

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS – PEP

**PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO  
AÇÚCAR DEMERARA POR DIFERENTES  
LINHAGENS DE *Xanthomonas***

Autor: Larissa Castor Ramos

Orientadores: Daniel Pereira Silva, Dr.

Denise Santos Ruzene, Dra.

Co-orientadora: Francine Ferreira Padilha, Dra.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2012

PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO AÇÚCAR DEMERARA POR  
DIFERENTES LINHAGENS DE *Xanthomonas*

Larissa Castor Ramos

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
ENGENHARIA DE PROCESSOS

Aprovada por:

---

Daniel Pereira Silva, Dr.

---

Denise Santos Ruzene, Dra.

---

Francine Ferreira Padilha, Dra.

---

Maria de Lourdes T. de M. Polizeli, Dra.

---

Álvaro Silva Lima, Dr.

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2012

R175p Ramos, Larissa Castor

Produção de goma xantana utilizando açúcar demerara por diferentes linhagens de xanthomonas. / Larissa Castor Ramos; Orientadores: Denise Santos Ruzene, Daniel Pereira da Silva. – Aracaju, 2012.

74p. : il  
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). – Universidade Tiradentes, 2013

1. Goma xantana. 2. Biopolímero. 3. Xanthomonas. 4. Fermentação. 5. Screening. 6. Engenharia de processos. I. Ruzene, Denise Santos. (orient.) II. Silva, Daniel Pereira. (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 66.0

A minha família

## *Agradecimentos*

Agradeço ao Universo, sob jus do Pai Maior, pela força, capacidade física e capacidade psicológica que me proporciona a vida;

Agradeço a meu pai Edson e minha mãe Dora pelo carinho, apoio, dedicação, amor, confiança e pela minha vida;

Agradeço ao meu pequeno filho João Pedro por me ter trazido tanta força e vontade de crescer profissionalmente, por me encorajar a cada dia que amanhece com um sorriso;

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Dr. Daniel Pereira da Silva e Profa. Dra. Denise Santos Ruzene, pelo apoio científico e, principalmente, pelo carinho acolhedor tanto em momentos felizes como em um dos momentos de extrema tensão da minha vida. Guardá-los-ei eternamente no meu coração!

Agradeço à minha co-orientadora, Profa. Dra. Francine Ferreira Padilha, por aceitar participar da minha dissertação, colaborando e me auxiliando com seu vasto conhecimento em biopolímeros;

Agradeço a todos os meus colegas de curso e a toda equipe do Laboratório de Biomateriais (LBMat) que, com alegria e cumplicidade, compartilharam comigo todo meu aprendizado;

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica (Alberto Jr. e Érica Santos) que compartilharam comigo cada descoberta, cada obstáculo, cada final de semana de trabalho e cada conquista;

Agradeço à empresa Agropecuária Santa Sara pelo apoio no desenvolvimento de ideias, fortalecendo e incentivando meu perfil de inovação tecnológica;

Agradeço à CAPES pelo suporte financeiro concedido durante o período de Mestrado, bem como a toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos por todo aprendizado que me proporcionaram;

Agradeço ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) e a Universidade Tiradentes (UNIT) pela visão empresarial e educacional das quais pude usufruir durante dois anos.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

## PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO AÇÚCAR DEMERARA POR DIFERENTES LINHAGENS DE *Xanthomonas*

Larissa Castor Ramos

A goma xantana é um biopolímero derivado de um processo fermentativo envolvendo bactérias do gênero *Xanthomonas*. Este biopolímero pode ser utilizado por diversos setores industriais com o intuito de agregar viscosidade a um produto. Para produção da goma xantana, as *Xanthomonas* precisam de um meio rico em macro e micronutrientes. Assim, estudos estão sendo realizados para tentar minimizar os custos de produção deste polissacarídeo. Neste trabalho foi estudada a utilização do açúcar demerara como fonte de carbono principal. Para tanto, foram realizados experimentos baseados na metodologia de planejamento experimental  $2^3$  com cinco pontos centrais, análise de variância, diagrama de Pareto e análise de superfície de resposta a fim de avaliar quais variáveis interferem significativamente na produção da goma xantana. A variável  $K_2HPO_4$  mostrou-se uma variável significativa para a produção de goma xantana utilizando as cepas *Xanthomonas* 290 e *Xanthomonas* 472, e a variável  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  mostrou-se significativa para a cepa *Xanthomonas* S6 em meio contendo sacarose. O açúcar demerara pode ser uma alternativa viável à produção de goma xantana. Neste trabalho, a produção máxima de goma xantana foi obtida pelas cepas *Xanthomonas* 472 e *Xanthomonas* sp S6 (1,30 g/L e 1,38 g/L, respectivamente) utilizando açúcar demerara como principal fonte de carbono. Além disso, é possível notar que o açúcar demerara pode substituir, parcialmente, o fosfato de potássio.

Palavras-chave: Goma Xantana, *Xanthomonas*, Screening, Biopolímero, Fermentação.

Abstract of the Dissertation presented to the Process Engineering Program of Universidade Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Process Engineering

XANTHAN GUM PRODUCTION USING RAW SUGAR BY  
DIFFERENT STRAINS OF *Xanthomonas*

Larissa Castor Ramos

The xanthan gum is a biopolymer derived from the fermentation process involving bacteria of the genus *Xanthomonas*. The biopolymer may be used for various industrial sectors in order to add viscosity to the product. For production of xanthan gum, the *Xanthomonas* need a medium rich in macro and micronutrients. Studies are being conducted to try to minimize the cost of production of this polysaccharide. This work studied the use of brown sugar as a primary carbon source. However, experiments were performed based on the methodology of experimental design and response surface analysis to assess which variables significantly interfere with the production of xanthan gum. The variable  $K_2HPO_4$  proved a significant variable for the production of xanthan gum using strains *Xanthomonas* 290 and *Xanthomonas* 472, and the variable  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  was significant for strain *Xanthomonas* S6 on medium containing sucrose. The brown sugar can be a viable alternative to the production of xanthan gum. In this work the highest yield (1.30 g/L and 1.38 g/L) of xanthan gum was obtained for strains *Xanthomonas* 472 and *Xanthomonas* sp S6, respectively, using brown sugar as the main carbon source. Furthermore, it is possible to notice that the raw sugar may partially replace the potassium phosphate.

Keywords: Xantam Gum, *Xanthomonas*, Screening, Biopolymer, Fermentation

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiii
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	5
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	5
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
CAPÍTULO 2.....	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 GÊNERO <i>Xanthomonas</i> .....	6
2.2 SCREENING DE <i>Xanthomonas</i> .....	8
2.3 GOMA XANTANA.....	9
2.4 PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA.....	13
2.4.1 MEIO DE PRODUÇÃO.....	13
2.4.2 PROCESSO FERMENTATIVO.....	15
2.4.3 RECUPERAÇÃO DA GOMA.....	17
2.5 QUALIDADE DA GOMA.....	18
2.5.1 PROPRIEDADES REOLÓGICAS.....	18

<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>21</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 MICRORGANISMO</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 PREPARO DO INÓCULO</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3 PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA</b> .....	<b>22</b>
<b>3.4 METODOLOGIA ESTATÍSTICA APLICADA AOS EXPERIMENTOS</b> .....	<b>23</b>
<b>3.5 RECUPERAÇÃO DA GOMA XANTANA</b> .....	<b>24</b>
<b>3.6 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>26</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1 MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS BACTERIANAS</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2 PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA</b> .....	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>51</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>52</b>
<b>6 RECOMENDAÇÕES FUTURAS</b> .....	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>53</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Visualização microscópica da <i>Xanthomonas campestris</i>	7
Figura 2	Esqueleto principal da goma xantana	10
Figura 3	Biossíntese da goma xantana	11
Figura 4	Processo de Entner-Doudoroff	12
Figura 5	Desenvolvimento de perfil laminar permanente de velocidade para um fluido contido entre duas placas	19
Figura 6	Aspecto das colônias <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290 em ágar YM após crescimento em estufa por 24 horas a 28°C.	27
Figura 7	Goma xantana produzida no meio contendo as variáveis deste estudo referentes ao ponto central e sacarose como fonte de carbono, utilizando a cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472.	27
Figura 8	Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290	36
Figura 9	Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290	37
Figura 10	Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472.	38
Figura 11	Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472.	39
Figura 12	Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa <i>Xanthomonas</i> sp S6.	40
Figura 13	Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa <i>Xanthomonas</i> sp S6.	41

Figura 14	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e $K_2HPO_4$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290.	44
Figura 15	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e $K_2HPO_4$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472	44
Figura 16	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e $K_2HPO_4$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas</i> sp S6	45
Figura 17	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e $MgSO_4.7H_2O$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290.	45
Figura 18	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e $MgSO_4.7H_2O$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472.	46
Figura 19	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e $MgSO_4.7H_2O$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas</i> sp S6.	46
Figura 20	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e $K_2HPO_4$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290.	47
Figura 21	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e $K_2HPO_4$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472.	48
Figura 22	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e $K_2HPO_4$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas</i> sp S6.	48
Figura 23	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e $MgSO_4.7H_2O$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290.	49

Figura 24	Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472.	49
Figura 25	Gráfico de superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa <i>Xanthomonas</i> sp S6.	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipos de biopolímeros	1
Tabela 2	Utilização da goma xantana	2
Tabela 3	Composição química de açúcares	4
Tabela 4	Planejamento fatorial $2^3$ das variáveis açúcar demerara ou sacarose, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e $K_2HPO_4$ para produção de goma xantana	24
Tabela 5	Matriz do planejamento fatorial $2^3$ (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290 e sacarose como fonte principal de carbono.	28
Tabela 6	Matriz do planejamento fatorial $2^3$ (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290 e açúcar demerara como fonte principal de carbono.	29
Tabela 7	Matriz do planejamento fatorial $2^3$ (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> IBSBF 472 e sacarose como fonte principal de carbono.	30
Tabela 8	Matriz do planejamento fatorial $2^3$ (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> IBSBF 472 e açúcar demerara como fonte principal de carbono.	31
Tabela 9	Matriz do planejamento fatorial $2^3$ (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa <i>Xanthomonas</i> sp. S6 e sacarose como fonte principal de carbono.	32
Tabela 10	Matriz do planejamento fatorial $2^3$ (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa <i>Xanthomonas</i> sp. S6 e açúcar demerara como fonte principal de carbono.	33
Tabela 11	ANOVA para produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290.	36
Tabela 12	ANOVA para produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihotis</i> IBSBF 290.	37

Tabela 13	ANOVA para produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472.	38
Tabela 14	ANOVA para produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa <i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>campestris</i> IBSBF 472.	39
Tabela 15	ANOVA para produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa <i>Xanthomonas</i> sp S6.	40
Tabela 16	ANOVA para produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa <i>Xanthomonas</i> sp S6.	41

## 1 INTRODUÇÃO

Polímero pode ser definido como uma molécula grande, macromolécula, a qual se origina da repetição de monômeros ao longo da cadeia. Quando o polímero tem origem biológica (animal, vegetal ou microbiológica) são denominados de biopolímeros ou polímeros biológicos (LUCAS *et al.*, 2001). Deste modo, sabe-se que no mercado industrial atual é possível encontrar grande variedade de biopolímeros produzidos naturalmente por microrganismos, prática iniciada por volta da década de 1950. Eles podem ser caracterizados como polissacarídeos, poliésteres, poliamidas, ou outros a depender da composição molecular do seu esqueleto principal (REHM, 2009; LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009).

A principal matéria-prima para produção de biopolímeros são carboidratos oriundos de plantas comerciais de larga escala como cana-de-açúcar, milho, beterraba, mandioca, trigo, entre outras fontes de carboidratos ou ainda, algum tipo de óleo vegetal (BORSCHIVER *et al.*, 2008). A Tabela 1 mostra alguns tipos de biopolímeros e suas características.

**Tabela 1:** Tipos de biopolímeros

TIPOS DE BIOPOLÍMEROS	
NOME	CARACTERÍSTICA
POLILACTATO (PLA)	Poliéster produzido por síntese química ou a partir do ácido lático por fermentação de <i>Lactobacillus casei</i>
POLIHIDROXIALCANOATO (PHA)	Poliésteres produzidos por bacilos por intermédio da biossíntese direta de carboidratos
POLÍMEROS DE AMIDO (PA)	Polissacarídeos produzidos a partir do amido de: milho, mandioca, etc.; por extração sólido-líquido
XANTANA	Exopolissacarídeo produzido por bactérias do gênero <i>Xanthomonas</i> a partir da fermentação carboidratos
GELANA	Exopolissacarídeo produzido por bactéria do gênero <i>Sphingomonas</i> a partir da fermentação de carboidratos

Fonte: BORSCHIVER *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2011; GUMUS *et al.*, 2010.

