



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL**

**CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA EM FUNÇÃO
DA CEPA DE *Xanthomonas campestris* pv pruni E DAS
CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a. Claire Tondo Vendruscolo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Área de Concentração: Microbiologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

PELOTAS

Rio Grande do Sul - Brasil

Fevereiro de 2004

CAROLINE DELLINGHAUSEN BORGES

**CARACTERIZAÇÃO DA GOMA XANTANA EM FUNÇÃO
DA CEPA DE *Xanthomonas campestris* pv *pruni* E DAS
CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação da Prof^a. Claire Tondo Vendruscolo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Área de Concentração: Microbiologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada: março de 2004

Orientação:

Prof^a. Dra. Claire Tondo Vendruscolo

Comissão Julgadora:

Prof^a. Dra. Claire Tondo Vendruscolo

Dra. Angelita da Silveira Moreira

Prof^a. Dra. Maria Isabel Corrêa da Silva Machado

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa

Dedico...

A Deus pela força e motivação;

A meus pais, irmãos e
familiares, pois mesmo longe
estão sempre muito perto;

Ao Felipe pelo amor e
compreensão.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Dra. Claire Tondo Vendruscolo pela oportunidade e apoio durante o curso e execução do trabalho.

À Dra. Angelita Moreira pelos conhecimentos transmitidos e auxílio prestado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela disponibilização de equipamentos, e ao Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, PhD pela colaboração.

Aos professores do PPGCTA pelos ensinamentos, em especial Prof. Dr. Wladimir Padilha e Prof. Dr. Pedro Antunes pelo auxílio prestado.

Aos estagiários e colegas do Centro de Biotecnologia, em especial do Laboratório de Biopolímeros.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

SUMÁRIO	XI
SUMMARY.....	XIII
INTRODUÇÃO GERAL	1
HIPÓTESE.....	2
OBJETIVO GERAL	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
XANTANA SINTETIZADA POR CEPAS DE <i>XANTHOMONAS CAMPESTRIS</i> PV PRUNI: PRODUÇÃO, VISCOSIDADE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	3
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
2.1 MATERIAIS	6
2.1.1 <i>Microrganismos</i>	6
2.1.2 <i>Meios de cultura</i>	6
2.1.3 <i>Xantana</i>	6
2.2 MÉTODOS	7
2.2.1 <i>Delineamento experimental</i>	7
2.3 PROCESSOS.....	7
2.3.1 <i>Produção dos biopolímeros</i>	7
2.3.1.1 <i>Recuperação</i>	7
2.4 AVALIAÇÃO.....	8
2.4.1 <i>Produção</i>	8
2.4.2 <i>Viscosidade</i>	8

2.4.3	<i>Composição química</i>	8
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3.1	PRODUÇÃO	9
3.2	VISCOSIDADE	10
3.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	12
3.4	PRODUÇÃO VS VISCOSIDADE VS COMPOSIÇÃO QUÍMICA	13
4	CONCLUSÃO	14
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
	INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE XANTANA POR XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV PRUNI CEPA 101	25
	RESUMO	25
	ABSTRACT	27
1	INTRODUÇÃO	29
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	MATERIAL.....	30
2.1.1	<i>Microrganismo</i>	30
2.2	MÉTODO	30
2.2.1	<i>Delineamento experimental</i>	30
2.3	PROCESSO.....	30
2.4	PRODUÇÃO DE XANTANA.....	30
2.5	AVALIAÇÃO.....	31
2.5.1	<i>Produção de xantana e massa celular seca</i>	31
2.5.2	<i>Coefficiente de transferência de oxigênio (k_La)</i>	31
2.5.3	<i>Viscosidade</i>	32
2.5.4	<i>Composição química</i>	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1	PRODUÇÃO	33
3.2	VISCOSIDADE	35

3.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA	37
4	CONCLUSÃO.....	38
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
	CONCLUSÕES GERAIS	48
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	49

ÍNDICE DE TABELAS

XANTANA SINTETIZADA POR TRINTA CEPAS DE *Xanthomonas campestris* pv pruni: PRODUÇÃO, VISCOSIDADE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

TABELA 1: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO DE XANTANA (G.L^{-1}) POR DIFERENTES CEPAS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI..... 15

TABELA 2: VISCOSIDADE APARENTE (MPA.S) A 25°C DA SOLUÇÃO AQUOSA A 3% (M/V) DAS XANTANAS SINTETIZADAS POR 29 CEPAS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI E DE XANTANA COMERCIAL DIALISADA E NÃO DIALISADA . 18

TABELA 3: COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS XANTANAS SINTETIZADAS POR 29 CEPAS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI 21

INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA POR *Xanthomonas campestris* pv pruni 101

TABELA 1: ANÁLISE ESTATÍSTICA DA PRODUÇÃO DE XANTANA, MASSA CELULAR SECA E PH DO MEIO FERMENTADO POR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI 101 EM DUAS COMBINAÇÕES DE VELOCIDADE DE AGITAÇÃO E TAXA DE AERAÇÃO (CONDIÇÃO A: 300RPM, 3VVM E CONDIÇÃO B: 200RPM, 2VVM) EM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO..... 40

TABELA 2: VISCOSIDADE APARENTE (MPA.S) A 25°C E 65°C NAS TAXAS DE DEFORMAÇÃO 10, 30, 60 E 100s^{-1} DAS SOLUÇÕES AQUOSAS A 3% (M/V) DA XANTANA COMERCIAL E DAS XANTANAS SINTETIZADAS POR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI CEPA 101 EM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO NAS CONDIÇÕES A:300RPM, 3VVM E B:200RPM, 2VVM 41

ÍNDICE DE FIGURAS

XANTANA SINTETIZADA POR TRINTA CEPAS DE *Xanthomonas campestris* pv pruni: PRODUÇÃO, VISCOSIDADE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

- FIGURA 1: PRODUÇÃO DE XANTANA (G.L^{-1}) POR CEPAS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI. 16
- FIGURA 2: VISCOSIDADE APARENTE VS TAXA DE DEFORMAÇÃO, A 25°C DAS SOLUÇÕES AQUOSAS A 3% (M/V) DE XANTANA COMERCIAL E DAS XANTANAS SINTETIZADAS PELAS CEPAS 25, 30, 83, 101, 108, 113 DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI. 17
- FIGURA 3: CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC) DE XANTANA PRODUZIDA POR 29 CEPAS DE *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI. (P1) PADRÕES DE ÁCIDO GLICURÔNICO (AG) E MANOSE (M); (P2) PADRÕES DE GLICOSE (G) E RAMNOSE (R), NO SISTEMA CLOROFÓRMIO: METANOL: ÁCIDO ACÉTICO: ÁGUA, 40:40:10:10 (V/V/V/V) E GEL DE SÍLICA 60, REVELADOR ANIZALDEÍDO SULFÚRICO. COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO: (GD) GLICOSE DEGRADADA E (O) OLIGOSSACARÍDEOS. 19
- FIGURA 4: CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA (CCDC) DA XANTANA COMERCIAL (X) E DA XANTANA COMERCIAL DIALISADA (XD). (P1) PADRÕES DE ÁCIDO GLICURÔNICO E MANOSE; (P2) PADRÕES DE GLICOSE E RAMNOSE, NO SISTEMA CLOROFÓRMIO: METANOL: ÁCIDO ACÉTICO: ÁGUA, 40:40:10:10 (V/V/V/V) E GEL DE SÍLICA 60, REVELADOR ANIZALDEÍDO SULFÚRICO. COMPOSTOS DE DEGRADAÇÃO: (GD) GLICOSE DEGRADADA E (O) OLIGOSSACARÍDEOS. 20

**INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE GOMA
XANTANA POR *Xanthomonas campestris* pv pruni 101**

- FIGURA 1: EFEITO DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE XANTANA POR *X. CAMPESTRIS* PV PRUNI 101, MASSA CELULAR SECA E PH DO MEIO EM FUNÇÃO DA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO E TAXA DE AERAÇÃO (CONDIÇÃO A: 300RPM, 3VVM E CONDIÇÃO B: 200RPM, 2VVM). 39
- FIGURA 2: VISCOSIDADE APARENTE A 25°C VS TAXA DE DEFORMAÇÃO (s^{-1}) DAS SOLUÇÕES AQUOSAS A 3% (M/V) DAS XANTANAS SINTETIZADAS POR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI CEPA 101 EM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO NAS CONDIÇÕES A: 300RPM, 3VVM E B: 200RPM, 2VVM..... 42
- FIGURA 3: VISCOSIDADE APARENTE A 65°C VS TAXA DE DEFORMAÇÃO (s^{-1}) DAS SOLUÇÕES AQUOSAS A 3% (M/V) DAS XANTANAS SINTETIZADAS POR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI CEPA 101 EM DIFERENTES TEMPOS DE FERMENTAÇÃO NAS CONDIÇÕES A: 300RPM, 3VVM E B: 200RPM, 2VVM..... 43
- FIGURA 4: CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA COMPARATIVA DOS POLÍMEROS SINTETIZADOS PELA *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV PRUNI 101 OBTIDOS SOB AS CONDIÇÕES A E B. PADRÕES: (P1) ÁCIDO GLICURÔNICO (AG), MANOSE (M) (P2) GLICOSE (G), RAMNOSE (R)..... 44

SUMÁRIO

BORGES, DELLINGHAUSEN CAROLINE M.S., Universidade Federal de Pelotas, Fevereiro de 2004. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv pruni e das condições operacionais.** Professora Orientadora: Claire Tondo Vendruscolo.

Caracterizou-se a goma xantana sintetizada por trinta cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni, e em diferentes condições operacionais. O biopolímero foi produzido em agitador orbital em frascos de 50mL, posteriormente avaliou-se a produção, viscosidade aparente e a composição química dos biopolímeros produzidos. Os resultados de produção, viscosidade e composição química quantitativa são dependentes das cepas. As soluções aquosas a 3% (m/v) das xantanas produzidas pelas 29 cepas apresentaram comportamento pseudoplástico. As xantanas sintetizadas pelas 29 cepas apresentaram ramnose, manose, glicose e ácido glicurônico na sua composição química, porém, com diferenças quantitativas. Dentre as trinta cepas, a 101 foi selecionada em função dos seus resultados para transposição de escala de produção para 3L em fermentador. Avaliou-se produção, viscosidade e composição química dos biopolímeros; pH, coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) e a massa celular seca do meio, em duas combinações de velocidades de agitação e taxa de aeração (condição A: 300rpm; 3vvm e condição B: 200rpm; 2vvm) e em diferentes tempos de fermentação. A produção na condição A foi superior a condição B, exceto em 48h. Os resultados de massa celular seca foram similares nos dois tratamentos, diferindo apenas em 66h. A queda do pH foi semelhante para ambas condições (A e B), com o decorrer do tempo. As soluções aquosas das xantanas sintetizadas sob as duas condições (A e B), nos diferentes tempos, apresentaram comportamento pseudoplástico. A viscosidade aparente das xantanas sintetizadas na condição A foi superior em todos os tempos de fermentação. Na condição A o k_{La} foi superior ao da condição B, demonstrando que a maior concentração de oxigênio dissolvido na condição A favoreceu a

produção de xantana e a viscosidade aparente. Todas as amostras continham os mesmos açúcares e ácido detectados nas xantanas produzidas em escala de 50mL. Até 54h, não houve diferença no perfil cromatográfico das amostras, entre os tratamentos; a partir de 66h o conteúdo de manose diminuiu, em ambos tratamentos e houve incremento na quantidade de glicose na condição B. Os melhores rendimentos e viscosidades foram obtidos na condição de maior velocidade de agitação e maior taxa de aeração (A). Com isto propõe-se, para esta cepa, a utilização da condição A, e o término da fermentação em 54h, quando é alcançada a melhor combinação entre os resultados de produção e viscosidade, com menor gasto de energia e tempo.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris* pv pruni, cepas, condições operacionais.

SUMMARY

BORGES, DELLINGHAUSEN CAROLINE M.S., Federal University of Pelotas, February 2004. **Characterization of the xanthan gum in function of strain of *Xanthomonas campestris* pv pruni and of the operational conditions.** Advisor: Claire Tondo Vendruscolo.

Was characterized the xanthan gum synthesized by thirty strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni, and in different operational conditions. The biopolymer was produced in orbital shaker in 50mL flask, afterwards was evaluated the production, apparent viscosity and the chemical composition of the produced biopolymers. The results of production, viscosity and quantitative chemical composition are dependents of strains. The aqueous solutions 3% (m/v) of the xanthans produced by the 29 strains showed pseudoplastic behavior. The xanthans synthesized by the 29 strains showed rhamnose, mannose, glucose and glucuronic acid in its chemical composition, however, with quantity differences. Amongst the thirty strains, the 101 was selected in function of its results for transposition of scale of production of 3L in fermentor. Was evaluated production, viscosity and chemical composition of the biopolymers; pH, oxygen transfer coefficient (k_La) and the cellular mass dry of the medium, in two combinations of agitation speeds and aeration rate (condition: 300rpm; 3vvm and condition B: 200rpm; 2vvm) and in different times of fermentation. The production in the condition A was higher than condition B, except in 48h. The results of cellular mass dry were similar in the two treatments, differing only in 66h. The decrease of pH was similar for both conditions (A and B) with the to elapse of the time. The aqueous solutions of the xanthans synthesized under the two conditions (A and B), in the different times, showed pseudoplastic behavior. The apparent viscosity of the xanthans synthesized in the condition A was higher in all the fermentation times. In the condition A, the k_La was higher condition B, demonstrating that the higher concentration of oxygen dissolved in the condition A favored the production of xanthan and apparent viscosity. All the samples contained the same sugars and acid detected in the xanthans produced in scale of 50mL. Until 54h, did not

have difference in the chromatographic profile of the samples, between the treatments; from 66h the content of mannose decreased, in both treatments and increased the amount of glucose in condition B. The best results of production and viscosities were obtained in the condition of higher speed of agitation and aeration rate. Herewith was considered, for this strain, the use of the condition A, with ending of the fermentation in 54h, when was reached the best combination enters the results of viscosity and production, with lesser expense of energy and time.

