. 2005. 89f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim.

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

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

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

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R. C.; SCMAPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv *rpuni* C24. in: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**, v.1, p. 187-191. Elsevier, 2000.

XUEWU, Z.; XIN, L.; DEXIANG, G.; WEI, Z.; TONG, X.; YONGHONG, M. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v.27, p. 203-209, 1996.

ABSTRACT

The variation in fermentation parameters can influence in xanthan production, chemical composition and viscosity. Xanthan production is carried through in two stages: cells production (inoculum development) and biopolymer production. It was studied inoculum production, in shaker, with three different aeration variations in function of the ratio of liquid volume and flask volume (94, 80 and 60% of empty volume), being overcome as standard reference 94%, condition normally used for inoculum production. It had been evaluated production, chemical composition and viscosity of xanthan synthesized by *X. campestris* pv *pruni* strains 06 and 101. Strain 101 produced highest amount and better quality of xanthan in all the variations tested. The different aeration variations had not influenced the production and viscosity of the xanthans produced by both strains, being possible, therefore, the use of any of the aeration variations tested. For the xanthan production in fermentor, the inoculum was produced in shaker, with the 60% of aeration flask, evaluated in the previous experiment. The fermentation was carried at 28°C, 500rpm and 1vvm. It had evaluated the influence of fermentation time in the production, chemical composition and viscosity of xanthan and in the profile eletrophoretic of *X. campestris* pv *prui* strains 06 and 101 enzymes. Strain 06 produced the highest xanthan amount in 66 and 96h (7.3g.L⁻¹), and strain 101, in 120h (7.6g.L⁻¹). In biopolymer synthesized by both strains was detected the glucose, mannose, ramnose and glucuronic acid presence. The acetil and piruvate content varied with the increase of the fermentation time. The viscosity also varied, being higher in 36h (1190mPa.s) and 24h (979mPa.s), for the solutions of xanthan by strains 06 and 101, respectively. In eletrophoretic characterization had been different bands, in each fermentation time, suggesting the presence of different enzymes in each time. These enzymes could be the responsible ones for the alterations in the biopolymer production, chemical composition and viscosity during the fermentation.

Key words: xanthan, inoculum, enzymes, fermentation time.

CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos de diferentes condições de aeração do inóculo na produção de xantana em agitador incubador não apresentaram diferença na produção e viscosidade do polímero produzido pelas cepas 06 e 101 de *X. campestris* pv pruni.

O estudo de produção em fermentador de 10 litros utilizando um inóculo com a aeração correspondente a 60% de volume livre, mostrou que o tempo de fermentação e a cepa influenciaram a produção, composição química, viscosidade dos biopolímeros e o perfil eletroforético das proteínas celulares . A comparação da produção e viscosidade, mostra que o tempo de fermentação para obtenção de xantana pode ser de 36h para cepa 06 e 48 para cepa 101 pela qualidade dos polímeros obtidas nos respectivos tempos.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6, n.2, 123-125, mai-ago, 2000.
- BECKER, A.; KATSEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical and genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p. 145-152, 1998.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 1992. 223p.
- BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* e das condições operacionais**. 2004. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S.; STEINBÜCHEL, A. **Biopolymers - biology, chemistry, biotechnology and applications**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. p. 259-291.
- CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1003-1014, 1978.
- CHALLEN, I. A. Xanthan gum: a multifunctional stabilizer for food products. In: NISHINARI, K.; DOI, E. **Food Hydrocolloids: Structure, Properties, and Functions**. New York: Plenum Press, 1994. p.135-140.
- CIVEROLO, E. L.; HATTINGH, M. J. *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: cause of prunus bacterial spot. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. p. 60-64. London: Chapman & Hall, 1993.
- DE VUYST, L.; VERMEIRE, A. Use of industrial médium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL-B-1459. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.42, p.187-191, 1994.

GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. **Institution of Chemical Engineers**, v.72, part. C, p.227-237, 1994.

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

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; IELPI, L. Genetics and biochemistry of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. In: HUI, Y. H.; KHACHATOURIANS, G. G. **Food Biotechnology Microorganisms**, p. 495-514. VCH, 1994.

IELPI, L.; COUSO, R.O.; DANKERT, M.A. **Journal of Bacteriology** , v.175, p.2490-2500, 1993.

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

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

KATZEN, F. D.; FERREIRO, U.; UDDO, C. G.; IELMINI, M. V.; BECKER, A.; PUHLER, A.; IELPI, L. *X. campestris* pv *campestris* gum mutants: effects on xanthan biosynthesis and plant virulence. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.7, p.1607-1617, 1998.

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

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

MAUGERI FILHO, 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, p. 125-153, 2001.

McCOMB, E. A.; McCREADY, R. M. Determination of acetyl in pectin and in acetylated carbohydrate polymers. **Analytical Chemistry**, v.29, n.5, p.819-821, 1957.

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. 2002. 75f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MORRIS, E. R. Molecular origin of xanthan solution properties. In: SANDFORD, P. A.; LASKIN, A. **Extracellular microbial polysaccharides**. ACS Symposium Series v. 45, Washington, D. C.: American Chemical Society, 1977. p.81-89.

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

MORRIS, V. J. Bacterial Polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food Polysaccharide and their applications**. New York: Basel Marcel Dekker, 1995, p.341-375.

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

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. v.3. Pelotas: Gráfica Universitária, 2000. 218p.

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

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

SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T.; Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *X. campestris* pv pruni cepas 24 e 58. **Revista Ciência e Engenharia (Science Engineering Journal)**, v.8, n.2, 115-123, 1999.

STANKOWSKI, J. D.; MUELLER, B. E.; ZELLER, S. G. Location of second O-acetyl group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydrate Research**, v.241, p.321-326, 1993.

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

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

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

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

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

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

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

TAIT, M. I.; SUTHERLAND, W.; CLARKE-STURMAN, A. J. Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. **Journal of General Microbiology**, v.132, p.1493-1492, 1986.

TAYLOR, K. C.; NASR-EL-DIN, H. A. Xanthan biopolymers: a review of methods for the determination of concentration and for the measurement of acetate and pyruvate content. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v.9, p.273-279, 1993.

VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo da região de Ribeirão Preto – SP Brasil.** 1995. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R. C.; SCMAPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv rpuni C24. in: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**, v.1, p. 187-191. Elsevier, 2000.