A produção de biopolímeros microbianos tem atraído amplo interesse industrial e a goma xantana é um excelente exemplo destes biopolímeros. Descoberta por volta dos anos 50 pela empresa *Northern Utilization Research Development*, e obtida pela bactéria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, a goma xantana foi inicialmente chamada de Polissacarídeo B-1459 passando a ser comercializada a partir de 1960 (REHM, 2009; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Em relação ao mercado, a goma xantana proporciona ao mercado cerca de 408 milhões de dólares, com produção anual relatada em 1998 de 20.000 toneladas, em 2000 de 30.000 toneladas e em 2006 de 50.000 toneladas. É utilizada em indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética, petroquímica, agrícola, etc. Sendo que 65% da sua produção total está localizada na indústria alimentícia (SUTHERLAND, 1998; DEMAIN, 2000; ROSALAM & ENGLAND, 2006). A Tabela 2 mostra algumas das funções exercidas pela goma xantana em indústrias.

**Tabela 2:** Utilização da goma xantana

UTILIZAÇÃO DA GOMA XANTANA	
INDÚSTRIA	FUNÇÃO
Alimentícia	Espessante, estabilizante, substituto de gorduras
Farmacêutica	Espessante, estabilizante, biofilme e agentes de suspensão em polivitamínicos
Cosmética	Espessante, biofilme e estabilizante
Petrolífera	Fluido de perfuração de poços, lubrificação e recuperação terciária
Agrícola	Dispersão das suspensões fungicidas, herbicidas e inseticidas

Fonte: SUTHERLAND, 1998; SEN, 2008.

Segundo Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), consideram-se aditivos para alimentos, para os fins deste Decreto, as substâncias ou misturas de substâncias, dotadas ou não de poder alimentício ajuntadas aos alimentos com finalidade de lhes conferir ou intensificar o aroma, a cor, o sabor ou modificar seu aspecto físico geral ou ainda prevenir alterações indesejadas. Em 1969, a goma xantana foi aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para uso como estabilizante, emulsificante e espessante em alimentos. Sendo hoje, um dos poucos biopolímeros de origem bacteriana aprovados pela ANVISA para uso como aditivo alimentar; desde que seja fabricado de acordo com o regulamento técnico das Boas Práticas de Fabricação (BPF).

Assim, na indústria de alimentos, a xantana além de atuar como estabilizante, espessante, geleificante e crioprotetora, sendo muitas vezes a principal responsável pela textura (corpo, viscosidade e consistência) dos alimentos processados, pode ser considerada fibra alimentar, mostrando-se resistentes à digestão pelas enzimas do trato gastrointestinal humano e apresentando algum efeito laxativo. Além disso, a xantana tem sido estudada como possível ingrediente de alimentos funcionais por indicar capacidade em reduzir o índice de colesterol no plasma sanguíneo e, conseqüentemente, diminuir o risco de doenças cardiovasculares (SLAVIN e GREENBERG, 2003).

Por outro lado, a produção de goma xantana, como todo biopolímero, tem como principal matéria prima fontes de carbono renovável, preferencialmente carboidrato. Para tanto, diversas fontes alternativas de carboidratos são estudadas por pesquisadores como: soro de queijo, melão, mandioca, cana-de-açúcar, entre outras. Além da fonte de carbono, a *Xanthomonas* necessita de um meio rico em micronutrientes para o seu crescimento e, conseqüentemente, produção de goma xantana (KALOGIANNIS *et al.*, 2003; SHIT TU *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

Neste sentido, torna-se importante lembrar que o Brasil, segundo a União da Indústria de Açúcar – UNICA, é um dos maiores produtores mundiais de açúcar, chegando a uma produção de 33,501 milhões de toneladas em 2010/11. Usinas de cana-de-açúcar podem visar de modo independente ou de modo conjunto, a produção de açúcar, álcool combustível e/ou aguardente. O tratamento inicial do caldo de cana para produção de qualquer tipo de açúcar é realizado em uma série de operações englobadas na fase denominada ‘defecação’, que por sua vez possui como agentes a ação do calor, da cal, do gás sulfuroso, do ácido fosfórico e do carbonato de sódio, entretanto, nem sempre utilizados em conjunto (BAYMA, 1974).

Para fabricação do açúcar demerara, por exemplo, apenas são utilizados o calor e o leite de cal (solução de água e cal). O leite de cal é utilizado para neutralizar a acidez do caldo de cana e, sua ação conjunta com um tratamento térmico auxilia na eliminação de algumas impurezas como: albumina, ceras e alguns sais (BAYMA, 1974).

Deste modo, o açúcar demerara, que passa apenas por um breve refinamento, apresenta uma coloração mais clara que o açúcar mascavo (açúcar bruto) e maior teor de vitaminas e minerais que o açúcar refinado comum (Tabela 3), apresentando-se ainda com características de fácil obtenção no país, custo industrial inferior à sacarose pura (P.A.) e perfis nutricionais favoráveis ao crescimento da *Xanthomonas*, tornando-se uma alternativa interessante ao estudo de obtenção de goma xantana, objetivo desta dissertação de mestrado junto ao programa de pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes, conforme apresentado no sub-item a seguir.

**Tabela 3:** Composição química de açúcares

Componentes	Açúcar Refinado	Açúcar Demerara
Energia	387 kcal	376 kcal
Carboidrato	99,90 g	97,30 g
Vitamina B1	0 mg	0,010 mg
Vitamina B2	0,020 mg	0,010 mg
Vitamina B6	0 mg	0,030 mg
Cálcio	1,0 mg	85 mg
Magnésio	0 mg	29 mg
Cobre	0,040 mg	0,300 mg
Fósforo	2 mg	22 mg
Potássio	2mg	346 mg

Fonte: Baseado em PHILLIPI, 1995.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Produzir goma xantana a partir de açúcar demerara por diferentes linhagens de *Xanthomonas*.

### 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o crescimento de 3 (três) linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290, *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472, *Xanthomonas* sp S6 em meio contendo sacarose comercial e açúcar demerara como fonte principal de carbono;
- ✓ Avaliar diferentes concentrações de fontes de carbono e sais no desempenho do processo para obtenção de goma: sacarose ou açúcar demerara (3-7%), sulfato de magnésio heptahidratado  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,01-0,1%) e fosfato dibásico de potássio  $K_2HPO_4$  (0,2-1%);
- ✓ Realizar estudo estatístico utilizando Análise de variância e Diagramas de Pareto sobre as variáveis aplicadas neste trabalho, visando verificar o nível de significância das mesmas: sacarose ou açúcar demerara,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $K_2HPO_4$ ;
- ✓ Realizar estudo estatístico utilizando a metodologia de superfície de resposta visando proporcionar um comparativo de variação entre as variáveis.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GÊNERO *Xanthomonas*

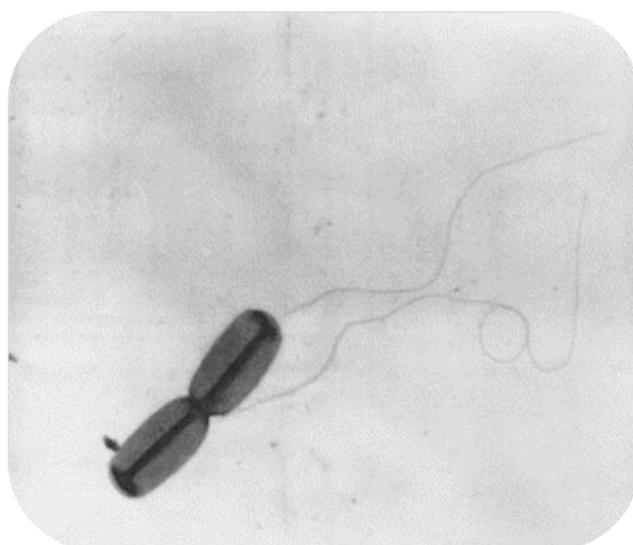
Uma vez que os polissacarídeos extracelulares livres são considerados importantes para a indústria devido à sua facilidade de obtenção, torna-se importante o estudo das *Xanthomonas*, que são bactérias produtoras de um heteropolissacarídeo extracelular denominado de goma xantana.

As bactérias do gênero *Xanthomonas* pertencem à família das *Pseudomonaceae*, têm características fitopatogênicas e causam uma doença conhecida como Cancro Cítrico. *Xanthomonas* podem infectar damasco, cereja, amêndoas, pêssego, nectarina, entre outros frutos e plantas cítricas, além de cultivos de arroz (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; ANTUNES *et al.*, 2003; REHM, 2009). A bactéria entra no tecido vegetal por intermédio de uma ferida aberta e ganha acesso às partes internas da planta e/ou fruto resultando no aparecimento de lesões necróticas (JACKSON, 2009).

Suas colônias geralmente são lisas, viscosas e amareladas. Além disso, necessitam obrigatoriamente de oxigênio para sua sobrevivência, são positivas a teste de catalase e negativas para testes de oxidase. As *Xanthomonas* têm característica de bastonete reto, são móveis por possuírem flagelos e Gram-negativas. Uma ilustração de *Xanthomonas campestris* é apresentada na Figura 1 (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Bactérias Gram-negativas apresentam parede celular mais fina por possuírem uma menor quantidade de peptidoglicano em relação às Gram-positivas. Além disso, possuem como maior componente o macrolipídeo denominado de lipopolissacarídeo, que proporciona à superfície celular características hidrofílicas. Podendo-se ressaltar, que algumas bactérias são circundadas por uma camada de material viscoso conhecido como glicocálice (PELCZAR Jr *et al.*, 2004).

O mesmo autor ainda explica que este glicocálice é composto de polímero (homossacarídeo ou heteropolissacarídeo) que, se estiver organizado de maneira definida e acoplado à parede celular é considerado uma cápsula. Por outro lado, se estiver desorganizado, sem forma definida e acoplado frouxamente à parede celular, é descrito como camada limosa. A presença de glicocálice pode ressaltar a característica de hidrofiliabilidade da bactéria Gram-negativa.



**Figura 1:** Visualização microscópica da *Xanthomonas campestris* (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000)

É verificado que a *Xanthomonas campestris* produz e secreta xantana em meios de cultivo axênicos, enquanto a *Xanthomonas albilineans* não produz o exopolissacarídeo devido a enzima UDPG desidrogenase, crucial para a produção dos resíduos glicurônicos, ser fortemente degradada por proteases bacterianas no meio de cultivo axênico de sacarose. O fato da *X. albilineans* poder sintetizar e secretar xantana quando infecta a cana-de-açúcar, sugere que alguma característica do hospedeiro interfere no processo de produção da goma, fator este capaz de anular a ação das proteases. Um dado importante para este fato é que a cana-de-açúcar infectada pelo patógeno produz glicoproteínas que são capazes de assegurar a produção da xantana (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

O gênero *Xanthomonas* possui várias espécies com capacidade de produzir goma xantana, sendo que, as diferentes cepas da bactéria são divididas em patovares. A *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* é o agente causal da podridão negra, ou cancro cítrico, das plantas crucíferas e é também o patovar mais comumente utilizado para produção industrial de goma xantana (REHM, 2009). Entretanto outros patovares produtores de goma xantana também são comumente estudados, como o patovar *pruni*, agente causal da doença chamada de mancha bacteriana prunus encontrada em cultivares do tipo *Prunus* como pêsego e ameixeiras (MOREIRA *et al.*, 2001).

Para o crescimento das *Xanthomonas* é necessário, além do controle da aeração e da temperatura, o controle do pH devido à formação de compostos ácidos durante o processo fermentativo. Alguns autores alegam que a temperatura ótima para o crescimento da *Xanthomonas* é de 28 a 30°C e o pH ótimo é o mais próximo de 7. Além disso, problemas por contaminações cruzadas podem existir, devido à grande afinidade bacteriana com o substrato das *Xanthomonas* (PSOMAS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009; GUMMUS *et al.*, 2010).

## 2.2 SCREENING DE *Xanthomonas*

A obtenção de microrganismos de interesse industrial pode decorrer de: isolamento a partir de recursos naturais, aquisições de coleções de culturas, obtenção de mutantes microbiológicos e recombinação gênica de microrganismos. O isolamento de microrganismos a partir de recursos naturais é uma atividade de grande importância para a obtenção de novas linhagens de interesse industrial. Porém, trata-se de uma atividade que requer muito trabalho experimental, tendo custo relativamente elevado, mas pode conduzir ao isolamento de linhagens melhor produtoras de um dado produto (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Por conta da dificuldade de triagem de cepas do seu habitat natural, é mais viável realizar a avaliação do perfil produtivo de determinadas cepas, como *Xanthomonas spp.*, já previamente isoladas, em meios específicos para designar, naquele substrato, qual o melhor microrganismo produtor de goma xantana (ANTUNES *et al.*, 2003).