Key-words: *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, strains, operational conditions.

INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à família *Pseudomonaceae*. Morfologicamente apresentam-se como bastonetes retos e isolados, móveis, com flagelo único polar e Gram negativas (Pelczar et al., 1981). Todos os organismos deste gênero, com exceção de *Xanthomonas maltophilia*, são fitopatogênicos (Hayward, 1993).

Dentre os vários isolados do gênero *Xanthomonas*, muitos são mucóides e capazes de produzir um polissacarídeo chamado xantana (Harding et al., 1994).

A xantana comercial é sintetizada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cepa NRRL B-1459 (Jeanes, 1974). Outros patovares, têm demonstrado produtividade comparada ao da cepa comercial (Harding et al., 1994).

O patovar pruni infecta espécies do gênero *Prunus* como pessegueiros, ameixeiras e amendoeiras, ocasionando "Prunus bacterial spot" (PBS) ou mancha bacteriana (Civerolo & Hattingh, 1993). Segundo Tessmann (2002) diversas cepas do patovar pruni têm potencial para serem exploradas para produção do polímero xantana, entretanto, torna-se necessária a seleção das cepas que apresentam melhor relação quantidade/qualidade da goma produzida.

Além da cepa, também é necessário o conhecimento dos parâmetros de fermentação, para otimizar a produção de biopolímeros (Richard & Margaritis, 2002; Moreira, 2002). Pois, tanto o rendimento como as características reológicas podem mudar com a transposição de escala, podendo ser melhorados pelas modificações nas condições de cultivo (Morris, 1977).

Como a bactéria é estritamente aeróbia, o oxigênio no meio é requerido para o crescimento e produção de xantana (Sutherland, 1993). Assim, a agitação e a aeração são parâmetros necessários para evitar condições de anaerobiose decorrentes da alta viscosidade do meio pela formação do polissacarídeo (Richard & Margaritis, 2002). A combinação adequada, para os níveis destes parâmetros, deve ser estudada para evitar a limitação na transferência de oxigênio ou condições de estresse hidrodinâmico (Casas et al., 2000). Além destes parâmetros, o tempo de fermentação também é de

fundamental importância para se evidenciar o ponto com melhor equilíbrio entre produção e viscosidade.

As propriedades reológicas da xantana e sua estabilidade numa ampla faixa de pH e temperatura, mesmo na presença de sais, a tornam um excelente agente estabilizante para diferentes produtos, como alimentos, produtos farmacêuticos, produtos veterinários, petróleo entre outros (Jeanes, 1974).

Apesar da xantana comercial apresentar ótima qualidade tecnológica, espera-se com o estudo de diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni e das condições operacionais, encontrar uma cepa com qualidade superior a xantana comercial.

HIPÓTESE

A produção, viscosidade e composição química da xantana depende da cepa de *Xanthomonas campestris* pv pruni e das condições operacionais.

OBJETIVO GERAL

Caracterizar a goma xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni, e em diferentes condições operacionais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de xantana, em incubador agitador, por trinta cepas da bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni, determinando-se a produção, viscosidade e composição química dos biopolímeros obtidos;
- Estudar a melhor cepa selecionada no objetivo um, em transposição de escala para 3L, em duas combinações de velocidades de agitação e taxa de aeração, em diferentes tempos de fermentação, avaliando-se produção, viscosidade e composição química dos biopolímeros, pH, coeficiente de transferência de oxigênio (k_La) e massa celular seca do meio.

1º Artigo

**Xantana sintetizada por cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni:
produção, viscosidade e composição química****C. D. Borges¹; C. T. Vendruscolo^{2,3}**¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial²Departamento de Ciência dos Alimentos³Centro de Biotecnologia/Laboratório de Biopolímeros

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

RESUMO

A triagem de cepas tem sido muito usada como uma ferramenta para identificar cepas com alta capacidade de produção de xantana e qualidade reológica. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a xantana produzida pelas cepas: 12, 19, 25, 26, 27, 30, 38, 42, 51, 53, 55, 61, 77, 78, 81, 83, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 112, 113, 114 e 115 de *Xanthomonas campestris* pv pruni, avaliando-se a produção, viscosidade e composição química. A produção de xantana, em agitador orbital, por cada cepa, foi avaliada pelo peso do produto seco por volume de caldo fermentado (g.L^{-1}), a viscosidade aparente das soluções aquosas dos biopolímeros a 3% (m/v) foi medida em reômetro no módulo rotativo a 25°C, utilizando-se a faixa de 0,01 a 100s^{-1} como taxa de deformação e a composição química foi determinada por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). A produção de xantana foi dependente da cepa, sendo a maior produção para a cepa 83 que alcançou $9,2\text{g.L}^{-1}$ e a menor $0,0\text{g.L}^{-1}$ para a cepa 107. As soluções aquosas das xantanas produzidas por 29 cepas apresentaram comportamento pseudoplástico. A xantana sintetizada pela cepa 101 apresentou a maior viscosidade aparente e a cepa 83 produziu a xantana com a menor viscosidade. Todas as xantanas sintetizadas pelas 29 cepas, continham glicose, manose, ramnose e ácido glicurônico na composição química, diferenciando-se da xantana comercial pela presença ramnose.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris* pv pruni, produção, viscosidade, composição química.

**Xanthan synthesized for strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni:
production, viscosity and chemical composition**

C. D. Borges¹; C. T. Vendruscolo^{2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial

²Departamento de Ciência dos Alimentos

³Centro de Biotecnologia/Laboratório de Biopolímeros

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

ABSTRACT

The selection of strain has been very used as a tool to identify strain with high capacity of production of xanthan and rheological quality. The aim of this work was to characterize the xanthan produced for strains: 12, 19, 25, 26, 27, 30, 38, 42, 51, 53, 55, 61, 77, 78, 81, 83, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 112, 113, 114 and 115 of the *Xanthomonas campestris* pv pruni, evaluating the production, viscosity and chemical composition. The xanthan production, in orbital shaker, by each strain was evaluated by the weight of the dry product for volume of broth (g.L^{-1}), the apparent viscosity of the aqueous solutions of the biopolymers 3% (m/v) was measured in rheometer rotating mode at 25°C, with range shear rate from 0.01 to 100 s^{-1} and the chemical composition was determined by comparative thin layer chromatography (CCDC). The xanthan production was dependent of strain, being the higher production for strain 83, reached 9.2 g.L^{-1} and the lower 0.0 g.L^{-1} for strain 107. The aqueous solutions of the xanthans produced for 29 strain showed pseudoplastic behavior. The xanthan synthesized for strain 101 showed higher apparent viscosity and strain 83 produced the xanthan with lower viscosity. All the xanthans synthesized for the 29 strains, contained glucose, rhamnose, mannose and glucuronic acid in the chemical composition, differentiating of the commercial xanthan for the presence of rhamnose.

Key-words: *Xanthomonas campestris* pv pruni, production, viscosity, chemical composition.

1 INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos sintetizam exopolissacarídeos (EPS) que permanecem ligados à superfície celular ou são secretados para o meio extracelular na forma de muco (Sutherland, 1998).

A xantana é um polissacarídeo extracelular produzido por vários patovares de *Xanthomonas campestris* e por outras espécies de *Xanthomonas* (Sutherland, 1993). Comercialmente é sintetizada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv *campestris* cepa NRRL B-1459 (Jeanes, 1974), cujo heteropolissacarídeo é constituído, normalmente, de unidades de β -D-glicose unidas por ligação 1-4, formando a cadeia principal; as cadeias laterais contém unidades de β -D-manose- 1,4- β -D-ácido glicurônico- 1,2- α -D-manose (Slonecker & Jeanes, 1962). Entretanto algumas espécies e patovares produzem gomas com outros açúcares na sua constituição. Lowson & Symes (1977) relataram a presença de ramnose na xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *juglandis*. Souza & Vendruscolo (1999) e Moreira et al. (2001) relataram a presença deste monossacarídeo na xantana produzida pela *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. A estrutura química e a produção do exopolissacarídeo dependem das condições de cultura e em particular da cepa utilizada (Sutherland, 1983; Papagianni et al., 2001).

A triagem de cepas tem sido muito usada como uma ferramenta para identificar cepas com alta capacidade de produção de xantana e/ou elevada qualidade reológica (Antunes et al., 2003; Moreira et al., 2001). Outros critérios têm sido utilizados para a triagem de cepas como: as características morfológicas e a virulência (Galindo, 1994a).

Segundo Tessmann (2002) diversas cepas do patovar *pruni* de *Xanthomonas campestris* têm potencial para a produção do polímero xantana, entretanto, torna-se necessária a seleção das cepas que apresentam melhor relação quantidade/qualidade da goma produzida, bem como das técnicas que permitam uma triagem mais rápida.

O interesse comercial na goma xantana está no fato da mesma apresentar soluções altamente viscosas, mesmo quando aplicadas em baixas concentrações (Rocks, 1971, Galindo, 1994a, García-Ochoa et al., 2000). Tais soluções são pseudoplásticas (Rocks, 1971; Katzbauer, 1997; García-Ochoa et

al, 2000), ou seja, a viscosidade cai na medida em que a taxa de deformação é aumentada até se estabilizar e assumir um valor novamente constante. Isto é explicado pela existência de moléculas que em repouso se encontram altamente solvatadas, sendo as camadas de solvatação destruídas pela ação do cisalhamento (Navarro, 1997).

Avaliou-se a produção de xantana, em incubador agitador, por tinta cepas da bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni, determinando-se a produção, viscosidade e composição química dos biopolímeros obtidos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

2.1.1 Microrganismos

Cepas 12, 19, 25, 26, 27, 30, 38, 42, 51, 53, 55, 61, 77, 78, 81, 83, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 112, 113, 114 e 115 da bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni nunca antes testadas para a produção de biopolímero. Estas cepas são provenientes da bacterioteca da EMBRAPA - CPACT, Pelotas.

2.1.2 Meios de cultura

A) Manutenção de células em ágar SPA, contendo (g.L⁻¹): sacarose 20,0; peptona 5,0; K₂HPO₄ 0,5; MgSO₄ 7H₂O 0,25; ágar 16,0 (Hayward, 1964).

B) Produção de células em meio líquido YM contendo (g.L⁻¹): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0. (Haynes et al., 1955).

C) Meio de produção de biopolímeros MP11 contendo (g.L⁻¹): (1) NH₄H₂PO₄ 1,5; K₂HPO₄ 2,5; MgSO₄ 7H₂O 0,2; (2) sacarose 50,0 (Cadmus et al., 1978 modificado por Vendruscolo et al., 2000). O pH da solução (1) foi ajustado a 7,0 e as duas soluções foram esterilizadas separadamente a 121°C por 15 min.

2.1.3 Xantana

A xantana comercial foi utilizada para a comparação dos resultados de viscosidade e composição química.

2.2 Método

2.2.1 Delineamento experimental

O experimento foi decorrente do delineamento estatístico inteiramente casualizado entre trinta tratamentos (30 cepas) x três repetições, avaliando-se a produção, composição química e viscosidade dos biopolímeros.

2.3 Processo

2.3.1 Produção dos biopolímeros

Durante o desenvolvimento do trabalho as cepas foram repicadas a cada trinta dias em placas de Petry contendo ágar SPA, incubadas a 28°C por 48h e estocadas a 4°C.

Erlenmeyers de 125mL, contendo 7mL do meio líquido YM (Haynes et al., 1955), foram inoculados com 10^8 a 10^9 UFC.mL⁻¹. Estes foram incubados em agitador orbital (New Brunswick Scientific, modelo Innova 4230), a 150rpm, 28°C por 24h. Após o período de multiplicação celular, o cultivo foi transferido para Erlenmeyer de 250mL com 43mL de MPII (Cadmus et al., 1978 modificado por Vendruscolo et al., 2000) A produção de biopolímero foi realizada por fermentação aeróbica em batelada, em incubador agitador, nas condições: 28°C, 200rpm por 72h (Souza & Vendruscolo, 1999). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

2.3.1.1 Recuperação

O meio fermentado foi centrifugado, para remoção das células, em centrífuga (Sorvall Instruments, RC-5C) a 16.000.g e 4°C por 30min (Vendruscolo, 1995). Ao sobrenadante adicionou-se etanol 96°GL na proporção de 1:4 (v/v) para recuperação dos biopolímeros. Estes foram secos em estufa a 56°C até atingirem peso constante, após foram pesados e triturados em moído de disco (Fritsch, Pulverisette), até granulometria de 0,5µm.

2.4 Avaliação

2.4.1 Produção

A produção do biopolímero por cada cepa foi avaliada pelo peso do produto seco em relação ao volume de caldo fermentado (g.L^{-1}).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, e para a comparação das médias foi utilizado o teste Tuckey em nível de significância de 5%.