A importância de uma boa seleção do microrganismo a ser utilizado deve-se ao fato que a qualidade da goma xantana obtida pode ser alterada tanto com a variação de cepa, como com a variação de substrato presente no meio fermentativo para a respectiva cepa. Essa alteração da goma pode ser quantitativa ou qualitativa, influenciando nas suas características físico-químicas e reológicas (MOREIRA *et al.*, 2001).

Estudo realizado por Antunes *et al.* (2003) mostrou a realização de uma triagem de *Xanthomonas* com 13 espécies diferentes em 2 meios fermentativos variando algumas condições de fermentação, e comprovaram que tanto a variação da cepa utilizada como a variação do processo fermentativo produziram gomas com características qualitativas e quantitativas diferentes.

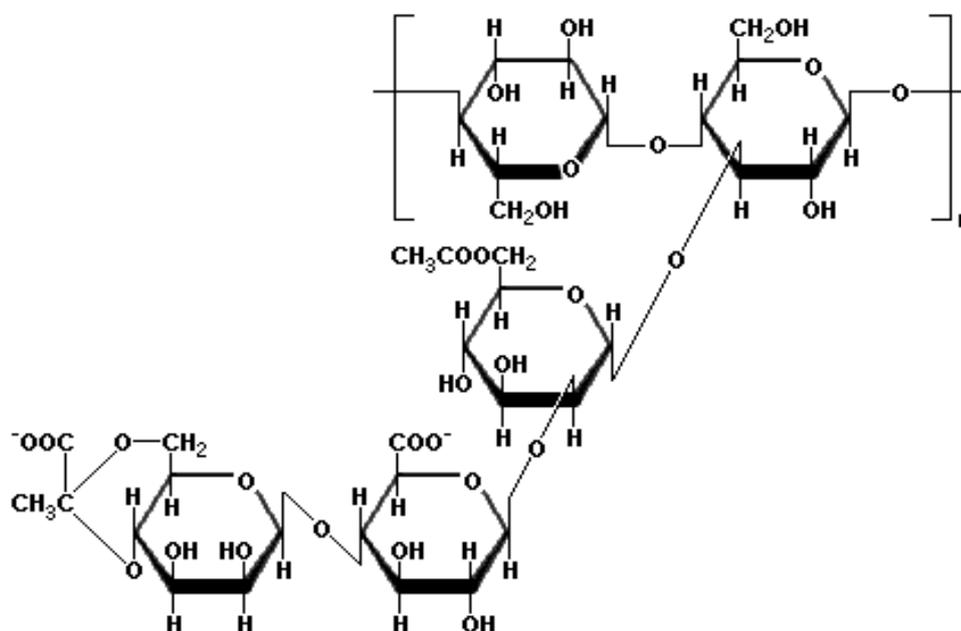
Moreira *et al.* (2001) promoveram o *screening* de 18 tipos de *Xanthomonas campestris* *pv. pruni* também em diferentes condições de meios produtivos identificados como: Meio de Produção I (MPI) - 1,5 g/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 2,5 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,6 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2,0 g/L ácido cítrico; 5,0 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,006 g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2,0 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,0024 g/L  $\text{FeCl}_3$ ; 0,002 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,002 g/L  $\text{ZnSO}_4$  e 50,0 g/L sacarose; Meio de produção II (MPII) - 1,5 g/L  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; 2,5 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,2 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e 50 g/L sacarose; concluindo que os polímeros obtidos por todas as cepas possuíam composição semelhante (glicose, manose, ácido glicurônico e ramnose) porém, com concentrações moleculares diferentes, mostrando que a variação dos nutrientes ou em suas concentrações interferem na reologia da goma produzida, bem como em sua produção.

### 2.3 GOMA XANTANA

A goma xantana pode ser considerada como um hetero e pentassacarídeo por possuir em seu esqueleto principal duas unidades de D-glicose, duas de D-manose e uma de ácido glicurônico, como pode ser visto na Figura 2 (ROSALAM e ENGLAND, 2006; REHM, 2009). A composição química deste biopolímero também pode conter outros constituintes ligados às suas ramificações como: grupamentos acetil e resíduos de piruvato. Além disso, estudos anteriores demonstram uma variação de concentração entre os constituintes químicos em gomas xantanas derivadas de cepas diferentes. García-Ochoa *et al.* (2000) relataram a média da composição centesimal dos polissacarídeos produzidos por cinco espécies de *Xanthomonas* (*Xanthomonas campestris*, *X. fragaria* 1822, *X. gummisudans* 2182, *X.*

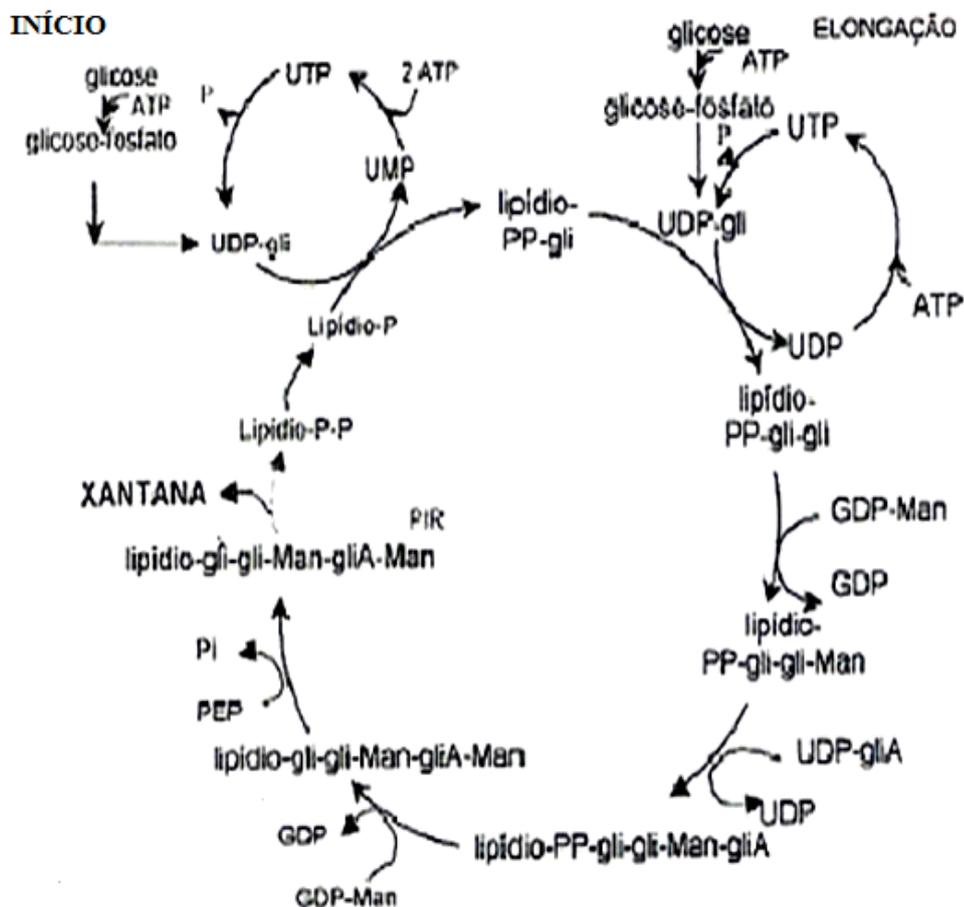
*juglands* 411, *X. phaseoli* 1128), onde foi observado variações de D-Glicose (24,6 a 30,9), de D-Manose (26,1 a 30,7), de Ácido Glicurônico (14,0 a 17,9), de Piruvato (1,8 a 7,1) e de Acetato (5,5 a 10,0).

Sua estrutura terciária é helicoidal, o que pode proporcionar a ela uma alta viscosidade e alta estabilidade em baixas concentrações. A goma xantana possui alta massa molar natural, de 2 a 20 x 10<sup>6</sup> Da (Daltons), podendo variar de acordo com o processo fermentativo e com a linhagem utilizada. Soluções de goma xantana são estáveis em uma ampla faixa de concentração de sal (até aproximadamente 150 g/L de NaCl), em temperaturas até 90°C e numa variação de pH entre 2 e 11 (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; ROSALAM e ENGLAND, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2008).



**Figura 2:** Esqueleto principal da goma xantana (ROSALAM e ENGLAND, 2006)

A biosíntese da goma xantana é bastante similar à síntese de exopolissacarídeos de outras bactérias Gram-negativas. Sendo que seu processo pode ser dividido em partes: obtenção de açúcares simples e conversão em derivados nucleotídicos, ligação dos pentassacarídeos ao poliprenol da membrana celular através de ligações difosfato, polimerização das unidades repetidas de pentassacarídeos e excreção do polímero (ROSALAM e ENGLAND, 2006). Um esquema de biossíntese da goma xantana pode ser visto na Figura 3.

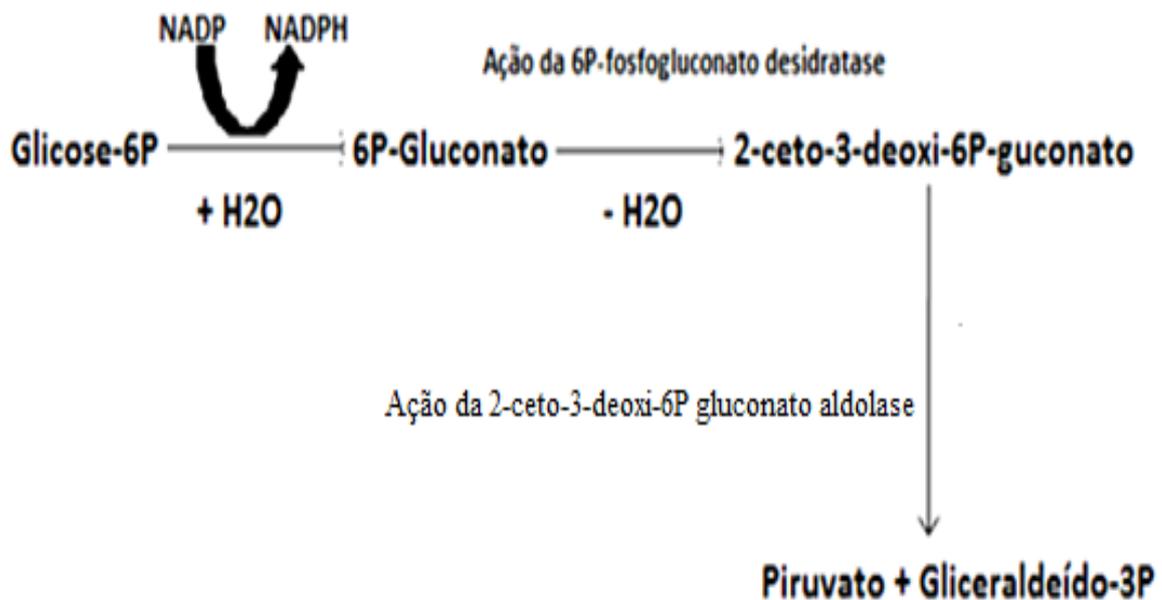


**Figura 3:** Biossíntese da goma xantana. UMD, UDP e UTP: Uridina Mono, Di e Trifosfato; GliA: Ácido Glicurônico; GDP: Guanosina Difosfato (DAWES e SUTHERLAND, 1992 *apud* Canuto, 2006)

A oxidação da glicose, para utilização dos pentassacarídeos, na biossíntese do exopolissacarídeo da *Xanthomonas* é realizada pela via Entner-Doudoroff e a formação de ATPs e NADPs envolvidos no processo biossintético são derivados do ciclo das pentoses. O ciclo das pentoses também encaminha uma pequena porção de glicose para o desenvolvimento do processo de formação do polissacarídeo (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; ROSALAM e ENGLAND, 2006; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

O mecanismo de Entner-Doudoroff (ED), principal via utilizada pela *Xanthomonas*, promove a desidrogenação da glicose-6P até 6P-gluconato sob presença de NADP e água. Em seguida, a molécula 6P-gluconato é convertida em uma molécula de gliceraldeído-3P e uma

de piruvato, através da ação das enzimas desidratase e aldolase. Em seguida, essa molécula de gliceraldeído-3P também é convertida em piruvato. O esquema do processo de Entner-Doudoroff pode ser visto na Figura 4 (BORZANI *et al.*, 2001).



**Figura 4:** Processo de Entner-Doudoroff (BORZANI *et al.*, 2001)

A síntese da xantana é codificada pelos genes do *gumBCDEFGHIJKLM*, que situam-se em um único conjunto do gene de 12kb expressos principalmente como um *operon* de um promotor acima do primeiro gene, *gumB*. A síntese da xantana fica situada na membrana polarizada, onde as unidades de repetição pentassacarídicas, glicose-glicose-manose-ácido glicurônico-manose, são construídas dos açúcares do nucleotídeo com auxílio de um transportador lipídico e do poliprenol da membrana. Este processo é favorecido pelas enzimas glicosiltransferases codificadas pelos genes D, M, H, K, e I da goma. A biossíntese da xantana também depende dos precursores dos açúcares do nucleotídeo, UDP-glicose, GDP-manose, e UDP-glicurônico, este último que é gerado pela oxidação da UDP-glicose. Os genes *xanA* e *xanB* codificam enzimas funcionais que catalisam reações da síntese da UDP-glicose e da GDP-manose, enquanto os processos de exportação e de polimerização não são bem compreendidos geneticamente (VORHÖLTER *et al.*, 2008).

## 2.4 PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA

Para produção da goma xantana, é necessário estudar detalhadamente cada passo que será dado no processo. A escolha da linhagem bacteriana, o meio de produção (substrato), condições do meio (temperatura, pH, oxigenação), tipo de fermentação (biorreator ou agitador), mecanismo de recuperação da goma e método de secagem da xantana também interferem diretamente na quantidade e na qualidade da goma produzida (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

### 2.4.1 MEIO DE PRODUÇÃO

O meio de fermentação para produção da goma xantana consiste geralmente em glicose ou sacarose como fonte de carbono, extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio e alguns minerais. Células bacterianas diferentes podem exigir, para o seu melhor desenvolvimento produtivo, meios nutritivos diferentes. Essas alterações no meio de crescimento (substratos e nutrientes limitantes) podem influenciar na composição química da goma produzida por *Xanthomonas*, principalmente na composição das ramificações (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

O fornecimento de nitrogênio no meio de produção da goma xantana pode ocorrer nas formas orgânicas ou inorgânicas, a razão Carbono:Nitrogênio (C:N) usada no meio de produção deve ser menor que a usada durante o crescimento. Essa relação C:N no meio de cultura tem grande influência na produção da goma xantana. Uma elevada concentração de nitrogênio é necessária para um rápido crescimento celular, no entanto, quando a concentração de nitrogênio no meio se torna muito elevada, a goma xantana produzida apresenta propriedades reológicas inadequadas. Há relatos indicando uma melhor piruvatização na estrutura da goma quando se utiliza um fornecimento orgânico de nitrogênio (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; CASAS *et al.*, 2000). O glutamato, nitrato de sódio e nitrato de amônio podem servir como fontes de nitrogênio no meio fermentativo, sendo o glutamato considerado como a melhor fonte de nitrogênio. Além do nitrogênio, o fósforo e o magnésio influenciam o crescimento de células de *Xanthomonas* e o enxofre favorece a produção da goma (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Convencionalmente, se utiliza sacarose ou glicose como fonte principal de carbono. Zhang e Chen (2010) produziram goma xantana a partir de xilose e glicose e relataram que a glicose foi a fonte de carbono preferida para produção de goma xantana. Lo *et al.* (1997) e Gumus *et al.* (2010) também preferiram utilizar glicose como a principal fonte de carbono. Entretanto, diversos autores utilizam a sacarose como fonte de carbono padrão (ANTUNES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2009; ROTTAVA *et al.*, 2009).

Fontes de carbono alternativas também podem ser utilizadas com o intuito de, principalmente, viabilizar os custos de produção. Silva *et al.* (2009) utilizaram, para produção de goma xantana, soro de leite como principal fonte de carbono e realizaram, também, variações na concentração das fontes de magnésio, enxofre, fósforo e potássio com os sais  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $K_2HPO_4$ . Obtiveram 25 g/L como produção máxima de goma xantana após 72 horas com as concentrações 0,1% (m/v) de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 2,0% (m/v) de  $K_2HPO_4$  e soro de leite como principal fonte de carbono.

Nery (2008) e Silva *et al.* (2009) enfatizaram que o soro de leite apresentou-se como uma fonte de carbono promissora para produção de goma xantana. Entretanto, para este tipo de meio, alguns problemas são encontrados, como a baixa capacidade de utilização da lactose pelas bactérias *Xanthomonas campestris*, fato que se deve à pouca expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase da bactéria e por conseqüência, baixa formação de glicose e galactose. Além disso, os autores também mostraram que a coloração do biopolímero, precipitado e seco, variou de acordo com a fonte de carbono utilizada o que pode ser prejudicial a depender da utilização final da goma.

A produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* ATCC 1395 com melão de beterraba como fonte de carbono foi estudada por Kalogiannis *et al.* (2003) chegando a uma produção de 53 g/L de goma. A produção de xantana utilizando como meio alternativo o soro de mandioca também foi bastante satisfatória principalmente do ponto de vista quantitativo, tendo como maior rendimento de bioconversão a produção de 13,83 g/L de goma utilizando o meio alternativo de soro de mandioca, comparado com 4,21 g/L de produção da goma em meio convencional. Tal meio alternativo também proporcionou um biopolímero com característica reológica superior ao biopolímero produzido no meio convencional (BRANDÃO *et al.*, 2010).

O caldo de cana-de-açúcar também pode ser utilizado para produção de goma xantana. Faria *et al.* (2010) realizaram o processo produtivo de goma xantana utilizando caldo de cana

(15 g/L a 40 g/L) como fonte de carbono no meio fermentativo em biorreator (Biostat-B, Sartorius, Germany) com capacidade para 4 L. Com isso, observaram que a variação da concentração inicial da fonte de carbono influenciou na produtividade da goma xantana, uma vez que quando iniciaram o processo com uma concentração de sacarose derivada da cana de açúcar de 40 g/L a produção máxima de goma foi de aproximadamente 14,0 g/L, sendo que quando a concentração inicial foi de 27,0 g/L a produção chegou a aproximadamente 16,0 g/L.

#### **2.4.2 PROCESSO FERMENTATIVO**

Metabolismo é o conjunto de reações químicas de degradação (catabolismo) e de síntese (anabolismo) de substâncias por um organismo, liberando e consumindo energia respectivamente. Respiração e fermentação são as principais vias catabólicas. Nessas vias, a quantidade de energia liberada e os produtos finais diferem se a oxidação do composto orgânico for total ou parcial. Na glicólise, a glicose é degradada a uma molécula de três carbonos, o piruvato. Em presença de oxigênio, a entrada do piruvato no ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa permitem a quebra total da glicose em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, liberando uma grande quantidade de energia sob a forma de ATP, respiração aeróbia (PELCZAR *et al.*, 2004).

A fermentação em cultivo submerso para produção de goma xantana possibilita a exposição completa da superfície bacteriana no meio facilitando as trocas metabólicas. Desta forma, pode-se considerar este processo como sendo de fácil controle, possibilitando a variação do meio de cultivo, fácil esterilização do meio, aeração estéril menos dispendiosa, entre outras vantagens. Além disso, o processo de fermentação pode ser efetuado de maneira descontínua ou contínua. No processo descontínuo ou em batelada, o cultivo das bactérias é adicionado ao meio contendo os substratos necessários ao desenvolvimento do microrganismo e são fornecidas as condições ideais para que as reações ocorram até atingir o valor máximo de produção, enquanto que em uma fermentação contínua, onde o cultivo das bactérias é realizado de forma constante dentro de um reator com entrada de substrato e saída de produto, um problema comum a ser detectado é a permanência de restos celulares que dificultam a filtração da goma produzida. Em escala laboratorial, a produção de goma xantana pode ser

realizada em agitadores orbitais ou em biorreatores. Nos agitadores orbitais controla-se diretamente apenas a temperatura, o tempo e a agitação do processo fermentativo; enquanto que em biorreatores, o controle é mais rigoroso sendo possível monitorar outros parâmetros como pH e a concentração de oxigênio dissolvido (TAIT *et al.*, 1986; ROSALAM e ENGLAND, 2005).

Para Schmidell *et al.* (2001), biorreatores, reatores bioquímicos ou reatores biológicos são reatores químicos nos quais ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por biocatalisadores, que podem ser de origem enzimática ou de células vivas (microbianas, animais ou vegetais). Há uma grande variedade de configurações possíveis para os biorreatores, porém os mais amplamente empregados industrialmente são os reatores agitados mecanicamente (STR: “stirred tank reactor”). Esses reatores possuem tanque cilíndrico equipado com chicanas (“baffles”) para evitar a formação de vórtices durante a agitação do líquido, possuem agitador, com uma série de turbinas ao longo de sua altura, que deve estar num eixo central ao fermentador.

A agitação e a aeração estão entre os principais parâmetros necessários para evitar condições de anaerobiose decorrentes da alta viscosidade do meio pela formação do polissacarídeo, e limitação na transferência de oxigênio ou condições de estresse hidrodinâmico, uma vez que a bactéria usada em processos de obtenção de goma xantana é considerada estritamente aeróbia. Em sistemas não-newtonianos, como na fermentação para produção de goma xantana, a agitação é mais significativa para a transferência de oxigênio do que a aeração (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Para produção de goma xantana é necessário manter os parâmetros como temperatura, pH e oxigenação de acordo com as necessidades de crescimento da *Xanthomonas*. A temperatura favorável para produção da goma varia de 25 a 30°C, sendo considerada 28°C a temperatura ideal. O pH deve ser mantido próximo à neutralidade entre 6,0 e 8,0. E, a oxigenação do meio deve girar em torno de 1,5 a 3,5 mM O<sub>2</sub>/L/min (CASAS *et al.*, 2000; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Para auxiliar no processo de aeração, é necessário manter um nível alto de agitação. Quando são utilizadas baixas velocidades de agitação, com a produção da goma o meio passa a ter uma viscosidade elevada promovendo limitação de oxigênio às células bacterianas. A manutenção do pH pode ser realizada introduzindo sais tamponantes no meio fermentativo, como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

### 2.4.3 RECUPERAÇÃO DA GOMA

As etapas de recuperação da goma xantana envolvem a remoção de células microbianas, a precipitação do biopolímero, a secagem e a moagem. O método específico de purificação depende da intenção de uso final do polissacarídeo. No caso específico para os bioprodutos obtidos de bactéria *Xanthomonas*, após a fermentação do meio o caldo pode ser submetido ao tratamento térmico para inativação do microorganismo, aumentar a remoção de xantana das células, inativar enzimas como celulasas e melhorar as propriedades reológicas da xantana. A realização da filtração ou da centrifugação é necessária quando a presença das células pode prejudicar sua utilização (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Entretanto, o tratamento do caldo fermentado em altas temperaturas frequentemente causa degradação térmica do exopolissacarídeo microbiano. Quando o caldo é tratado sob condições apropriadas (80 – 130°C, 10 – 20 min), a dissolução da goma xantana ocorre sem degradação térmica, e o rompimento das células é observado. O aumento da temperatura também diminui a viscosidade do meio, facilitando a remoção dos insolúveis por centrifugação ou filtração (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009).

Segundo o mesmo autor, a precipitação do polímero é realizada por diminuição da solubilidade do colóide dissolvido, usando métodos tais como adição de sais, de solventes miscíveis em água e concentração por evaporação. A precipitação com solventes orgânicos (etanol e o isopropanol), com misturas de álcool e sais e, com sais trivalentes e tetravalentes também é comum. Porém, de todas essas técnicas, a que normalmente é mais usada é a de precipitação com álcool, principalmente etanol e isopropanol. Contudo, vale ressaltar que os custos para a recuperação do álcool e as perdas inevitáveis contribuem significativamente para o custo total de produção.