2.4.2 Viscosidade

A viscosidade aparente das soluções aquosas das xantanas sintetizadas pelas 29 cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni foi comparada com a viscosidade de amostras de xantana comercial dialisada e não dialisada. A amostra que foi dialisada permaneceu em água ultra pura por 48h (sendo a água trocada duas vezes ao dia), a 4°C em membrana (Dialysis Tub) de 12-16000MW com diâmetro seco 27mm.

As soluções aquosas das xantanas a 3% (m/v) foram agitadas por 2h, aquecidas a 60°C por 20min e permaneceram em repouso à temperatura ambiente por 24h (Zhang Xuewu et al., 1996 modificada Diaz, 2002).

A determinação da viscosidade aparente foi determinada em reômetro no módulo rotativo (HAAKE, RS150), a 25°C. Foi utilizado sistema placa-placa com sensor PP35 Ti, distanciamento de 1mm e taxa de deformação de 0,01 a 100s^{-1} ; o tempo de cada ensaio foi de 300s, obtendo-se um total de 50 pontos.

2.4.3 Composição química

Os polímeros sintetizados pelas 29 cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni e as amostras de xantana comercial dialisada e não dialisada, foram hidrolisados utilizando HCl 2N [3:100 (m/v)] a 80°C por 16h em banho-maria com temperatura controlada (Moreira et al., 1998).

A composição química dos biopolímeros foi determinada através da comparação com amostras autênticas de ramnose, manose, glicose e ácido glicurônico.

Para isto foi aplicada a técnica de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) em cromatofolhas de alumínio e sílica gel 60 F₂₅₄, (Merck).

Foram aplicados 3 μ L das amostras hidrolisadas e dos padrões, o eluente empregado foi o clorofórmio: metanol: ácido acético: água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v) (Moreira et al., 1998). Para revelação utilizou-se o reagente anizaldeído sulfúrico (Wagner et al., 1984).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção

A análise dos resultados mostrou que a produção de xantana, por *Xanthomonas campestris* pv pruni foi influenciada pela cepa. Os valores em g.L⁻¹ variaram entre 0,0 (cepa 107) e 9,2 (cepa 83) conforme Figura 1.

Apenas a produção de xantana pela cepa 83 diferiu significativamente ao nível de 5%, da produção das demais cepas estudadas (Tabela 1).

Torrestiana et al. (1990) estudando seis isolados de *Xanthomonas campestris*, encontraram valores semelhantes 0,0 a 8,0g.L⁻¹. Souza & Vendruscolo (1999) analisaram a produção de xantana pela cepa 58 de *Xanthomonas campestris* pv pruni em quatro meios de produção diferenciados, sendo que em um deles, também não houve produção de xantana.

Galindo et al. (1994b) no estudo das cepas E2 (variante espontânea da cepa NRRL-1459) e B-1459, de *Xanthomonas campestris* pv campestris, obtiveram como resultados de produção de xantana 11,2g.L⁻¹ e 9,3g.L⁻¹, respectivamente. No trabalho de Nitschke & Thomas (1995) com cepas selvagens de *Xanthomonas campestris* pv campestris, obteve-se como menor produção 10,6g.L⁻¹ para a cepa C5 e como maior produção 14,5g.L⁻¹ para a cepa Cv2C8.

Souza & Vendruscolo (1999) verificaram a produção de xantana por duas cepas (24 e 58) de *Xanthomonas campestris* pv pruni num meio de cultura similar ao utilizado neste experimento, produzindo em média 11,8g.L⁻¹ para a cepa 24, e 10,2g.L⁻¹ para a cepa 58, em 72h.

Foresti (2002) determinou a produção de xantana ($6,4\text{g.L}^{-1}$) pela cepa padrão NRRL B-1459 de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* utilizando condições de cultura idênticas a deste trabalho.

Segundo Antunes et al. (2003), em seu trabalho realizado com 13 cepas da bactéria *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, utilizando dois diferentes meios de produção (MPI e MPII), sendo o segundo meio idêntico ao utilizado neste trabalho, alcançou $4,1\text{g.L}^{-1}$ para a cepa 06 e $20,1\text{g.L}^{-1}$ para a cepa 40. Moreira et al. (2001) em estudo com 18 cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* e sob as mesmas condições de fermentação, encontrou como valor mínimo $2,3\text{g.L}^{-1}$ para a cepa 44, e máximo de $8,4\text{g.L}^{-1}$ para a cepa 73.

Os resultados de todos os estudos mostram que a produção é dependente da cepa o que também foi confirmado neste trabalho. Conclui-se, portanto, que a seleção de cepas deve ser a primeira etapa na busca de xantanas com alto rendimento e qualidade.

Dentre as 30 cepas estudadas, a produção das cepas 25, 26, 27, 30, 55, 77, 78, 83, 102, 103, 106 foi superior a produção obtida por Foresti (2002) utilizando a cepa padrão, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* NRRL B-1459, que atingiu $6,4\text{g.L}^{-1}$. Estas cepas deverão ser reavaliadas em outros meios e condições de produção na busca de melhorar o rendimento.

3.2 Viscosidade

As soluções aquosas das xantanas produzida por 29 cepas, apresentaram comportamento pseudoplástico, como mostra Figura 2.

A cepa 101 produziu a xantana com a maior viscosidade (12.700mPa.s) em 10s^{-1} , já a xantana produzida pela cepa 83 apresentou os menores valores de viscosidade (1.370mPa.s) na mesma taxa de deformação.

Muitas das xantanas pesquisadas apresentaram comportamento reológico superior à xantana comercial, entretanto, algumas mostraram-se inferiores (Tabela 2). Dentre as 30 cepas analisadas, 16 produziram xantana com viscosidade superior a xantana comercial. A xantana sintetizada pela cepa 42 apresentou comportamento semelhante a xantana comercial dialisada.

A solução aquosa da xantana sintetizada pela cepa 101 foi 90% mais viscosa que a solução aquosa da xantana sintetizada cepa 83 que apresentou

a menor viscosidade. Em relação a xantana comercial não dialisada, a viscosidade da xantana sintetizada pela cepa 101 foi 73% superior e a xantana sintetizada pela cepa 83 apresentou uma viscosidade 60% inferior à comercial não dialisada.

A viscosidade da xantana comercial quando dialisada diminuiu, provavelmente pela eliminação dos sais de potássio, que são adicionados para facilitar a solubilização da xantana e aumentar a viscosidade desta (Jeanes et al., 1961; Morris, 1996).

Nitschke & Thomas (1995) na análise de viscosidade a 25°C e na taxa de deformação $12,5s^{-1}$, relataram que as soluções aquosas a 0,5% (m/v) dos polímeros sintetizados por cepas selvagens de *Xanthomonas campestris*, variaram de 200mPa.s para a cepa Cv2C8, até 641mPa.s para a cepa C7.

Souza & Vendruscolo (1999) ao determinar a viscosidade aparente das soluções de xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepas 24 e 58 em 72h de fermentação, obtiveram para a primeira cepa, aproximadamente 5.000mPa.s, na taxa de deformação $10s^{-1}$, e para a segunda aproximadamente 300mPa.s, na mesma taxa de deformação.

Tessmann (2002) analisou a viscosidade do biopolímero produzido por 20 cepas de *X. campestris* pv pruni, os resultados variaram entre 13.800mPa.s (cepa 49) a 84.800mPa.s (cepa 17), na taxa de deformação $2,4 s^{-1}$. A cepa 101, que obteve a maior viscosidade aparente da solução aquosa neste experimento, em uma taxa de deformação baixa $2,0 s^{-1}$, obteve 49.900mPa.s.

No estudo de 13 cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni realizado por Antunes et al. (2003), utilizando o mesmo meio de produção MP11, as soluções aquosas a 3% (m/v) foram analisadas em viscosímetro Brookfield rotacional, a 25°C e a 6rpm. A viscosidade aparente média foi de 11.500mPa.s.

Foresti (2002) analisou a viscosidade aparente da solução aquosa a 3% (m/v) da xantana sintetizada pela cepa padrão NRRL B-1459 de *Xanthomonas campestris* pv campestris. Na taxa de deformação $10s^{-1}$ alcançou 2.700mPa.s.

Houve grande dificuldade em comparar os resultados obtidos neste estudo com os de outros pesquisadores, pois as condições de análise e o equipamento utilizado são diferentes, principalmente a taxa de deformação mencionada nos trabalhos.

Os resultados das soluções aquosas dos polímeros mostraram que o comportamento reológico foi dependente da cepa utilizada, confirmando o que foi demonstrado por outros autores para polímeros produzidos por outras espécies e cepas.

3.3 Composição química

A xantana comercial sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv *campestris* é composta de D-glucose, D-manose, ácido D-glicurônico, ácido pirúvico e O-acetil (Sloneker & Jeanes, 1962). Porém, outros componentes têm sido reportados em polissacarídeos sintetizados por bactérias descritas como outras espécies de *Xanthomonas* (Sutherland, 1993). Konicek et al. (1977) relataram na espécie *fuscans* a presença de galactose e ribose no polissacarídeo sintetizado por cepas mutantes. Para Lawson & Symes (1977) e Souza & Vendruscolo (1999), o patovar também tem influência na composição do polissacarídeo, relatando a presença de ramnose no polímero sintetizado pelos patovares *juglandis* e *pruni*, respectivamente, e xilose no polissacarídeo sintetizado pelo patovar *phaseoli* (Lawson & Symes, 1977).

Pelos cromatogramas (Figura 3), pode-se observar que todas as amostras continham ramnose, manose, glicose e ácido glicurônico, como esperado para o patovar *pruni* (Souza & Vendruscolo, 1999; Vendruscolo et al., 2000; Moreira et al., 2001; Tessmann, 2002; Antunes et al., 2003). Diferindo das amostras de xantana comercial (dialisada e não dialisada) pela presença de ramnose.

Foi visível a diferença na intensidade e no tamanho das manchas dos componentes nos cromatogramas. As xantanas produzidas pelas cepas 19, 25, 26, 27, 30, 55, 61, 77, 78, 83, 103, 104, 106, 109 e 115 apresentaram maior intensidade das manchas de glicose ou glicose degradada, já as cepas 81, 101, 104, 115 maior intensidade de manose e as cepas 26, 104, 106, 115 de ácido glicurônico (Tabela 3).

Não houve diferença no cromatograma das amostras de xantana comercial dialisada e não dialisada (Figura 4).

No cromatograma obtido por Souza & Vendruscolo (1999), as xantanas sintetizadas por duas cepas (24 e 58) de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*

num meio similar ao utilizado neste experimento mostrou a presença em maior quantidade de manose para ambas cepas em 72h de produção de polímeros. E em 54h de produção a cepa 24 apresentou maior concentração de glicose, sugerindo que esta foi convertida em manose.

Antunes et al. (2003) afirmaram o mesmo num estudo de caracterização de 13 cepas cultivadas em dois diferentes meios (MPII e MPI), ou seja, que os biopolímeros produzidos pelas cepas 46, no MPI e 06, em ambos os meios, resultaram em biopolímeros com maior quantidade de manose. As manchas de ácido glicurônico apresentaram-se maiores e mais intensas nos polímeros produzidos pelas cepas 15, 18, 20 e 24 em MPI e 18, 20, 24 e 31 em MPII.

Com isto podemos afirmar que a composição qualitativa das xantanas sintetizadas por *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, não foi influenciada pela cepa, porém houve diferenças na composição quantitativa, com variação entre as cepas.

3.4 Produção vs viscosidade vs composição química

A relação entre a produção e viscosidade foi inversa para algumas cepas (25, 55, 77, 78, 83, 103, 38, 108, 109, 112, 113, 114 e 115), ou seja, a cepa que apresentou alta capacidade produtiva, sintetizou xantana menos viscosa e vice-versa, o mesmo foi demonstrado por Nitschke & Rodrigues (2000) e Antunes et al.(2003).

As cepas 25, 26, 27, 30, 55, 77, 78, 83, 103, 104, 105 e 106 que apresentaram alta produção continham maiores concentrações de glicose e/ou glicose degradada e as cepas 101, 104 e 115 que sintetizaram xantanas com alta viscosidade continham maiores concentrações de manose.

A relação entre viscosidade e composição química está de acordo com Moreira et al. (2001), que demonstraram que os polímeros que aparentemente continham maiores concentrações de manose incrementaram a viscosidade a 65°C, ainda os que continham altas concentrações de glicose apresentaram efeito oposto. Para Moreira et al. (2001), não houve relação no rendimento e viscosidade.

Antunes et al. (2003) também afirmaram que os polímeros que continham maior quantidade de manose apresentaram maior potencial

espessante. A viscosidade também foi influenciada pelo ácido glicurônico, cujas manchas apresentaram-se maiores e mais intensas nos polímeros que apresentaram viscosidades elevadas, concordando com os resultados aqui obtidos.

Para Tessmann (2002) não houve correlação entre produção e viscosidade, ou seja, a viscosidade obtida foi dependente da cepa e independente da quantidade produzida. O mesmo ocorreu para a composição química.

4 CONCLUSÃO

Todas as cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* produziram xantana, com exceção da cepa 107. A produção, viscosidade e composição química quantitativa foi cepa dependente.

A produção não obteve o rendimento preconizado na literatura para ser exequível a nível industrial, porém, a viscosidade das soluções aquosas das xantanas sintetizadas por dezesseis cepas foi maior que à xantana comercial, apresentando viscosidade até 4 vezes superior, compensando a baixa produção.