A quantidade de solvente necessário para promover a precipitação da goma depende da força iônica presente no meio e da composição do polímero. A recuperação da goma utilizando solventes já proporciona a eliminação de componentes indesejáveis solúveis no solvente, sendo, portanto, uma purificação parcial do biopolímero. Após a precipitação, pode ser realizada uma nova diluição da goma em água ultrapura e reprecipitação para remoção de resíduos celulares, microgéis, resíduos orgânicos e pigmentos. Ou ainda, a purificação pode ser realizada utilizando a técnica de diálise, métodos cromatográficos ou através da adição de

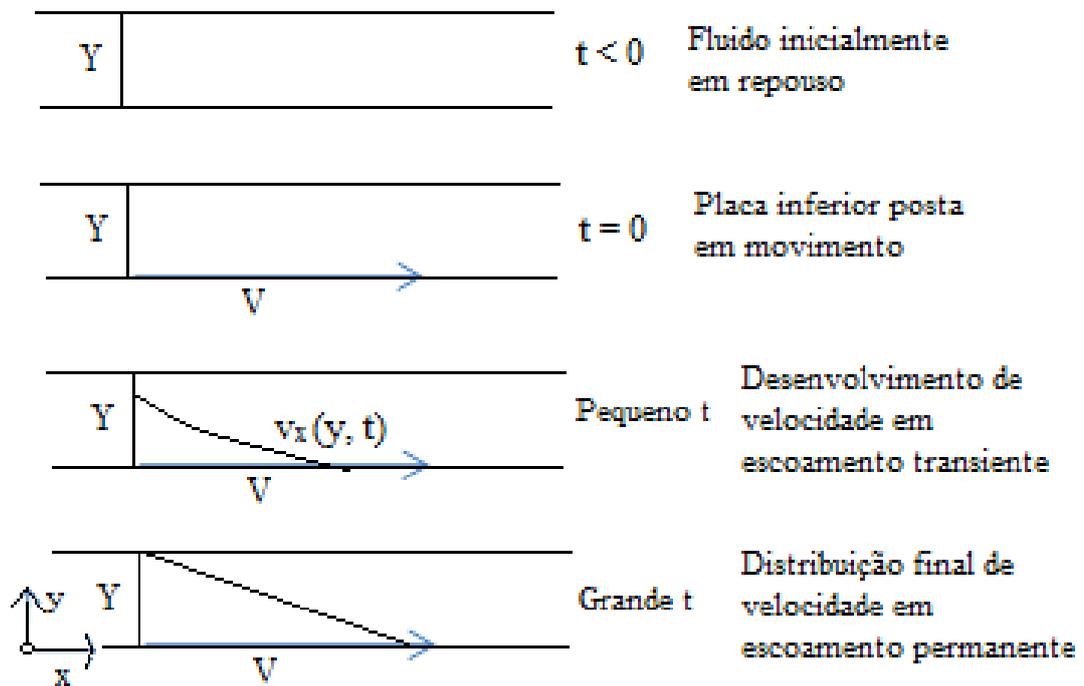
agentes químicos para a devida remoção dessas impurezas. Seguindo a precipitação e purificação a goma deve ser seca por processo de liofilização ou secagem em estufa (ROSALAM e ENGLAND, 2006; SILVA *et al.*, 2009).

## 2.5 QUALIDADE DA GOMA

### 2.5.1 PROPRIEDADES REOLÓGICAS

As variações no processo de produção da goma xantana podem influenciar diretamente na composição da goma e, conseqüentemente, nas qualidades reológicas do produto. A goma xantana é estável em ampla faixa de temperatura (10°C a 90°C), após a esterilização (120°C/30 min) de produtos alimentícios contendo diferentes gomas, apenas 10% da viscosidade é perdida em produtos que contêm a goma xantana, redução inferior a observada nos produtos que contêm outros hidrocolóides, como a goma guar, alginato e carboximetilcelulose (LUVIELMO e SCAMPARINI, 2009).

Na reologia de sólidos, a propriedade de maior interesse é a elasticidade ao passo que, em líquidos, a viscosidade é a propriedade mais importante. A viscosidade de um material pode ser definida como a propriedade física dos fluidos que caracterizam a sua resistência ao escoamento. A Figura 5 exemplifica a viscosidade mostrando um par de placas paralelas, cada uma com uma área “A”, separadas por uma distância “Y” e entre elas, um fluido qualquer. O sistema inicia-se em repouso, porém num dado tempo “t=0” a placa inferior movimenta-se na direção positiva de “x” a uma velocidade constante “V”. Com o decorrer do tempo, o fluido ganha movimento até a obtenção de uma velocidade permanente passando a escoar de forma laminar. Ao finalizar o movimento permanente, uma força “F” é necessária para manter o movimento na placa inferior. Logo, sugere-se que a força deve ser proporcional à área e à velocidade e inversamente proporcional à distância entre as placas. Além disso, deve ser empregada uma constante de proporcionalidade, a qual deve ser dotada da viscosidade “ $\mu$ ”. Neste caso, a equação sugerida para determinação da viscosidade é vista na Eq. 1 (BIRD *et al.*, 2004).



**Figura 5:** Desenvolvimento de perfil laminar permanente de velocidade para um fluido contido entre duas placas

$$\mu = \frac{F.Y}{A.V} \quad (\text{Eq. 1})$$

Fluidos não-newtonianos, como a goma xantana, podem ser classificados à medida que a viscosidade aparente ( $\eta_{ap}$ ) varia com a taxa de deformação, ou seja, se ela aumenta ou diminui com o aumento da taxa de deformação. Soluções de biopolímeros com propriedades reológicas interessantes do ponto de vista industrial geralmente exibem propriedades pseudoplásticas, viscoelásticas além de elevada tensão residual, como observado na goma xantana. Entretanto a determinação da viscosidade aparente em solução de baixa concentração é parâmetro simples para se avaliar o potencial de aplicação de um biopolímero (WHITCOMB *et al.*, 1977).

A viscoelasticidade pode aparecer em alguns sistemas que apresentem comportamento real de sólido e líquido. Para um material viscoelástico, uma parcela de tensão aplicada pode ser recuperada parcialmente por conta das propriedades elásticas e o restante da tensão pode ser dissipado devido às propriedades viscosas. A pseudoplasticidade é um fenômeno dependente do tempo que acontece em materiais poliméricos e caracteriza-se pela diminuição da viscosidade à medida que se aumenta a taxa de deformação aplicada no sistema. A tixotropia é identificada pelo decréscimo da viscosidade aparente do líquido com o tempo de aplicação de uma dada taxa de deformação, enquanto o comportamento reopético é identificado com o aumento da viscosidade aparente ao passar do tempo (JACUÁ, 1985).

A goma xantana pode modificar o seu comportamento reológico a depender da sua estrutura química, ou seja, varia a depender das suas condições operacionais. Características que podem ser encontradas na goma xantana são a pseudoplasticidade e a viscoelasticidade (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; ROTTAVA *et al.*, 2009).

O tratamento térmico e a adição de Cloreto de Sódio (NaCl) no processo fermentativo podem influenciar diretamente na qualidade reológica da goma xantana devido à diminuição da repulsão eletrostática entre as cadeias da sua estrutura. Entretanto, pode ser visto em alguns casos que a viscosidade de soluções de xantana pode ser aumentada na presença de sais e em outros casos, a viscosidade tem uma moderada diminuição. Contudo, é importante ressaltar que a reologia da goma depende diretamente da sua estrutura química que por sua vez é influenciada pela cepa bacteriana utilizada, por todo o processo de fermentação e de recuperação (CAPRON *et al.*, 1998; MOREIRA *et al.*, 2001; CHOPPE *et al.*, 2010).

# Capítulo 3

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os materiais e métodos utilizados na etapa experimental deste trabalho com o objetivo de produzir goma xantana a partir de açúcar demerara por diferentes linhagens de *Xanthomonas*. Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Laboratório de Biomateriais, LBMat; e Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, LEB) situado no Campus Aracaju-Farolândia/SE da Universidade Tiradentes (ITP/UNIT).

### 3.1 MICRORGANISMO

Neste estudo foram utilizadas três linhagens do gênero *Xanthomonas*, todas obtidas a partir da Coleção de Culturas do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (LBMat/ITP):

- *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290
- *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472
- *Xanthomonas* sp S6

Durante a manipulação dos microrganismos, todos os materiais empregados nos ensaios foram previamente esterilizados por meio de vapor úmido (em autoclave) a temperatura de 121°C por um período de 20 minutos. Os meios de cultivo e de fermentação foram também esterilizados nesta mesma condição.

A manutenção das cepas foi realizada em meio solidificado YM (*Yeast Malt*) na seguinte composição: 3 g/L de extrato de malte, 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 10 g/L de sacarose e 20 g/L de agar. Os repiques foram realizados a cada 30 dias em condições assépticas (sobre fluxo laminar) permanecendo 24 horas em estufa bacteriológica a 28°C e armazenados a  $\pm 4^\circ\text{C}$ . A fim de verificar algumas características morfológicas das colônias, foram realizados ensaios de coloração de Gram e semeadura em estrias, em agar YM.

### 3.2 PREPARO DO INÓCULO

Para preparo do inóculo, inicialmente retirou-se uma alçada de cultura crescida sobre agar YM incubada em estufa a 28°C por 24 h, para ser dissolvida em 2 mL de meio líquido YM (3 g/L de extrato de malte, 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona e 10 g/L de sacarose), sendo este procedimento realizado para um volume total de 28 mL presente em um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL. Para auxílio na dissolução, o frasco foi incubado em agitador orbital, com agitação de 180 rpm a uma temperatura de 28°C durante 10 min.

Transcorrido este período, cada 1 mL do meio contendo a cultura foi transferido para 14 mL de meio líquido YM presente em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL, sendo mantidos em agitação (*shaker* vertical) de 100 rpm a 28°C por 24 horas. Após esse período, foi realizada a leitura em espectrofotômetro averiguando a densidade óptica a 560 nm equivalente a uma  $DO_{560\text{ nm}} = 1,95$  correspondente a uma concentração celular de  $10^{11}$  UFC/mL.

### 3.3 PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA

A produção de goma xantana ocorreu em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL, sendo em um volume total correspondente a 100 mL, volume este obtido após mistura de todo conteúdo de cada preparo de inóculo (14 mL, item 3.2) em 85 mL de meio fermentativo. A condição usada para a obtenção de goma foi de 180 rpm a 28°C por 96 horas, independentemente da cepa usada.

O meio fermentativo variou quanto à sua fonte principal de carbono, sacarose ou açúcar demerara, e quanto às concentrações de sais, sulfato de magnésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) e fosfato dibásico de potássio ( $K_2HPO_4$ ). Além destes constituintes, o meio fermentativo foi composto também pelos seguintes sais:  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $H_3BO_3$ ,  $FeCl_3$ ,  $CaCl_2$  e  $ZnSO_4$ .

### 3.4 METODOLOGIA ESTATÍSTICA APLICADA AOS EXPERIMENTOS

Para aplicação da metodologia estatística foi usado o método denominado por Planejamento Composto Central (*Central Composite Design* – CCD) com cinco repetições do ponto central, visando variar o tipo e a quantidade de fonte de carbono, bem como a concentração de sais  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $K_2HPO_4$ :

- i. sacarose ou açúcar demerara;
- ii. concentração de substrato de 30, 50 e 70 g/L;
- iii. concentração de  $K_2HPO_4$  de 0,2, 0,6 e 1,0 g/L;
- iv. concentração de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  de 0,01, 0,5 e 1,0 g/L.

Visando a otimização do fator de conversão de substrato para goma xantana em 96 h de processo fermentativo, foi realizado um planejamento experimental  $2^3$  com cinco repetições do ponto central para cada cepa. Desta forma, as variáveis foram codificadas de acordo com a Equação 1 para o cálculo estatístico.

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:  $x_i$  é o valor da variável independente codificada,  $X_i$  é o valor da variável independente real,  $X_0$  é o valor da variável independente real sobre o ponto central e  $\Delta X_i$  é a variação do valor da variável real.

Sendo assim, os níveis das variáveis investigadas neste estudo estão apresentados na Tabela 4. A produção de goma xantana (Y) foi tomada como variável dependente ou resposta dos experimentos enquanto as variáveis independentes foram as concentrações de sacarose ou açúcar demerara,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $K_2HPO_4$ . Para avaliar o efeito das variáveis na resposta, produção de goma xantana, foi utilizado o programa *Statística 8*.

**Tabela 4:** Planejamento fatorial  $2^3$  das variáveis açúcar demerara ou sacarose,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  para produção de goma xantana.

Cepas	Variáveis independentes (concentração em g/L)	Símbolos	Nível		
			-1	0	+1
290 <sup>a</sup>	sacarose ou açúcar demerara	$x_1$	30	50	70
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$x_2$	0,2	0,6	1,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$x_3$	0,01	0,50	1,00
472 <sup>b</sup>	sacarose ou açúcar demerara	$x_1$	30	50	70
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$x_2$	0,2	0,6	1,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$x_3$	0,01	0,50	1,00
S6 <sup>c</sup>	sacarose ou açúcar demerara	$x_1$	30	50	70
	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$x_2$	0,2	0,6	1,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$x_3$	0,01	0,50	1,00

<sup>a</sup> *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290

<sup>b</sup> *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472

<sup>c</sup> *Xanthomonas* sp S6

### 3.5 RECUPERAÇÃO DA GOMA XANTANA

Em todo experimento de obtenção da goma xantana, utilizando-se das variáveis citadas anteriormente, ao final de 96 horas de processo todo o conteúdo foi coletado para a determinação da concentração de biomassa e de produto obtido (goma), segundo procedimentos baseados em Moreira *et al.* (2001) e Rottava *et al.* (2009).

Deste modo, amostras correspondentes a 100 mL de meio contida em cada frasco foram inicialmente centrifugadas a uma rotação de 5.000 rpm a 10°C durante 20 minutos para devida remoção celular do caldo fermentativo que por sua vez possuía a goma ainda na forma dissolvida. A biomassa obtida foi separada do sobrenadante, ressuspensa em água destilada, novamente centrifugada e seca em estufa (105°C) até peso constante em placas de vidro (placas de *Petri*). No sobrenadante foi adicionado álcool 92,8% na proporção de 1:3 (v/v) visando a precipitação da goma xantana. O precipitado foi encaminhado à estufa a 30°C, até sua secagem completa sendo posteriormente analisado quanto a sua massa em balança analítica.

### 3.6 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Visando melhor entendimento analítico dos resultados, abaixo é apresentada a metodologia empregada para cálculo do parâmetro fermentativo de produtividade:

Produtividade volumétrica em goma xantana (g/L.h):

$$Pr = \Delta P / \Delta t = (P - P_0) / t$$

onde:

$P_0$  e  $P$  = concentração inicial e final, no tempo  $t$  de goma xantana (g/L)

$t$  = tempo ou intervalo de tempo desejado (h)

# Capítulo 4

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

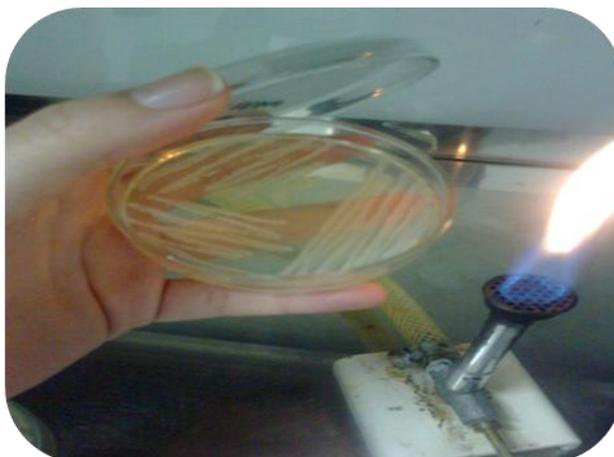
Neste item serão mostradas as características morfológicas da goma xantana obtida bem como o fator de produção e produtividade com o foco direcionado as significâncias das variáveis independentes de processo avaliadas. Para isto, a primeira etapa do estudo abordou a avaliação e manutenção das linhagens de *Xanthomonas* sp estudadas. A segunda etapa estudou processos fermentativos a partir do crescimento dos microrganismos evidenciando a seleção da melhor linhagem para um perfil produtivo, enquanto a última etapa avaliou de forma estatística as variáveis significativas ao produto de obtenção de goma xantana.

### 4.1 MORFOLOGIA DAS COLÔNIAS BACTERIANAS

No plaqueamento das culturas em ágar YM, colônias de coloração branco-amareladas, com superfície lisa, brilhante e com aparência viscosa foram obtidas. A partir da coloração de Gram foram observadas colônias em forma de bastonete e com características Gram negativas, aspectos semelhantes também foram relatados por McNeely e Kang (1973), García-Ochoa *et al.* (2000) e Gumus *et al.* (2010). A Figura 6 apresenta colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290, uma das cepas avaliadas neste estudo.

### 4.2 PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA

A etapa de produção da goma xantana teve como intuito realizar um procedimento de seleção (*screening*) entre três linhagens de *Xanthomonas* sp, visando verificar não somente a melhor linhagem referente ao seu potencial de produção de goma xantana mas também as variáveis significativas a esse processo.



**Figura 6:** Aspecto das colônias *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290 em ágar YM após crescimento em estufa por 24 horas a 28°C.

Os experimentos foram realizados em meio YM líquido para o inóculo e meio de produção a base de sacarose ou açúcar demerara como verificado nos itens 4.2 e 4.3. Deste modo, a goma xantana solúvel obtida no sobrenadante de cada condição experimental foi determinada gravimetricamente através do peso seco após precipitação com álcool etílico, e os resultados usados como variável resposta para os respectivos planejamentos experimentais. Entretanto, a aparência viscoelástica de algumas gomas pôde ser notada imediatamente após as precipitações, demonstrando um poder de aderência e elasticidade, conforme ilustração apresentada na Figura 7.



**Figura 7:** Goma xantana produzida no meio contendo as variáveis deste estudo referentes ao ponto central e sacarose como fonte de carbono, utilizando a cepa *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472.

As Tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 apresentam os valores da produção de goma xantana referente às três cepas estudadas conforme matriz de planejamento fatorial  $2^3$  com cinco repetições do ponto central.

**Tabela 5:** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290 e sacarose como fonte principal de carbono.

Ensaio	Sacarose (g/L)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Biomassa (g/L)
1	-1 (30,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,2993	0,003118	0,1123
2	-1 (30,0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	0,5166	0,005381	0,2167
3	-1 (30,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,5992	0,006242	0,2587
4	-1 (30,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,2847	0,002966	0,1623
5	+1 (70,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,2784	0,002900	0,1079
6	+1 (70,0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	0,6840	0,007125	0,2935
7	+1 (70,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,1127	0,001174	0,0883
8	+1 (70,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,1454	0,001515	0,0692
9	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,4926	0,005131	0,2103
10	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,2859	0,002978	0,1179
11	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,4182	0,004356	0,2068
12	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,2750	0,002865	0,1006
13	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,3010	0,003135	0,4218

**Tabela 6:** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290 e açúcar demerara como fonte principal de carbono.

Ensaio	Açúcar demerara (g/L)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Biomassa (g/L)
1	-1 (30,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,3192	0,003325	0,1672
2	-1 (30,0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	0,2465	0,002568	0,1286
3	-1 (30,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,2070	0,002156	0,1225
4	-1 (30,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,2317	0,002414	0,0994
5	+1 (70,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,3924	0,004088	0,1672
6	+1 (70,0)	-1(0,01)	+1 (1,0)	0,2741	0,002855	0,1178
7	+1 (70,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,2263	0,002357	0,1032
8	+1 (70,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,1811	0,001886	0,0921
9	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,3761	0,003918	0,1577
10	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,4738	0,004935	0,2191
11	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,4273	0,004451	0,0911
12	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,3885	0,004047	0,1492
13	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,4708	0,004904	0,1939

**Tabela 7:** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com cepa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IBSBF 472 e sacarose como fonte principal de carbono.

Ensaio	Sacarose (g/L)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Biomassa (g/L)
1	-1 (30,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,2857	0,002976	0,2306
2	-1 (30,0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	0,7171	0,007470	0,4632
3	-1 (30,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,8308	0,008654	0,3578
4	-1 (30,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,2585	0,002693	0,0132
5	+1 (70,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,5254	0,005473	0,2314
6	+1 (70,0)	-1(0,01)	+1 (1,0)	1,0034	0,010452	0,3592
7	+1 (70,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,3713	0,003868	0,1426
8	+1 (70,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,4683	0,004878	0,1173
9	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,348	0,003625	0,1637
10	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,3436	0,003579	0,1006
11	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,2495	0,002599	0,1012
12	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,2326	0,002423	0,1422
13	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,2875	0,002995	0,1103

**Tabela 8:** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IBSBF 472 e açúcar demerara como fonte principal de carbono.

Ensaio	Açúcar demerara (g/L)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Biomassa (g/L)
1	-1 (30,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,3931	0,004095	0,382
2	-1 (30,0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	1,2739	0,013270	0,4962
3	-1 (30,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	1,3075	0,013620	0,4973
4	-1 (30,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,3619	0,003770	0,1471
5	+1 (70,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,3750	0,003906	0,1736
6	+1 (70,0)	-1(0,01)	+1 (1,0)	0,6109	0,006364	0,2889
7	+1 (70,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,1373	0,001430	0,0385
8	+1 (70,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,8674	0,009035	0,3975
9	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,7854	0,008181	0,3661
10	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,6200	0,006458	0,1253
11	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,4562	0,004752	0,2113
12	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,6213	0,006472	0,3421
13	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,6315	0,006578	0,2986

**Tabela 9:** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa *Xanthomonas* sp. S6 e sacarose como fonte principal de carbono.

Ensaio	Sacarose (g/L)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Biomassa (g/L)
1	-1 (30,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,1528	0,001592	0,3316
2	-1 (30,0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	0,0200	0,000208	0,312
3	-1 (30,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,9382	0,009773	0,2512
4	-1 (30,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,5968	0,006217	0,2291
5	+1 (70,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,0712	0,000742	0,2435
6	+1 (70,0)	-1(0,01)	+1 (1,0)	0,0920	0,000958	0,4542
7	+1 (70,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,0619	0,000645	0,2147
8	+1 (70,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,9255	0,009641	0,3304
9	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,4634	0,004827	0,2274
10	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,5775	0,006016	0,3046
11	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,6876	0,007162	0,2404
12	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,4677	0,004872	0,2754
13	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,7182	0,007481	0,2042

**Tabela 10:** Matriz do planejamento fatorial  $2^3$  (valores codificados e reais) com respostas de biomassa celular, produção e produtividade de goma xantana com a cepa *Xanthomonas* sp. S6 e açúcar demerara como fonte principal de carbono.

Ensaio	Açúcar demerara (g/L)	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)	Produção (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Biomassa (g/L)
1	-1 (30,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,4533	0,004722	0,2892
2	-1 (30,0)	-1 (0,01)	+1 (1,0)	0,0600	0,000625	0,2256
3	-1 (30,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	1,3839	0,014416	0,4577
4	-1 (30,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,4644	0,004838	0,2149
5	+1 (70,0)	+1 (1,0)	+1 (1,0)	0,3219	0,003353	0,3435
6	+1 (70,0)	-1(0,01)	+1 (1,0)	0,3996	0,004163	0,2430
7	+1 (70,0)	-1 (0,01)	-1 (0,2)	0,4166	0,004340	0,2847
8	+1 (70,0)	+1 (1,0)	-1 (0,2)	0,3644	0,003796	0,2353
9	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,7212	0,007513	0,3720
10	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,7488	0,007800	0,3561
11	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,6121	0,006376	0,2867
12	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,6193	0,006451	0,2989
13	0 (50,0)	0 (0,5)	0 (0,6)	0,6533	0,006805	0,3118

Pode ser observado que a maior produção de goma xantana entre as respectivas cepas foi de 0,6840 g/L para a cepa *Xanthomonas* 290 (Tabela 5), em meio contendo sacarose como fonte principal de carbono; sendo ainda obtidos valores correspondentes a 1,3075 g/L e 1,3839 g/L para as cepas *Xanthomonas* 472 (Tabela 8) e *Xanthomonas* S6 (Tabela 10), respectivamente, nestes casos em meio contendo açúcar demerara como fonte principal de carbono.

Foi verificado que as maiores produções de goma xantana para as cepas *Xanthomonas* 290 e 472, quando utilizado a sacarose como fonte principal de carbono, foram obtidas nos ensaios contendo maior nível de  $K_2HPO_4$  e sacarose. Quando utilizado o açúcar demerara como principal fonte de carbono, a cepa *Xanthomonas* 290 apresentou sua maior produção no ponto central do planejamento, enquanto a cepa *Xanthomonas* 472 apresentou produção máxima no planejamento com concentrações máximas dos sais  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e  $K_2HPO_4$  e, concentração mínima de açúcar demerara.

Conforme descrito em *Materiais e Métodos* (Capítulo 3) e visando verificar o nível de significância entre as variáveis estabelecidas, os dados obtidos junto aos experimentos anteriores (Tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10) foram avaliados estatisticamente, isto por intermédio de análise de variância (tabelas ANOVA) e realização dos testes de *Student* e *Fisher*. O teste estatístico de *Fisher* ( $F$ ) para análise de variância foi empregado para a determinação de variáveis significativas onde o grau de significância foi classificado com base no valor de  $F$ . Quanto maior for a magnitude do valor de  $F$ , por consequência, menor será o valor da probabilidade ( $p$ ) e mais significativos serão os modelos correspondentes bem como o coeficiente individual. Além disso, o valor de  $p$  serve como uma ferramenta para verificar o significado de cada um dos coeficientes, que também indica a força da interação de cada parâmetro. Os baixos valores de  $p$ , inferiores a 0,05, indicam a correlação mais significativa dos coeficientes, uma vez que quanto menor o valor  $p$  maior a significância do coeficiente correspondente (BOX, 1998). Neste trabalho, esses efeitos significativos estão representados pelos respectivos diagrama de Pareto e por análises de ANOVA, bem como por intermédio de gráficos de Superfície.