As xantanas sintetizadas por todas as cepas apresentaram a composição química esperada para o patovar *pruni*, diferindo da xantana comercial pela presença de ramnose.

As cepas 101, 104 e 106 possuem melhor equilíbrio entre produção e viscosidade, preenchendo requisitos para serem exploradas em transposição de escala, para predição em uso industrial.

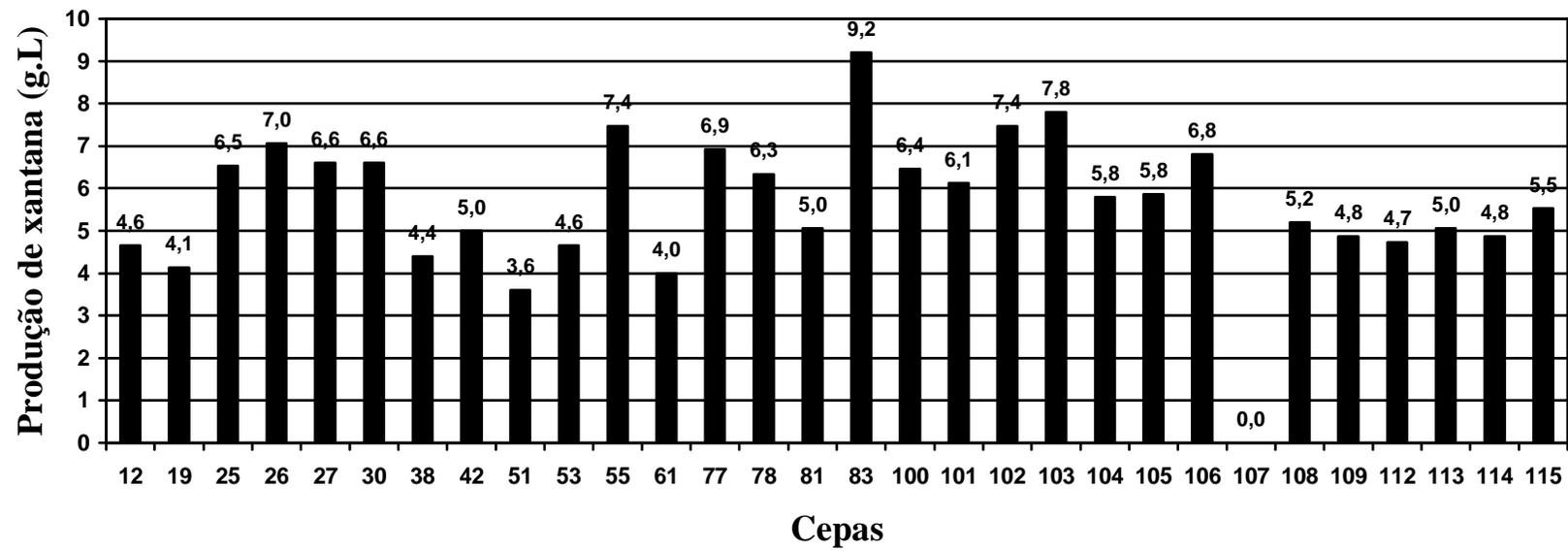


FIGURA 1: Produção de xantana (g.L⁻¹) por cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni.

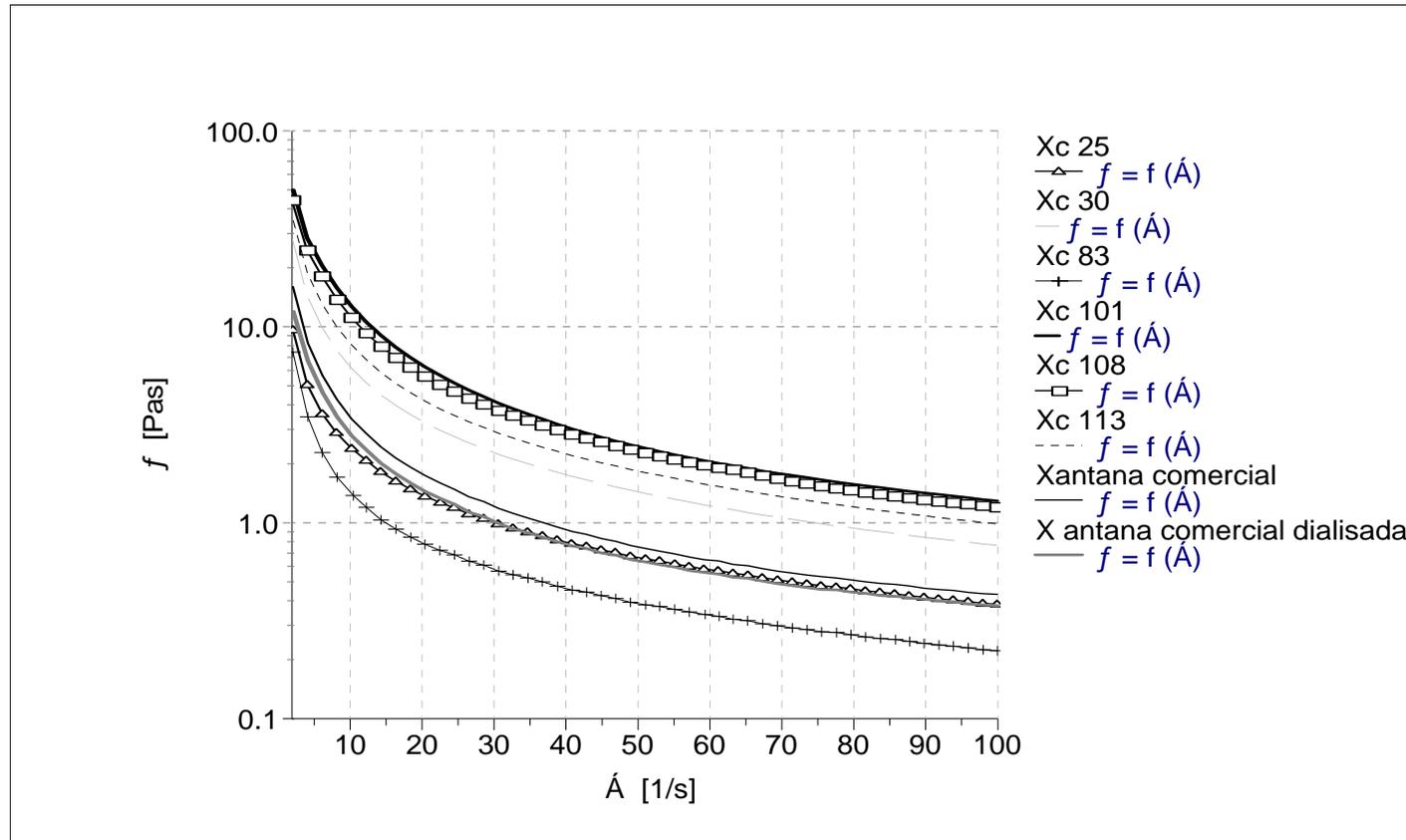


FIGURA 2: Viscosidade aparente vs taxa de deformação, a 25°C das soluções aquosas a 3% (m/v) de xantana comercial e das xantanas sintetizadas pelas cepas 25, 30, 83, 101, 108, 113 de *Xanthomonas campestris* pv pruni.

TABELA 2: Viscosidade aparente (mPa.s) a 25°C da solução aquosa a 3% (m/v) das xantanas sintetizadas por 29 cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni e de xantana comercial dialisada e não dialisada

Cepa	Viscosidade aparente (mPa.s)			
	Taxa de deformação			
	10s ⁻¹	30s ⁻¹	60s ⁻¹	100s ⁻¹
101	12.700	4.080	2.080	1.290
104	12.100	3.900	2.050	1.240
108	11.200	3.750	1.970	1.200
115	10.300	3.500	1.870	1.170
106	9.930	3.270	1.750	1.090
109	9.600	3.230	1.770	1.110
26	8.930	2.980	1.620	1.010
113	8.100	2.860	1.570	0.990
105	7.920	2.700	1.480	0.930
112	7.830	2.770	1.490	0.940
38	7.660	2.560	1.410	0.890
27	7.600	2.550	1.340	0.840
114	7.270	2.720	1.520	0.950
102	7.210	2.570	1.440	0.910
100	7.010	2.530	1.400	0.870
30	6.120	2.210	1.210	0.770
103	2.590	1.090	0.650	0.430
42	2.530	0.950	0.550	0.360
78	2.390	0.860	0.490	0.330
19	2.350	0.880	0.530	0.360
53	2.270	0.850	0.500	0.340
25	2.390	0.990	0.580	0.380
55	2.220	0.920	0.540	0.360
12	2.150	0.840	0.500	0.350
51	2.050	0.840	0.490	0.320
81	2.040	0.820	0.490	0.340
61	2.110	0.790	0.460	0.320
77	1.810	0.730	0.440	0.300
83	1.370	0.570	0.340	0.220
X*	3.400	1.190	0.650	0.430
XD**	2.770	0.990	0.560	0.380

*Xantana comercial não dialisada

**Xantana comercial dialisada

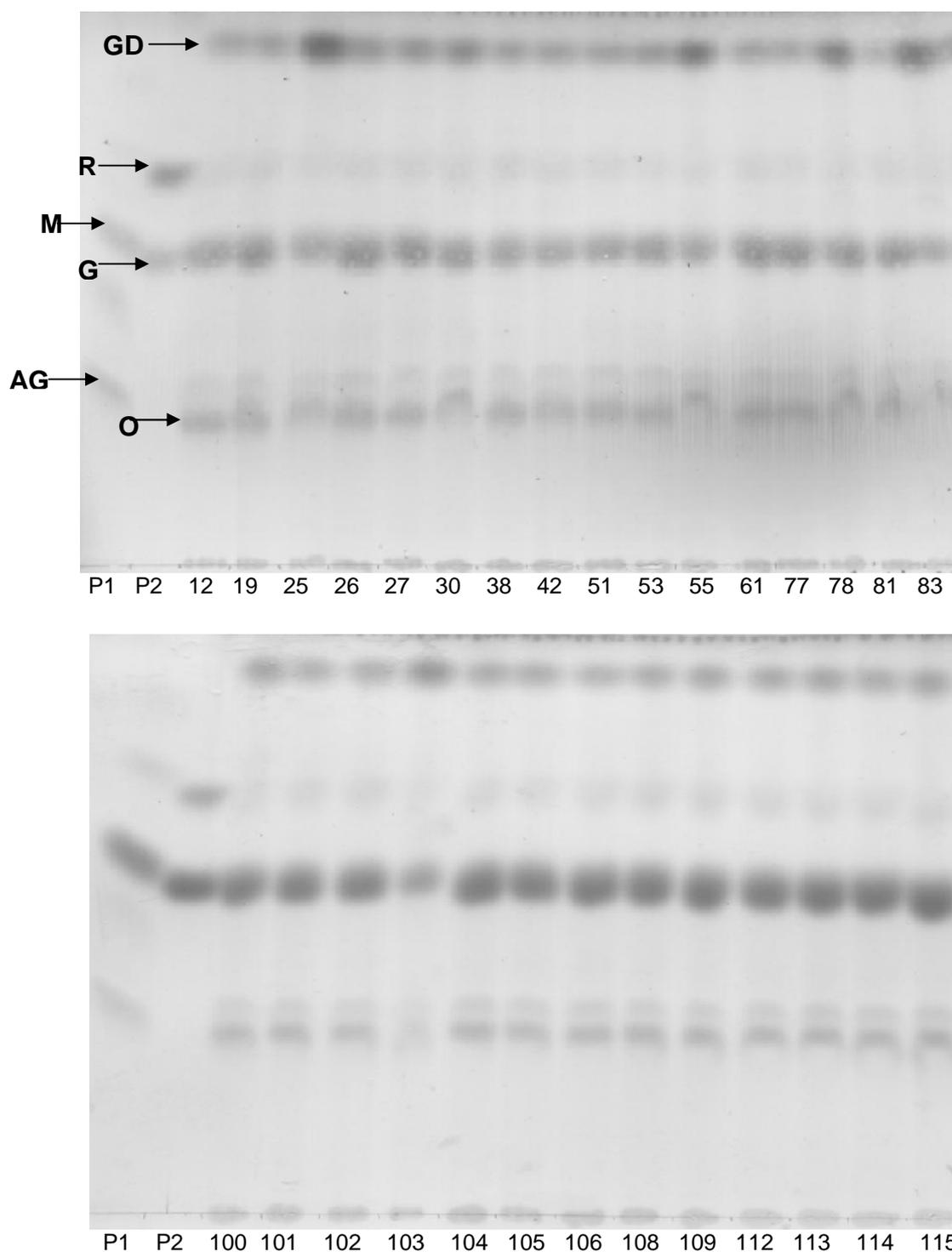


FIGURA 3: Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) de xantana produzida por 29 cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. (P1) padrões de ácido glicurônico (AG) e manose (M); (P2) padrões de glicose (G) e ramnose (R), no sistema clorofórmio: metanol: ácido acético: água, 40:40:10:10 (v/v/v/v) e gel de sílica 60, revelador anisalaldeído sulfúrico. Compostos de degradação: (GD) glicose degradada e (O) oligossacarídeos.