As Tabelas 11, 12, 13, 14, 15 e 16 apresentam os valores encontrados para as análises de ANOVA, sendo indicado em vermelho os fatores significativos obtidos a partir do teste de *Fisher*. Nestes fatores significativos, indicados pelo valor de  $p$  menor que 0,05, existem diferença estatisticamente comprovada entre escolher como condição para o processo de obtenção do produto o nível maior ou menor das respectivas variáveis (RODRIGUES e

IEMMA, 2005). As Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13 apresentam os efeitos absolutos das variáveis independentes utilizadas neste estudo de produção de goma xantana. Estes efeitos são mostrados pelos diagrama de Pareto, através do teste de *Student* que por sua vez demonstra a significância da variável quando seu valor é maior que o valor de  $p$  (0,05).

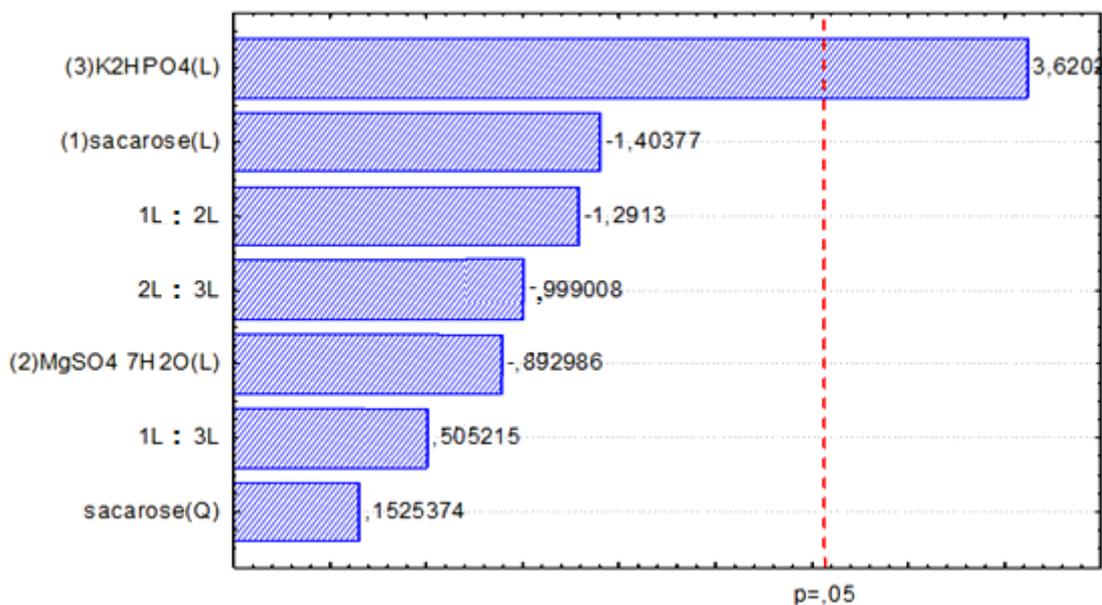
Com isso, neste trabalho, foi verificado um efeito significativo da variável  $K_2HPO_4$  com  $p < 0,05$  para as cepas *Xanthomonas* 290 (Tabelas 11 e 12; Figuras 8 e 9) e *Xanthomonas* 472 (Tabelas 13 e 14 Figuras 10 e 11) tanto no meio contendo sacarose quanto no meio contendo açúcar demerara. Para a cepa *Xanthomonas* 472 foi possível notar que a sacarose também apresentou efeito significativo (Tabela 13; Figura 10). Além disso, para os mesmos microrganismos foi evidenciado um efeito significativo da interação entre o  $K_2HPO_4$  e o açúcar demerara. A variável  $MgSO_4.7H_2O$  provocou um efeito significativo apenas na bactéria *Xanthomonas* S6 (Tabela 15; Figura 12) em meio contendo sacarose. Para esta mesma cepa, em meio contendo açúcar demerara, não foi evidenciado nenhum efeito significativo (Tabela 16; Figura 13).

Esses resultados foram significativos ao nível de confiança de 95% a partir da análise de variância, denotada pela importância do modelo quando  $p < 0,05$ . Estes resultados significativos foram confirmados pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ), com valores de  $R^2 = 0,79008$  pela cepa *Xanthomonas* 290,  $R^2 = 0,79525$  pela cepa *Xanthomonas* 472, e  $R^2 = 0,79008$  pela cepa *Xanthomonas* S6. O valor de  $R^2$  dá uma medida de quão grande variabilidade nos valores de resposta observada pode ser explicada pelos parâmetros experimentais e suas interações. Quanto mais próximos os valores de  $R^2$  a 1, melhor esta correlação. Quando expressa em percentagem,  $R^2$  implica que as variações totais de 79,0% para a produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas* 290, 79,52% pela cepa *Xanthomonas* 472 e 79,0% pela cepa *Xanthomonas* S6 são atribuídas às variáveis independentes.

**Tabela 11:** ANOVA para produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
sacarose (Q)	0,000339	1	0,000339	0,02327	0,884727
(1)sacarose (L)	0,028716	1	0,028716	1,97056	0,219346
(2)MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (L)	0,011621	1	0,011621	0,79742	0,412776
<b>(3)K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (L)</b>	<b>0,190993</b>	<b>1</b>	<b>0,190993</b>	<b>13,10634</b>	<b>0,015215*</b>
1L : 2L	0,024299	1	0,024299	1,66746	0,253072
1L : 3L	0,003720	1	0,003720	0,25524	0,634884
2L : 3L	0,014544	1	0,014544	0,99802	0,363654
Erro	0,072863	5	0,014573		
Total SS	0,347094	12			

R<sup>2</sup> = 0,79; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma Quadrática; MQ = Média Quadrática;  
 F = Teste de Fisher; p = probabilidade  
 Nível de significância: \*95%

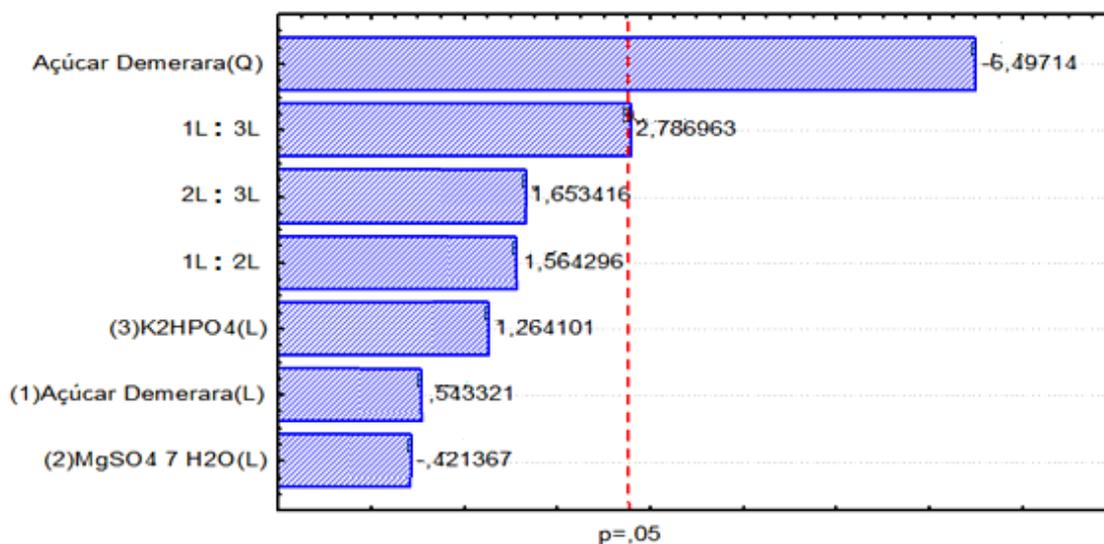


**Figura 8:** Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290

**Tabela 12:** ANOVA para produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)Açúcar demerara(L)	0,000604	1	0,000604	0,30652	0,603668
<b>Açúcar demerara(Q)</b>	<b>0,086340</b>	<b>1</b>	<b>0,086340</b>	<b>43,83216</b>	<b>0,001183*</b>
(2)MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O(L)	0,000363	1	0,000363	0,18436	0,685525
(3)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (L)	0,003268	1	0,003268	1,65925	0,254093
1L:2L	0,005005	1	0,005005	2,54089	0,171814
<b>1L:3L</b>	<b>0,015887</b>	<b>1</b>	<b>0,015887</b>	<b>8,06512</b>	<b>0,036250*</b>
2L:3L	0,005592	1	0,005592	2,83865	0,152837
Erro	0,009849	5	0,001970		
Total SS	0,126907	12			

$R^2 = 0,79$ ; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma Quadrática; MQ = Média Quadrática;  
 F = Teste de Fisher; p = probabilidade  
 Nível de significância: \*95%

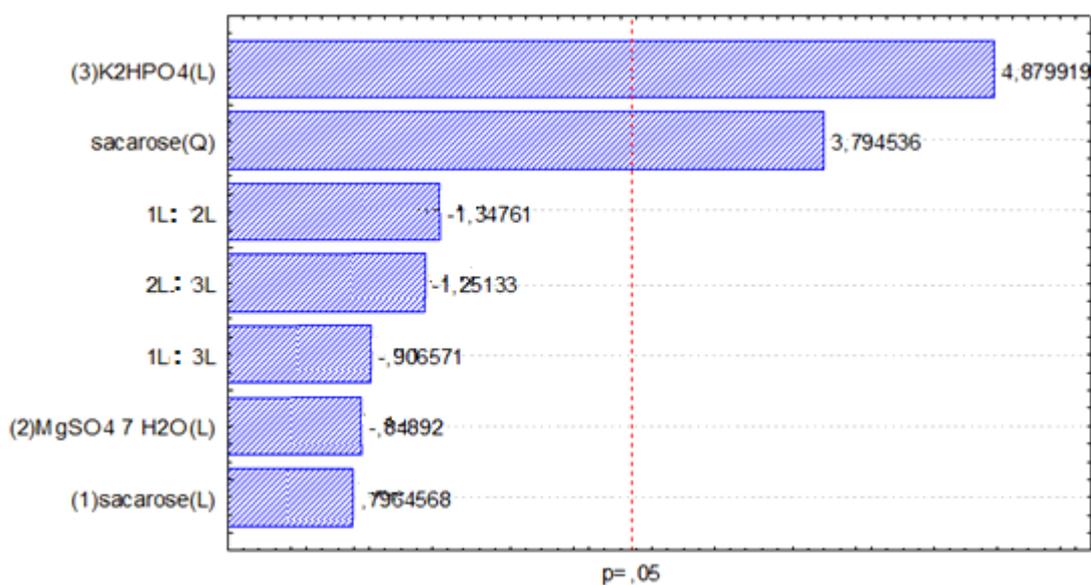


**Figura 9:** Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290

**Tabela 13:** ANOVA para produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)sacarose(L)	0,009543	1	0,009543	0,63434	0,461891
sacarose(Q)	0,216603	1	0,216603	14,39851	0,012699*
(2)MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O(L)	0,010841	1	0,010841	0,72066	0,434676
(3)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (L)	0,358239	1	0,358239	23,81361	0,004553*
1L:2L	0,027320	1	0,027320	1,81604	0,235625
1L: 3L	0,012364	1	0,012364	0,82187	0,406201
2L:3L	0,023555	1	0,023555	1,56582	0,266171
Erro	0,075217	5	0,015043		
Total SS	0,733682	12			

$R^2 = 0,7952$ ; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma Quadrática; MQ = Média Quadrática;  
 F = Teste de Fisher; p = probabilidade  
 Nível de significância: \*95%