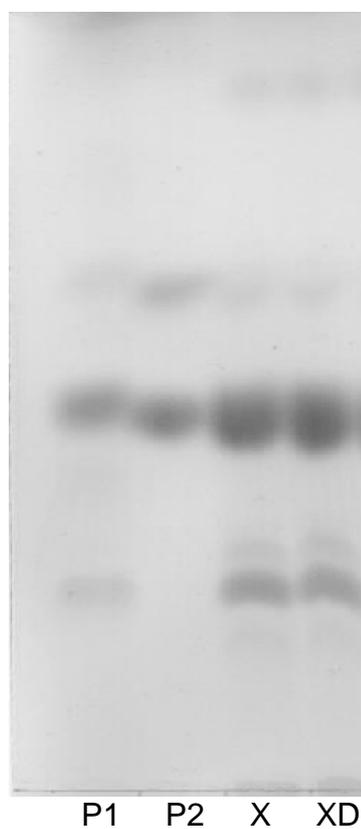


FIGURA 4: Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) da xantana comercial (X) e da xantana comercial dialisada(XD). (P1) padrões de ácido glicurônico (AG) e manose (M); (P2) padrões de glicose (G) e ramnose (R), no sistema clorofórmio: metanol: ácido acético: água, 40:40:10:10 (v/v/v/v) e gel de sílica 60, revelador anisaldeído sulfúrico. Compostos de degradação: (GD) glicose degradada e (O) oligossacarídeos.

TABELA 3: Composição química das xantanas sintetizadas por 29 cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*

Cepa	Oligossacarídeo	Glicose	Glicose Degradada	Manose	Ramnose	Ác. Glicurônico
12	++	+	++	+	.	+
19	++	+++	+	++	+++	++
25	+	.	+++	.	+	+
26	++	+++	++	++	+	+++
27	++	+++	++	++	+	++
30	++	+++	++	++	+	++
38	++	+	+	+	++	++
42	+	+	+	+	++	+
51	++	++	+	++	++	+
53	++	++	++	++	+	+
55	+	+	+++	.	+	.
61	++	+++	+	++	++	+
77	++	+++	+	++	+	.
78	+	++	+++	++	+	++
81	+	++	.	+++	+	+
83	.	.	+++	+	.	.
100	++	+	++	+	+	++
101	++	+	+	+++	++	++
102	++	++	+	+	++	+
103	.	.	+++	.	.	.
104	++	+++	+	+++	++	+++
105	++	+	+	++	++	++
106	++	+++	+	++	++	+++
108	++	++	+	++	+++	++
109	++	+++	++	+	++	++
112	++	++	++	+	++	++
113	++	++	++	+	++	++
114	++	++	+	++	+++	++
115	++	++	++	+++	+++	+++

. traços

+ quantidade mínima

++ quantidade intermediária

+++ quantidade máxima

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p. 317-322, 2003.
- 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.
- DIAZ, P. S. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. Pelotas, 2002. 65f Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2002.
- FORESTI, A. P. **Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* em meios modificados**. Pelotas, 2003. 61f Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2003.
- GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. **Trans IChemE**, v.72, Part. C, p.227-237, 1994a.
- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMÍREZ, M. A. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. **Microbiol Biotechnol**, v. 40, p. 634-637, 1994b.
- 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.
- HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J.; HESSELTINE, C. W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. **Applied Microbiology**, p.361-368, 1955.
- HAYWARD, A. C. Bacteriophage sensitivity and biochemical group in *Xanthomonas malvacearum*. **Journal of General Microbiology**, p.287-298, 1964.
- JEANES, A.; PITTSLEY, J. E.; SENTI, F. R. Polysaccharide B-149: a new hydrocolloid polyelectrolyte produced from glucose by bacterial fermentation. **Journal Applied Polymer**, v.5, p. 519-526, 1961.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides - New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v.28, n.5, p.34-40, 1974.

- KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 81-84, 1998.
- KONICEK, J.; LASÍK, J.; WURST, M. Production and characteristics of the exocellular polysaccharide in mutant strains of *Xanthomonas fuscans*. **Folia Microbiol**, v. 22, p. 12-18, 1977.
- LOWSON, C. J.; SYMES, K. C. Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum. **Carbohydrates Research**, v.58, p. 433-438, 1977.
- MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação de composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4 , n.3 , p. 222-224, 1998.
- MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474, 2001.
- MORRIS, E. R. Rheology of xanthan: suspension of particles and stabilization of emulsions. **Food & Ingredients Journal of Japan**, v. 167, p. 31-36, 1996.
- NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: EDUCS, 1997. 256p.
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V. Effect of virulence and serial transfers of *Xanthomonas campestris* on xanthan gum production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.58-60, 2000.
- NITSCHKE, M.; THOMAS, R. W. S. P. Xanthan gum production by wild-type isolates of *Xanthomonas campestris*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, p. 502-504, 1995.
- 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.
- ROCKS, J. K. Xanthan gum. **Food Technology**, v.25, p.476-483, 1971.
- SLONEKER, J. H.; JEANES, A. Exocellular bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459. **Canadian Journal of Chemistry**. vol. 40, p. 2066-2071, 1962.
- SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, v.8, n.2, p. 115-123, 1999.

- SUTHERLAND, I. W. Extracellular polysaccharide. In: DELLWEY, H. **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemie, v.3, 1983. p. 553-574.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**, v. 16, p.41-46, 1998.
- SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 363-388.
- TESSMANN, C. **Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv pruni pela técnica de RAPD e relação com a planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química da xantana**. Pelotas, 2002. 33f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2002.
- TORRESTIANA, B.; FUCIKOVSKY, L.; GALINDO, E. Xanthan production by some *Xanthomonas* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, n. 10, p. 81-83, 1990.
- VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv pruni C24. In: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, 2000. p. 187-191.
- VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp. isolada do solo cultivado com cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto**. Campinas, 1995. 140f Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1995.
- WAGNER, H.; BIADT, S.; ZGAINSKI, G. M. **Plant Drug Analysis**. New York: Springer-Verlag, 1984.
- ZHANG XUEWU; LUI XIN; GU DEXIANG; ZHOU WEI; XIE TONG; MO YONGHONG. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v.27, p. 203-209, 1996.

2º Artigo

**Influência da agitação e aeração na produção de xantana por
Xanthomonas campestris pv pruni cepa 101**

C. D. Borges¹; A. S. Moreira²; C. T. Vendruscolo²; M. A. Z. Ayub³

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

²Centro de Biotecnologia/Laboratório de Biopolímeros e DCA - UFPel

³Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Bioteclab - UFRGS
Universidade Federal de Pelotas, CP 354; CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil

RESUMO

Avaliou-se a produção, viscosidade e composição química da xantana sintetizada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 em fermentador (3L). Durante o processo, a queda do pH e a produção de massa celular seca foram monitorados e o coeficiente de transferência de oxigênio foi determinado. Os cultivos foram realizados em fermentador nas condições (A) 300rpm, 3vvm e (B) 200rpm, 2vvm; a 28°C. Amostras foram coletadas em 0, 6, 12, 24, 48, 54, 66 e 72h. A produção de xantana foi avaliada em gramas do polímero seco por litro de caldo fermentado. A determinação da viscosidade aparente das soluções aquosas dos polímeros produzidos foi medida em reômetro no módulo rotativo, a 25 e 65°C. Foi utilizado sistema do tipo placa-placa, sensor PP35 Ti e taxa de deformação 0,01 a 100s⁻¹. A composição química foi determinada por cromatografia em camada delgada comparativa. Houve diferença significativa na produção de xantana entre os tratamentos, em 54 e 66h. A produção na condição de maior agitação/aeração (A) foi superior, exceto em 48h, chegando a 8,15g.L⁻¹ em 66h. Os resultados de massa celular seca foram similares nos dois tratamentos, diferindo significativamente apenas em 66h. Não houve diferença significativa na queda do pH em ambas condições (A e B), com pH inicial 6,9 e final 4,6 em 72h. Todas as soluções aquosas das xantanas sintetizadas sob as condições A e B, nos diferentes tempos, apresentaram comportamento pseudoplástico. A viscosidade aparente das soluções de xantana, a 25 e 65°C, sintetizadas na condição A, foi superior em todos os tempos de fermentação, alcançando seu máximo em 54h. Já na condição B, a viscosidade aparente máxima ocorreu em 66h. Na condição A, o k_{La} foi superior ao da condição B, com valores de 21,4h⁻¹ e 8,6h⁻¹,

respectivamente, demonstrando que a maior concentração de oxigênio dissolvido na condição A favoreceu a produção de xantana e a viscosidade aparente. Todas as amostras continham glicose, manose, ramnose e ácido glicurônico. Até 54h, não houve diferença no perfil cromatográfico das amostras, entre os tratamentos; a partir de 66h o conteúdo de manose diminuiu, em ambos tratamentos e houve incremento na quantidade de glicose na condição B.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 101, agitação/aeração, tempo de fermentação.

**Influence of the agitation and aeration in the production of xanthan for
Xanthomonas campestris pv *pruni* strain 101**

C. D. Borges¹; A. S. Moreira²; C. T. Vendruscolo²; M. A. Z. Ayub³

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

²Centro de Biotecnologia/Laboratório de Biopolímeros e DCA - UFPel

³Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos/Bioteclab - UFRGS

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

ABSTRACT

Was evaluated the production, viscosity and chemical composition of the xanthan synthesized for the *Xanthomonas campestris* pv *pruni* strain 101 bacterium in fermentor (3L). During the process, the decrease of pH and the production of cellular mass dry were monitored and the oxygen transference coefficient was determined. The cultivate were carried out in fermentor in the conditions (A) 300rpm, 3vvm and (B) 200rpm, 2vvm; at 28°C. Samples were collected at 0, 6, 12, 24, 48, 54, 66 and 72h. The xanthan production was evaluated in grams of dry polymer for liter of fermentation broth. The determination of apparent viscosity of aqueous solutions of produced polymers was measured in rheometer rotating mode, at 25 and 65°C. Was used plate-plate system, sensor PP35Ti and shear rate of 0.01-100s⁻¹. The chemical composition was determined by comparative thin layer chromatography. It had significant difference in the production of xanthan between the treatments, at 54 and 66h. The production in the condition of higher agitation/aeration (A) was higher, except at 48h, reaching 8.15g.L⁻¹ at 66h. The results of cellular mass dry were similar in the two treatments, differing significantly only at 66h. Did not have significant difference in decrease of pH in both conditions (A and B), with pH initial 6.9 and end 4.6 in 72h. All the aqueous solutions of the xanthans synthesized under the conditions A and B, in the different times, showed pseudoplastic behavior. The apparent viscosity of the xanthan solutions, at 25 and 65°C, synthesized in the condition A, was higher in all the fermentation times, reaching their peak at 54h. Already in the condition B, maximum apparent viscosity occurred at 66h. In condition A, k_La was higher to the of condition B, with values of 21.4h⁻¹ and 8.6h⁻¹, respectively, demonstrating that the higher concentration of oxygen dissolved in the condition A favored the

production of xanthan and apparent viscosity. All the samples contained glucose, mannose, rhamnose and glucuronic acid. Until 54h, did not have difference in the chromatographic profile of the samples, between the treatments; from 66h the content of mannose decreased, in both treatments and incremented the amount of glucose in condition B.

Key-words: *Xanthomonas campestris* strain 101, agitation/aeration, fermentation time.

1 INTRODUÇÃO

Xanthomonas campestris é um microrganismo muito estudado em função dos problemas que causa na agricultura, por ser fitopatogênico. Na indústria sua relevância se deve à capacidade de sintetizar um polissacarídeo chamado xantana, usado para modificar as propriedades físico-químicas dos produtos através do espessamento e estabilização de suspensões, sistemas aerados e emulsões (Konicek et al., 1993).

A produção de xantana é um processo estritamente aeróbio, que pode ser realizado em meio semi-sólido ou líquido. Quando conduzida em meio líquido, ocorre aumento da viscosidade do meio pela produção extracelular do polímero durante a fermentação. A transferência de oxigênio é dependente da viscosidade do meio e é variável durante o processo, sendo influenciada pelo fluxo de ar e pela velocidade de agitação (García-Ochoa et al., 2000b). Deste modo, devido a importância da aeração em culturas de microrganismos, a determinação do coeficiente de transferência de oxigênio é comumente usado (Ayub, 2001).

É necessário o domínio dos parâmetros de fermentação para otimizar a produção do biopolímero (Richard e Margaritis, 2002). O crescimento do microrganismo, produção, estrutura e a qualidade reológica da xantana são influenciados por fatores como a cepa, projeto do bioreator, modo de operação (batelada ou contínuo), composição do meio, condições de cultivo (temperatura, pH, concentração do oxigênio dissolvido, velocidade de agitação, taxa de aeração) e pelo tempo de fermentação (García-Ochoa et al., 2000a; Galindo et al., 1994; Torres et al., 1993; Moreira, 2002; Antunes et al., 2003).

Segundo Moreira (2002) a aeração/agitação e o tempo de fermentação influenciaram no rendimento, qualidade e composição química da xantana produzida pela cepa 06 de *Xanthomonas campestris* pv pruni. A interação verificada entre o tempo e as condições de cultivo reforçam a necessidade deste tipo de estudo, a fim de determinar-se os parâmetros ideais de cultivo para cada cepa.

Estudou-se a influência da taxa de aeração e velocidade de agitação sobre a produção, viscosidade, composição química da xantana sintetizada pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 avaliando-se o pH,

coeficiente de transferência de oxigênio (k_La) e massa celular seca do meio em diferentes tempos de fermentação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Microrganismo

Xanthomonas campestris pv *pruni* cepa 101 foi a bactéria utilizada neste estudo. Esta cepa foi selecionada em função dos resultados de produção e viscosidade, proveniente de um estudo de triagem entre 30 cepas, realizada no Laboratório de Biopolímeros da Universidade Federal de Pelotas. Estoques da cepa bacteriana foram mantidos por liofilização.

2.1.2 Xantana

A xantana comercial foi utilizada para a comparação dos resultados de viscosidade e composição química.

2.2 Método

2.2.1 Delineamento experimental

O experimento foi decorrente do delineamento estatístico inteiramente casualizado entre dois tratamentos (duas combinações de velocidade de agitação e taxa de aeração) x três repetições, avaliando-se a produção, composição química e viscosidade dos biopolímeros e o pH, coeficiente de transferência de oxigênio (k_La) e massa celular seca do meio.

2.3 Processo

2.4 Produção de xantana

A fermentação dos açúcares pela bactéria *Xanthomonas campestris* foi realizada em cultivo submerso. Erlenmeyers de 250mL, contendo 50mL do meio líquido YM (Haynes et al., 1955), foram inoculados com 10^9 UFC.mL⁻¹. Estes foram incubados em agitador orbital (Nova Técnica, NT 711) a 150rpm, 30°C por 24h. Um total de 300mL deste cultivo foi transferido para fermentador

(B. Braun, Biostat B) contendo 2700mL do meio de produção (Cadmus et al., 1978 modificado por Vendruscolo et al., 2000) e 0,5mL de antiespumante. O processo foi conduzido a 28°C, com controle do oxigênio dissolvido com uso de sonda de oxigênio (Mettler Toledo, PN52200102) e pH livre monitorado através de eletrodo (Mettler Toledo, 405 DPAS-SC-K8S/325). Foram testadas duas combinações de velocidade de agitação e taxa de aeração: (A) 300rpm, 3vvm e (B) 200rpm, 2vvm.

Amostras foram coletas nos pontos 0, 6, 12, 24, 48, 54, 66 e 72h, centrifugadas em centrifuga refrigerada (Hiyechi, CR-21E) a 23.000xg, durante 30 minutos a 4°C, para remoção das células. Adicionou-se etanol 96°GL aos sobrenadantes na proporção de 4:1 (v/v) para precipitação dos polímeros. Estes foram recolhidos, secos em estufa a 56°C até atingir peso constante e, após, moídos em moinho de disco (Fritsch, Pulverisette) até atingir a granulometria de 0,5 µm.

2.5 Avaliação

2.5.1 Produção de xantana e massa celular seca

A produção de xantana foi avaliada em gramas do polímero seco por litro de caldo fermentado.

A concentração de massa celular seca foi determinada a partir de 20mL de cada amostra, por centrifugação a 15200xg por 10min. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi ressuspensa em solução salina 0,89%, centrifugada novamente e seca a 56°C até peso constante, sendo avaliada em gramas de células secas por litro de caldo fermentado.

Os resultados foram submetidos a análise de variância, e para a comparação das médias foi aplicado o teste Tuckey a um nível de significância de 5%.

2.5.2 Coeficiente de transferência de oxigênio ($k_L a$)

Ao estabilizar a concentração de oxigênio dissolvido, a aeração e agitação foram interrompidas e a variação na concentração de oxigênio a cada 5s foi mensurada pela sonda de oxigênio (Mettler Toledo, PN52200102). Após 60s a aeração e agitação foram acionadas e, novamente, a concentração de

oxigênio a cada 5s foi medida. Deste modo o coeficiente de transferência de massa de oxigênio foi obtido pela equação:

$$k_{LA} = \frac{\ln\left(\frac{C_i - C_0}{C_i - C}\right)}{t - t_0}$$

Onde k_{LA} (coeficiente de transferência de oxigênio) é dado em h^{-1} ; C , C_i , C_0 (concentração de oxigênio no meio) dado em $mgO_2.L^{-1}$ e t , t_0 (tempo de espera) dado em segundos.

2.5.3 Viscosidade

Para as determinações dos comportamentos reológicos, foram preparadas soluções de xantana a 3% (m/v) em água destilada, agitadas por 2h, aquecidas a 60°C por 20min e mantidas em repouso a temperatura ambiente por 24h (Zhang Xuewu et al., 1996 modificada por Diaz, 2002).

A determinação da viscosidade aparente das soluções foi mensurada em reômetro no módulo rotativo (HAAKE, RS150), a 25 e 65°C. Foi utilizado sistema placa - placa e sensor PP35Ti com distanciamento de 1mm, taxa de deformação de 0,01 a 100s⁻¹, tempo de cada ensaio de 300s, obtendo um total de 50 pontos.

2.5.4 Composição química

Os polímeros foram hidrolisados utilizando HCl 2N [3:100 (m/v)] a 80°C por 16h em banho-maria com temperatura controlada (Moreira et al., 1998).

Foi utilizada a técnica da Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Aplicou-se 3μL das amostras hidrolisadas e dos padrões, o eluente empregado foi o clorofórmio: metanol: ácido acético: água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v) (Moreira et al., 1998).

A composição química dos biopolímeros foi determinada através da comparação com amostras autênticas de ramnose, manose, glicose e ácido

glicurônico. Para revelação utilizou-se o reagente anizaldeído sulfúrico (Wagner et al., 1984).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção

A produção de xantana, para ser exequível em escala industrial, deve atingir concentrações de 10 a 30g.L⁻¹ (García-Ochoa et al., 2000a). Sabe-se que tanto a produção quanto a qualidade reológica do polímero dependem da cepa utilizada, como também do meio de cultivo e dos parâmetros utilizados na fermentação (García-Ochoa et al., 2000a). Nas condições utilizadas neste estudo, o rendimento pode ser considerado ainda insuficiente, pois a maior produção foi de 8,15g.L⁻¹.

A produção de xantana por *Xanthomonas campestris* pv pruni 101 foi influenciada pela velocidade de agitação/taxa de aeração e pelo tempo de fermentação (Figura 1), com acréscimo em um dado intervalo de tempo e posterior decréscimo, em ambas condições (A e B). Houve diferença significativa ao nível de 5%, na produção de xantana entre os tratamentos, em 54 e 66h (Tabela 1). A produção na condição de maior agitação/aeração (A) foi superior, exceto em 48h onde obteve-se a maior produção para a condição de menor agitação/aeração (B) alcançando 7,15g.L⁻¹. Na condição A, a maior produção ocorreu em 66h, chegando a 8,15g.L⁻¹. Quando analisada apenas a produção em todos os tempo de fermentação na condição A, não houve diferença significativa entre os tempos de 48 e 72h, assim como entre 54 e 66h. Já na condição B, não houve diferença entre os tempos 48, 54 e 66h (Tabela 1).

Moreira (2002) obteve comportamento semelhante para a cepa 06 da mesma bactéria, utilizando duas combinações de velocidade de agitação e taxa de aeração (condição A: 250rpm, 1,5vvm e condição B: 350rpm, 2vvm). Em seu trabalho não houve diferença significativa na produção nas primeiras 24h, a condição com menor agitação/aeração (A) alcançou 5,5g.L⁻¹ em 48h e a condição com maior agitação/aeração (B) chegou a 6,5g.L⁻¹ em 66h. Em 72h houve rendimento inferior para os dois tratamentos.

Os resultados de massa celular seca foram similares nos dois tratamentos (Figura 1), diferindo significativamente apenas em 66h (Tabela 1). No entanto, na condição A, os resultados foram ligeiramente superiores. Em geral, a literatura expõe que, para a maioria das bactérias produtoras de biopolímero, a produção máxima está relacionada com o final da fase exponencial (Tait et al., 1986; Papagianni et al., 2001). No entanto, para a cepa 101, a produção máxima de xantana ocorreu durante a fase estacionária, para os dois tratamentos, estando de acordo com os resultados encontrados por Konicek et al. (1993), Amanullah et al. (1996) e García-Ochoa et al. (2000a). Para García-Ochoa et al. (2000a) este comportamento é decorrente do pH não controlado. Já no estudo de Moreira (2002) a fase log em ambos tratamentos (condição A: 250rpm, 1,5vvm e condição B: 350rpm, 2vvm) terminou em 42h de fermentação, a fase estacionária não foi detectada e a produção continuou na fase de declínio. Nesse trabalho os autores utilizaram a técnica de determinação da fase de crescimento através do número de UFC.mL⁻¹.

Não houve diferença significativa na queda do pH entre as condições A e B, conforme Tabela 1. Partindo-se do pH 6,9, em 0h, caiu a 4,8, em 48h e manteve-se praticamente inalterado até 72h, onde alcançou pH de 4,6 (Figura 1). Igualmente, Moreira (2002) também observou que apenas o tempo de fermentação provocou diferenças nos resultados de pH; em seu trabalho também não foi verificada diferença significativa nos valores de pH entre os tratamentos utilizados e o término da fermentação também ocorreu com pH 4,5.

Casas et al. (2000) analisaram diferentes velocidades de agitação (100, 300, 500 e 800rpm) com fluxo de ar de 1 L/L/min num volume de 1,5L e Papagianni et al. (2001) testaram diferentes condições de agitação (100, 200, 300, 400, 600 e 800rpm) utilizando 1vvm em 1L de meio. Ambos concluíram que a produção de xantana está em parte associada ao crescimento metabólico e até 600rpm ocorreu o aumento da produção de xantana e da concentração de biomassa, porém a 800rpm houve decréscimo da produção de xantana e biomassa, causada provavelmente pelo dano provocado às células. Peters et al. (1989) também analisaram a influencia da velocidade de agitação (200, 400, 600 e 800rpm) em uma taxa de aeração mais baixa 0,33vvm em 10L de meio. Neste caso, a produção e o crescimento celular de

xantana aumentaram com o incremento da velocidade de agitação, pois como utilizaram uma taxa de aeração inferior, o aumento da velocidade de agitação foi mais relevante do que os possíveis danos causados as células.

Em geral, o efeito da agitação na transferência de oxigênio é mais significativo que o da aeração, pois a agitação diminui a viscosidade do meio, influenciando na transferência de oxigênio - k_La (Richard e Margaritis, 2002). Sendo assim, o efeito da aeração tem sido pouco estudado na produção de xantana. Roukas e Mantzouridou (2001) estudaram o efeito da aeração (1vvm a 3vvm) na produção de pululana, biopolímero produzido por *Aureobasidium pullulans*. A concentração máxima de pululana ocorreu em 2vvm e os autores atribuíram que o decréscimo na concentração de pululana em altas taxas de aeração pode ter modificado a morfologia do microrganismo durante a fermentação.

O processo de produção de xantana é estritamente aeróbio, portanto é necessário agitação para que haja no meio, altamente viscoso, suprimento de oxigênio e transporte de nutrientes evitando condições de anaerobiose. Porém, altas taxas de agitação/aeração irão causar dano às células pelo estresse hidrodinâmico, diminuindo com isto o crescimento celular e a formação de xantana.

Conforme Guo-Qing Li et al. (1995) o aumento da velocidade de agitação e/ou aumento do suprimento de oxigênio diminui a viscosidade do meio, aumentando o coeficiente de transferência de oxigênio (k_La). Este efeito foi observado neste experimento: na condição A o k_La foi superior ao da condição B, $21,4h^{-1}$ e $8,6h^{-1}$, respectivamente. Com isto, concordamos com García-Ochoa et al. (2000b) que mencionam que o aumento da concentração de oxigênio dissolvido favorece a produção de xantana. No presente trabalho os maiores resultados de produção de xantana e viscosidade aparente foram obtidos na condição de maior velocidade de agitação e taxa de aeração.

3.2 Viscosidade

As soluções aquosas de xantana caracterizam-se por apresentarem comportamento pseudoplástico, que se mantém em diferentes concentrações do polímero e diferentes temperaturas (Rocks, 1971).

Os resultados de viscosidade a 25 e 65°C, apresentados nas Figuras 2 e 3, mostram que todas as soluções aquosas a 3% (m/v) das xantanas obtidas sob as combinações de agitação/aeração testadas (A e B) em diferentes tempos de fermentação, apresentaram comportamento pseudoplástico. A viscosidade aparente das soluções foi influenciada pelo tempo de fermentação, pela agitação/aeração e pela temperatura de análise (Tabela 2). A xantana produzida na condição A, medida em 25°C e 65°C, foi mais viscosa em todos os tempos de fermentação. De 24h até 54h a viscosidade foi crescente, alcançando 7.100mPa.s em 25°C e 4.700mPa.s em 65°C, ambos na taxa de deformação $10s^{-1}$; após este período houve decréscimo na viscosidade. Na condição B, em 25 e 65°C, a viscosidade foi crescente até 48h, mantendo-se estável até 66h, atingindo 5.400mPa.s em 25°C e 3.370mPa.s em 65°C, na mesma taxa de deformação. Em 72h ocorreu queda nos valores de viscosidade.

Para Moreira (2002) no estudo da cepa 06, o oposto ocorreu, ou seja, as viscosidades superiores foram atingidas na condição de menor agitação/aeração, em todos os tempos de fermentação. Esta diferença no comportamento parece ser decorrente da cepa utilizada. A dependência da cepa também é clara na relação de viscosidade e tempo de fermentação, como mostraram Souza & Vendruscolo (1999) no estudo da cepa 24 de *Xanthomonas campestris* pv pruni, onde a xantana sintetizada em 72h de fermentação foi a mais viscosa.

Ao compararmos a viscosidade aparente da solução aquosa a 3% (m/v) da xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv pruni 101 em 54h, na condição A (7.100mPa.s), com a solução aquosa a 3% (m/v) de uma xantana comercial (3.400mPa.s), ambas a 25°C em $10s^{-1}$, concluímos que o polímero sintetizado pela cepa 101 é de melhor qualidade, apesar de sua produção ainda não ter atingido a quantidade ideal para produção industrial. Porém, a 65°C, apesar do polímero sintetizado pela cepa 101 (4.710mPa.s) ainda ser mais viscoso que o comercial (3.310mPa.s), não apresentou a mesma estabilidade à temperatura como é esperado para o polímero xantana.

Segundo Rocks (1971) para todos os fluídos pseudoplásticos, a viscosidade decresce com o aumento da temperatura, como ocorreu com a solução aquosa da xantana sintetizada pela *X. campestris* pv pruni 101. Isto se

deve pelo aumento na energia de ativação do fluxo viscoso, pela diminuição dos pontos de contato intermoleculares e pelo aumento no grau de liberdade de movimento das moléculas e/ou partículas durante o escoamento (Navarro, 1997). Porém há algumas exceções, como exemplo a xantana comercial que é tradicionalmente vendida adicionada de íons, por facilitar a solubilização, aumentar a viscosidade e também por manter a sua estrutura ordenada (dupla hélice) e, dessa maneira mantém estável sua viscosidade até cerca de 100°C. Outro exemplo é a xantana sintetizada por *X. campestris* pv *pruni* cepas 06, 41, 66, 72 (entre outras), cuja viscosidade da solução aquosa aumentou com o incremento da temperatura (Moreira et al., 2001). Este comportamento é indicativo da passagem de uma conformação ordenada, como a hélice, para a conformação desordenada do tipo enrolamento ao acaso (random coil), com subsequente aumento no volume hidrodinâmico efetivo e assim da viscosidade (Morris, 1984).

3.3 Composição química

Papagianni et al. (2001) relataram que a estrutura básica da grande maioria dos exopolissacarídeos não muda com as diferentes condições de crescimento, mas o conteúdo dos grupos ligados pode variar.

Todas as amostras decorrentes dos tratamentos A e B continham ácido glicurônico, ramnose, glicose e manose, como mostra a Figura 4. Até 54h não houve diferença na intensidade das manchas entre os tratamentos, a partir de 66h o conteúdo de manose diminuiu, para ambos. No tratamento A, o conteúdo de manose, em 54h, pode ter sido o responsável pelo incremento da viscosidade, pois em 66h e 72h houve decréscimo deste monossacarídeo. Já no tratamento B, o conteúdo de manose foi constante até 54h, fato observado também nos resultados de viscosidade; entretanto, a partir de 66h houve incremento na quantidade de glicose em relação a manose, podendo ser este o responsável pela queda de viscosidade observada após este período.

O conteúdo de ramnose foi crescente até 66h, quando alcançou seu máximo, nas duas condições de tratamento.

Moreira (2002) também determinou a composição química por CCDC da xantana sintetizada pela *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 06 sob

diferentes condições de agitação/aeração (condição A: 250rpm, 1,5vvm e condição B: 350rpm, 2vvm). Os polímeros apresentaram a composição esperada para o patovar pruni, (ácido glicurônico, ramnose, glicose e manose), porém o produzido sob a condição de menor agitação/aeração apresentou maior quantidade de manose, sendo os mais viscosos.

Assim concordamos com Sutherland (1983) que relatam que a estrutura química dos exopolissacarídeos depende das condições de cultura e principalmente da cepa utilizada.

4 CONCLUSÃO

A maior velocidade de agitação e taxa de aeração, utilizados na condição A (300rpm e 3vvm), influenciaram positivamente na produção e viscosidade da xantana produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* pv pruni 101 em diferentes tempos de fermentação, resultados estes confirmados pelo coeficiente de transferência de oxigênio (k_La).

Conclui-se que para a cepa 101 o término da fermentação deverá ocorrer em 54h, quando é alcançada a melhor combinação entre os resultados de viscosidade e produção, com menor gasto de energia e tempo.

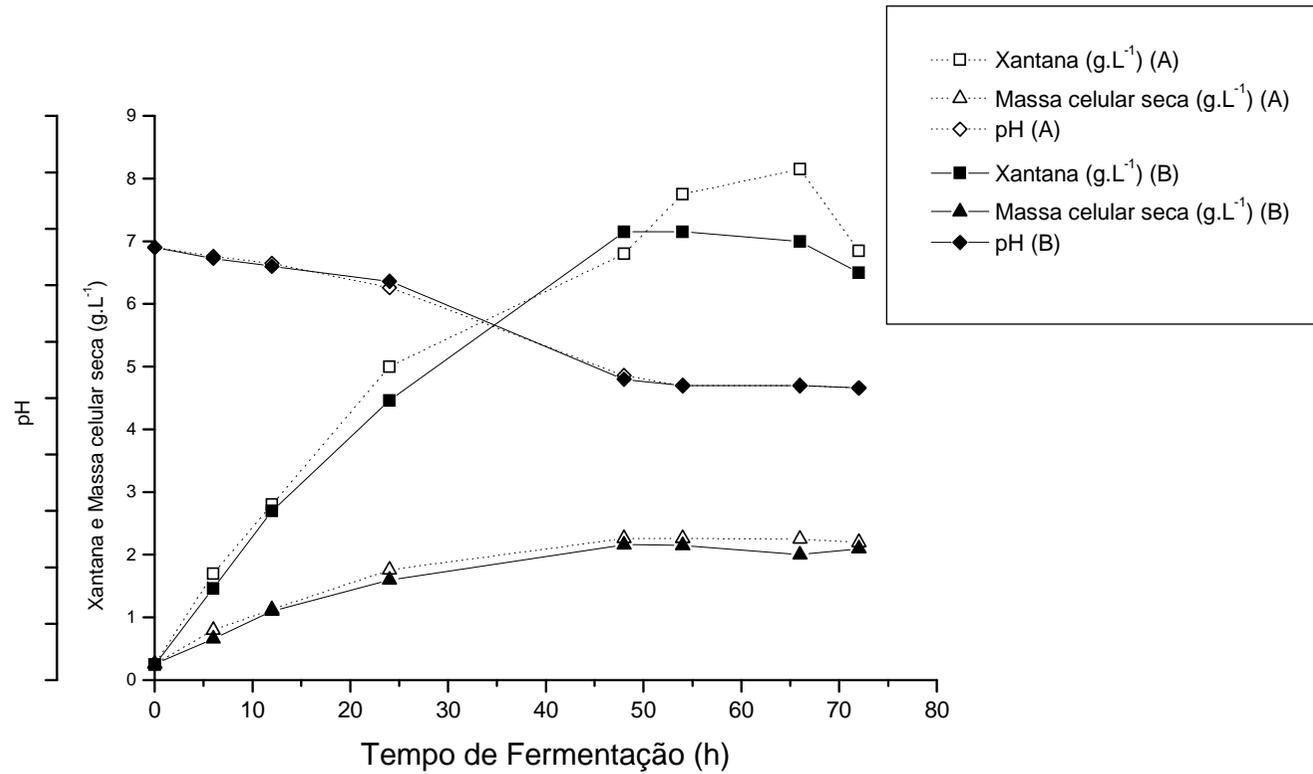


FIGURA 1: Efeito do tempo de fermentação na produção de xantana por *X. campestris* pv pruni 101, massa celular seca e pH do meio em função da velocidade de agitação e taxa de aeração (condição A: 300rpm, 3vvm e condição B: 200rpm, 2vvm).

TABELA 1: Análise estatística da produção de xantana, massa celular seca e pH do meio fermentado por *Xanthomonas campestris* pv pruni 101 em duas combinações de velocidade de agitação e taxa de aeração (condição A: 300rpm, 3vvm e condição B: 200rpm, 2vvm) em diferentes tempos de fermentação

Tempo/Condição	Produção (g.L ⁻¹)		Massa celular seca (g.L ⁻¹)		pH
0h/A	0,25	OP	0,26	IJ	6,90 A
0h/B	0,25	P	0,26	J	6,90 A
6h/A	1,70	MN	0,80	GH	6,76 AB
6h/B	1,46	N	0,66	H	6,73 AB
12h/A	2,80	JL	1,13	EF	6,65 AB
12h/B	2,70	L	1,10	F	6,60 BC
24h/A	5,00	HI	1,76	CD	6,36 CD
24h/B	4,46	I	1,60	D	6,26 D
48h/A	6,80	FG	2,26	A	4,86 EFGHIJLMN
48h/B	7,15	BCDEF	2,16	AB	4,80 FGHIJLM
54h/A	7,75	A	2,26	A	4,70 GHIJLM
54h/B	7,15	CDEF	2,15	AB	4,70 HIJLM
66h/A	8,15	A	2,25	A	4,70 IJLM
66h/B	7,00	DEFG	2,00	BC	4,70 JLM
72h/A	6,85	EFG	2,20	AB	4,66 LM
72h/B	6,50	G	2,10	AB	4,66 M

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

-As médias apresentadas correspondem a três repetições do tratamento.

TABELA 2: Viscosidade aparente (mPa.s) a 25°C e 65°C nas taxas de deformação 10, 30, 60 e 100s⁻¹ das soluções aquosas a 3% (m/v) da xantana comercial e das xantanas sintetizadas por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 em diferentes tempos de fermentação nas condições A:300rpm, 3vvm e B:200rpm, 2vvm

Polímero	Condição	Temperatura (°C)	Viscosidade aparente (mPa.s)			
			Taxa de deformação (s ⁻¹)			
			10	30	60	100
Xp-24h		25	4.820	1.830	1.030	0.660
		65	3.560	1.410	0.800	0.500
Xp-48h		25	5.940	2.240	1.250	0.790
		65	3.990	1.650	0.940	0.580
Xp-54h	A	25	7.100	2.620	1.450	0.910
		65	4.710	1.820	1.010	0.620
Xp-66h		25	6.480	2.410	1.340	0.840
		65	4.450	1.800	1.000	0.620
Xp-72h		25	5.460	2.070	1.150	0.730
		65	3.860	1.520	0.840	0.530
Xp-24h		25	3.770	1.520	0.880	0.570
		65	2.140	0.940	0.560	0.380
Xp-48h		25	5.150	2.000	1.130	0.720
		65	3.150	1.410	0.820	0.530
Xp-54h	B	25	5.200	2.130	1.230	0.800
		65	3.320	1.430	0.840	0.540
Xp-66h		25	5.410	2.110	1.200	0.770
		65	3.370	1.440	0.840	0.530
Xp-72h		25	4.820	1.890	1.080	0.690
		65	3.170	1.270	0.720	0.460
X		25	3.400	1.190	0.650	0.430
		65	3.310	1.130	0,610	0,380

X: Xantana comercial

Xp: Xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101

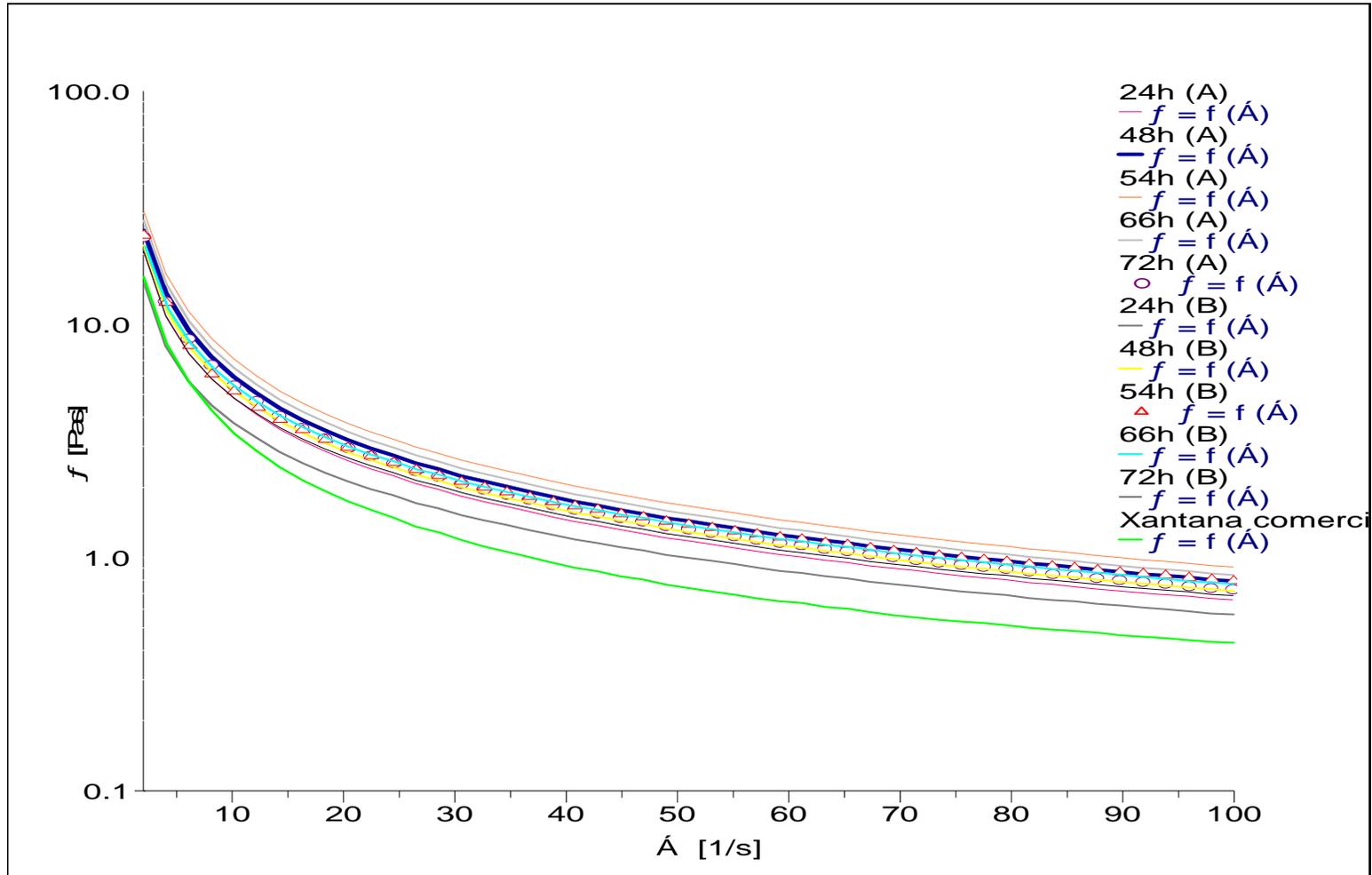


FIGURA 2: Viscosidade aparente a 25°C vs taxa de de formação (s^{-1}) das soluções aquosas a 3% (m/v) das xantanas sintetizadas por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 em diferentes tempos de fermentação nas condições A: 300rpm, 3vvm e B: 200rpm, 2vvm.

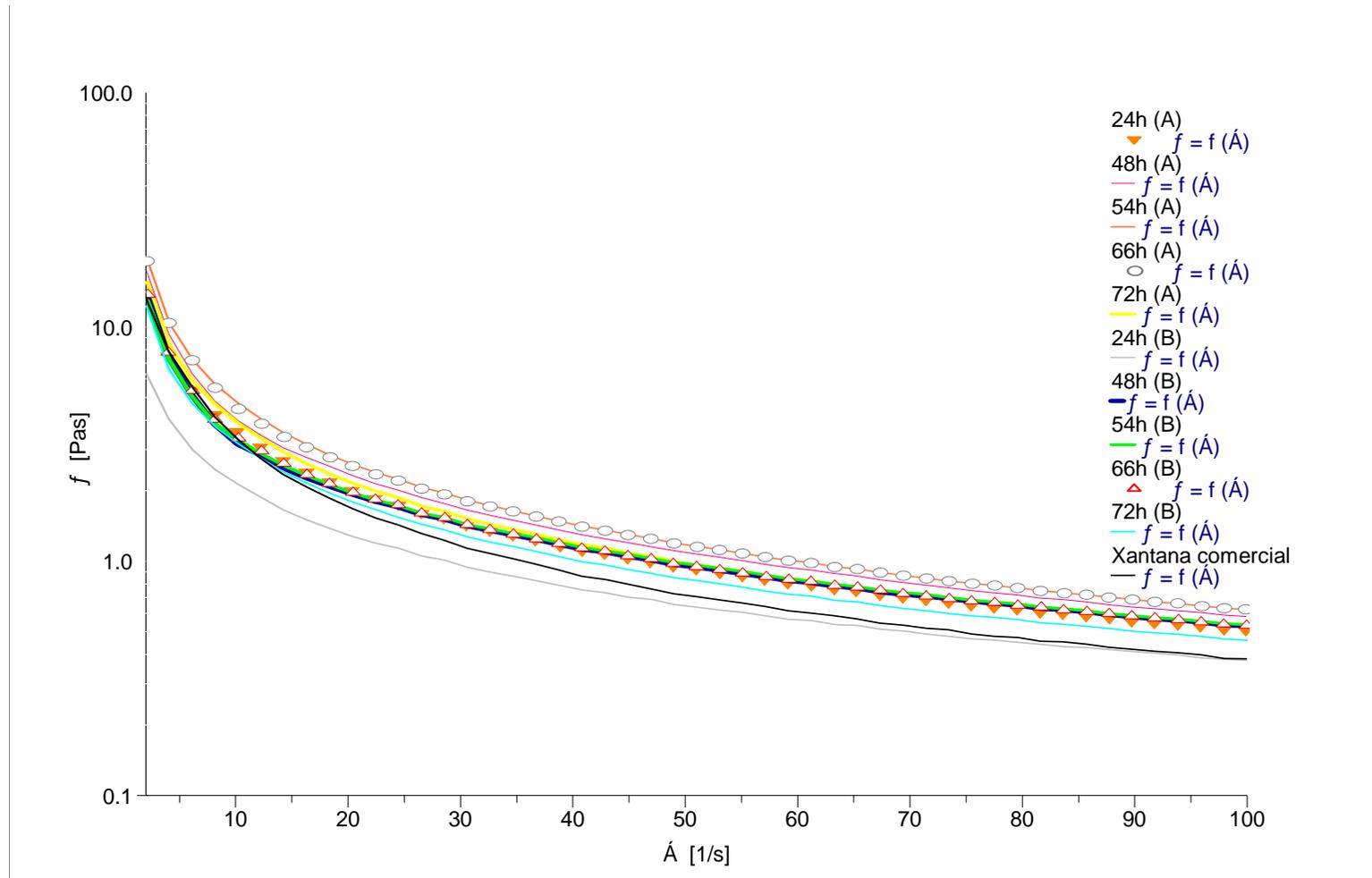


FIGURA 3: Viscosidade aparente a 65°C vs taxa de de formação (s^{-1}) das soluções aquosas a 3% (m/v) das xantanas sintetizadas por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepa 101 em diferentes tempos de fermentação nas condições A: 300rpm, 3vvm e B: 200rpm, 2vvm.

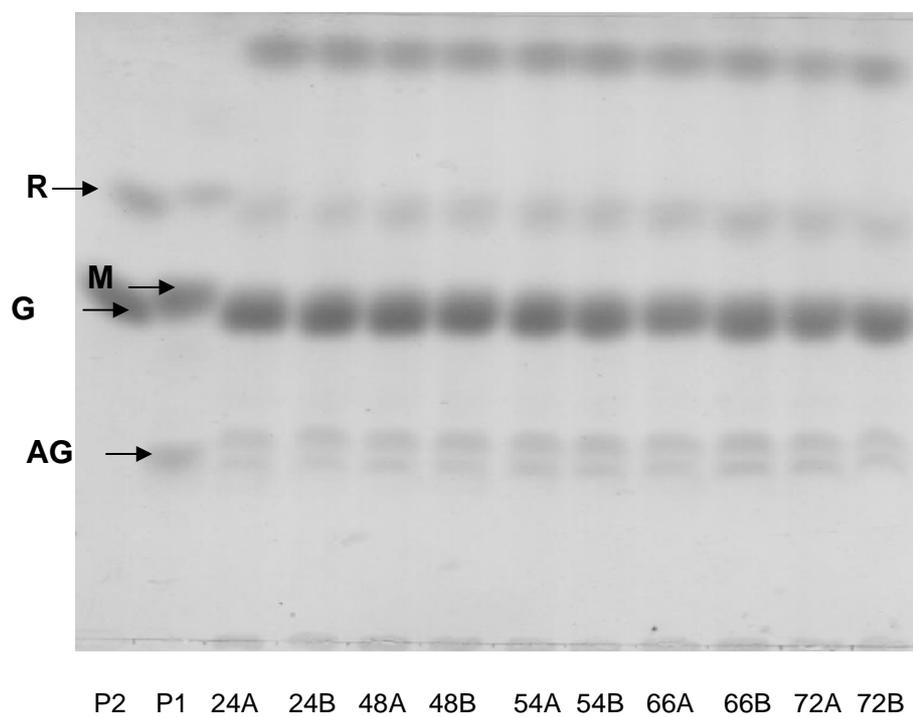


FIGURA 4: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa dos polímeros sintetizados pela *Xanthomonas campestris* pv pruni 101 obtidos sob as condições A e B. Padrões: (P1) ácido glicurônico (AG), manose (M) (P2) glicose (G), ramnose (R).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANULLAH, A.; SERRANO, L. C.; GALINDO, E.; NIENOW, A. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. **Biotechnol. Prog.**, v.12, p.466-473, 1996.
- ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p. 317-322, 2003.
- AYUB, M. A. Z. Tecnologia de Bioprocessos - Processos Fermentativos Genéricos, ICTA, 2001. (Comunicação Pessoal)
- 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. C.; 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.
- DIAZ, P. S. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana.** Pelotas, 2002. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2002.
- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M. A. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: effects on xanthan production. **Microbiol Biotechnol**, v. 40, p. 634-637, 1994.
- GARCÍA-OCHOA, F.; GÓMEZ CASTRO, E.; SANTOS, V.E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27, p. 680-690, 2000a.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 549-579, 2000b.
- GUO-QING LI; HONG-WEI QIU; ZHI-MING ZHENG; ZHAO-LING CAI; SHOU-ZHI YANG. Effect of fluid rheological properties on mass transfer in a bioreactor. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, p. 385-391, 1995.
- HAYNES, W. C.; WICKERHAM, L. J. & HESSELTINE, C.W. Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. **Applied Microbiology**, p.361-368, 1955.

- KONÍČEK, J.; LASÍK, J.; SAFÁR, H. Xanthan gum produced from whey by mutant strain of *Xanthomonas campestris*. **Folia Microbiol**, v. 28, n.5, p.403-405, 1993.
- MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474, 2001.
- MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni**. Pelotas, 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, UFPel, 2002.
- MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação de composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.4 , n.3 , p. 222-224,1998.
- MORRIS, E. R. **Rheology of hydrocolloids**. In: PRILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. Gums and stabilisers for the Food Industry. Oxford: Pergamon Press, p.57-78, 1984.
- NAVARRO, R. F. **Fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul: EDUCS, 1997. 256p.
- 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.
- PETERS, H.; HERBST, H.; HESSELINK, P.; LÜNSDORF, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 1393-1397, 1989.
- RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Production and mass transfer characteristics of non-newtonian biopolymers for biomedical applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 44, n.4, p. 355-374, 2002.
- ROCKS, J. K. Xanthan gum. **Food Technology**, v. 25, p.476-483, 1971.
- ROUKAS, T.; MANTZOURIDOU, F. Effect of the aeration rate on pullulan production and fermentation broth rheology in na airlift reactor. **J. Chem. Tech. Biotechnol**, v.76, p. 371-376, 2001.
- SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv pruni cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, v.8, n.2, p. 115-123, 1999.

- SUTHERLAND, I. W. Extracellular polysaccharide. In: DELLWEY, H. **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemie, v.3, 1983. p. 553-574.
- TAIT, M. I.; SUTHERLAND, W.; CLARKE-STURMAN, A. Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p.1483-1492, 1986.
- TORRES, L.G.; BRITO, E.; GALINDO, E.; CHOPLIN, L. Viscous behavior of xanthan solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.75, n.1, p. 58-64, 1993.
- VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv *pruni* C24. In: K. Nishinari, **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, v. 1, p. 187-191, 2000.
- WAGNER, H.; BIADT, S.; ZGAINSKI, G. M. **Plant Drug Analysis**. New York: Springer-Verlag, 1984.
- ZHANG XUEWU; LIU XIN; GU DEXIANG; ZHOU WEI; XIE TONG; MO YONGHONG. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 27, p. 203-209, 1996.

CONCLUSÕES GERAIS

- Todas as cepas de *Xanthomonas campestris* pv pruni testadas, produziram xantana, com exceção da cepa 107;
- A produção, viscosidade e composição química quantitativa das xantanas sintetizadas por *Xanthomonas campestris* pv pruni são dependentes da cepa, porém a composição química qualitativa independe da cepa;
- Dentre as 30 cepas analisadas, 16 produziram xantana com viscosidade superior à xantana comercial analisada, apresentando viscosidade até 4 vezes superior, compensando a baixa produção. A cepa 101 foi selecionada para ser testada quanto a transposição de escala de fermentação e para o estudo das condições operacionais (aeração, agitação e tempo de fermentação);
- A xantana sintetizada pela cepa 101, na condição de maior aeração/agitação, apresentou os melhores resultados tanto de produção como de viscosidade;
- Propõe-se, para a cepa 101, o término da fermentação em 54h em relação a 72h, quando é alcançada a melhor combinação entre os resultados de produção e viscosidade, com menor gasto de energia e tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- CASAS, J. C.; 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.
- CIVEROLO, E. L.; HATTINGH, M. J. *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: cause of prunus bacterial spot. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p.60-64.
- 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**, 1994, p.495-514.
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p.1
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides - New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v.28, n.5, p.34-38, 1974.
- MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. Pelotas, 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, UFPel, 2002.
- MORRIS, R. Molecular origin of xathan solution properties. In: Extracellular microbial polysaccharides. **American Chemical Society**, 1977, p. 83-89.
- PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**, v.2. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1981. 1031p.
- RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Production and mass transfer characteristics of non-newtonian biopolymers for biomedical applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 44, n.4, p. 355-374, 2002.
- SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 363-388.
- TESSMANN, C. **Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv *pruni* pela técnica de RAPD e relação com a planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química da xantana**. Pelotas, 2002. 33f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia Agroindustrial) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2002.