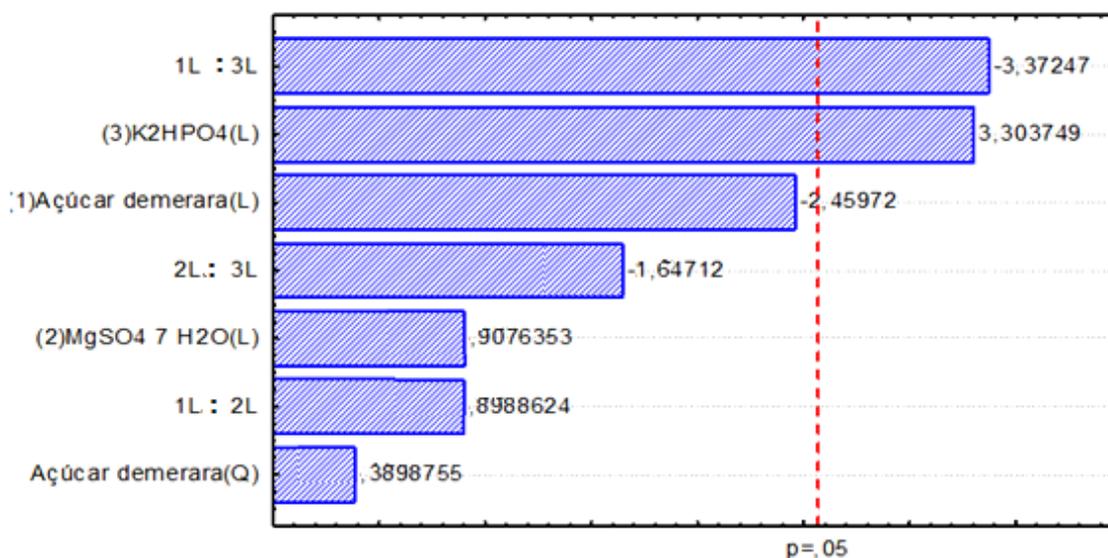


**Figura 10:** Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472.

**Tabela 14:** ANOVA para produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)Açúcar demerara(L)	0,226397	1	0,226397	6,05021	0,057248
Açúcar demerara(Q)	0,005688	1	0,005688	0,15200	0,712683
(2)MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O(L)	0,030826	1	0,030826	0,82380	0,405690
(3)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (L)	0,408427	1	0,408427	10,91476	0,021387*
1L:2L	0,030233	1	0,030233	0,80795	0,409922
1L:3L	0,425595	1	0,425595	11,37356	0,019836*
2L:3L	0,101520	1	0,101520	2,71301	0,160450
Erro	0,187099	5	0,037420		
Total SS	1,415786	12			

R<sup>2</sup> = 0,7952; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma Quadrática; MQ = Média Quadrática;  
 F = Teste de Fisher; p = probabilidade  
 Nível de significância: \*95%

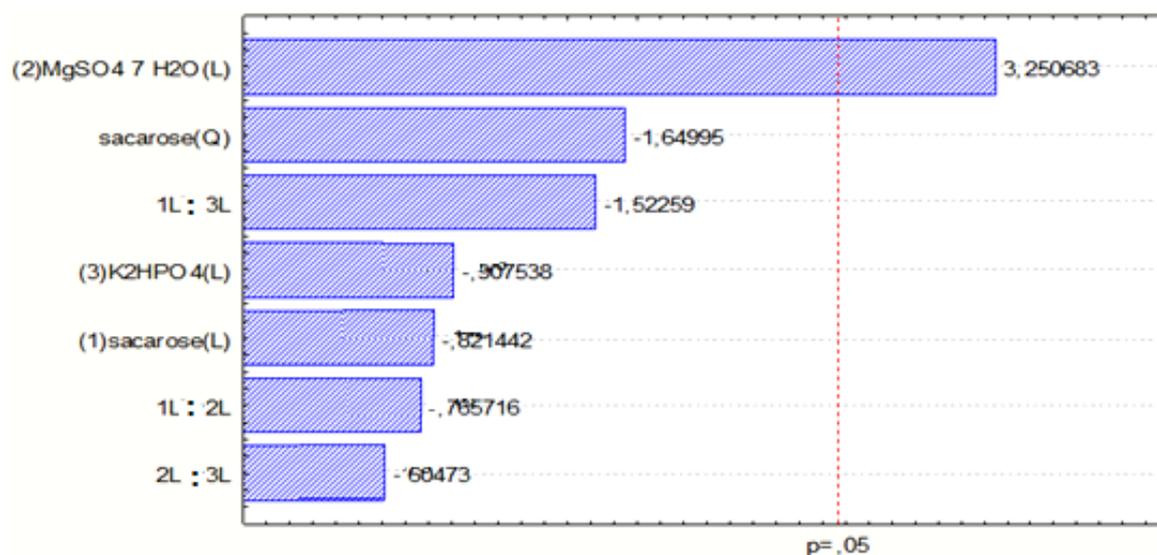


**Figura 11:** Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472.

**Tabela 15:** ANOVA para produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa *Xanthomonas* sp S6.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)sacarose(L)	0,038809	1	0,038809	0,67477	0,448775
sacarose(Q)	0,156573	1	0,156573	2,72232	0,159867
<b>(2)MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O(L)</b>	<b>0,607753</b>	<b>1</b>	<b>0,607753</b>	<b>10,56694</b>	<b>0,022679*</b>
(3)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (L)	0,047370	1	0,047370	0,82362	0,405737
1L:2L	0,033722	1	0,033722	0,58632	0,478413
1L:3L	0,133334	1	0,133334	2,31827	0,188357
2L:3L	0,021033	1	0,021033	0,36570	0,571750
Erro	0,287573	5	0,057515		
Total SS	1,326168	12			

$R^2 = 0,79$ ; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma Quadrática; MQ = Média Quadrática;  
 F = Teste de Fisher; p = probabilidade  
 Nível de significância: \*95%

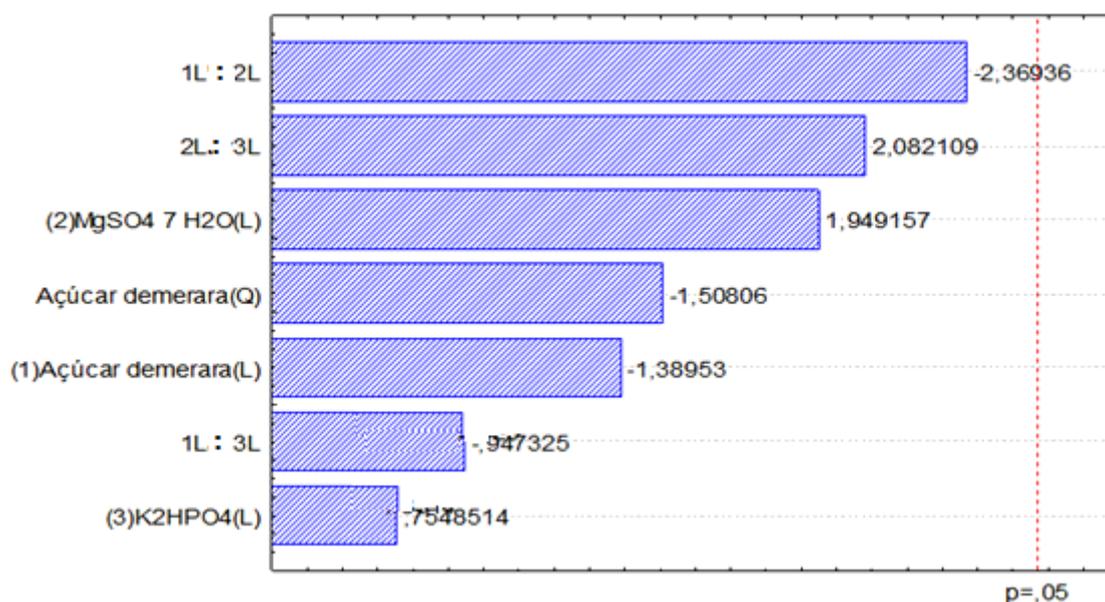


**Figura 12:** Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando sacarose para a cepa *Xanthomonas* sp S6.

**Tabela 1:** ANOVA para produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa *Xanthomonas* sp S6.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
(1)Açúcar demerara(L)	0,092257	1	0,092257	1,930789	0,223370
Açúcar demerara(Q)	0,108667	1	0,108667	2,274231	0,191908
(2)MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O(L)	0,181533	1	0,181533	3,799212	0,108788
(3)K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (L)	0,027226	1	0,027226	0,569801	0,484354
1L:2L	0,268242	1	0,268242	5,613882	0,064003
1L:3L	0,042881	1	0,042881	0,897424	0,386974
2L:3L	0,207143	1	0,207143	4,335177	0,091816
Erro	0,238909	5	0,047782		
Total SS	1,166857	12			

$R^2 = 0,79$ ; GL = Graus de Liberdade; SQ = Soma Quadrática; MQ = Média Quadrática; F = Teste de Fisher; p = probabilidade



**Figura 13:** Diagrama de Pareto dos efeitos absolutos das variáveis independentes manipuladas sobre a produção de goma xantana utilizando açúcar demerara para a cepa *Xanthomonas* sp S6.

Ainda pode-se observar que, nestes dois microrganismos, houve uma interação significativa entre o açúcar demerara e o sal  $K_2HPO_4$ . Pode-se sugerir que, para os microrganismos *Xanthomonas* 290 e 472, a utilização do açúcar demerara proporcionou um aumento exagerado de potássio provocando inibição da produção da goma. Ao observar o experimento realizado com máximo de açúcar demerara e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e, mínimo de  $K_2HPO_4$  verifica-se a segunda maior produção de goma xantana para a cepa *Xanthomonas* 472. Podendo assim concluir que o açúcar demerara pôde suprir a quantidade de potássio necessária para a produção da goma.

A cepa *Xanthomonas* S6, apresentou-se de maneira diferente das demais. Sua produção máxima foi obtida com concentração mínima das fontes principais de carbono (sacarose ou açúcar demerara). Entretanto, semelhante às outras duas cepas, apresentou sua maior produção quando os níveis de sais foram maximizados. Mesmo assim, para esta cepa, quando foi utilizado açúcar demerara como fonte de carbono não foi identificada nenhuma variável estatisticamente significativa. E, quando utilizado sacarose, apenas a variável  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  teve resultado significativo.

Os resultados de significância das variáveis deste estudo estão coerentes com os trabalhos de García-Ochoa *et al.* (2000) e Faria *et al.* (2010). García-Ochoa *et al.* (2000) relataram que o nitrogênio, o fósforo e o magnésio influenciam o crescimento microbiano aplicado na produção de goma xantana, enquanto Faria *et al.* (2010) relataram que a produção de goma xantana é favorecida pela concentração de sacarose inicial. Os efeitos significados deste trabalho para o  $K_2HPO_4$  foram semelhantes aos obtidos por Silva *et al.* (2009). Esses autores investigaram os efeitos combinados de sais  $K_2HPO_4$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  com a utilização de soro de queijo, como fonte de carbono alternativa, e obtiveram máxima produção de goma xantana quando utilizaram a concentração máxima  $K_2HPO_4$  com as cepas *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230 e *X. campestris* pv *manihotis* 1182. Kalogiannis *et al.* (2003) também estudaram a produção de goma xantana com suplementação de  $K_2HPO_4$  obtendo máxima produção de goma xantana utilizando pré-tratamento de melaço de beterraba como fonte de carbono, suplementação  $K_2HPO_4$ , água de torneira, extrato de levedura e Triton 80.

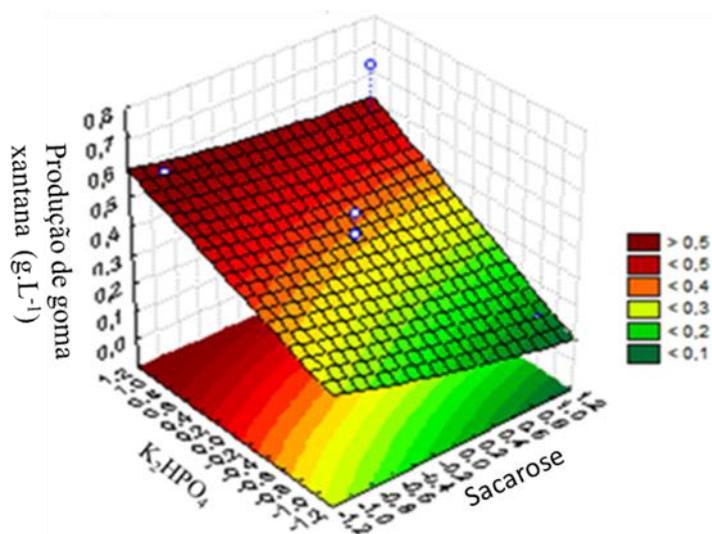
Embora se saiba que a produção de goma xantana também é influenciada pela estirpe microbiana, pelo tempo e pela composição do meio de fermentação, até o presente momento, nenhum meio alternativo substituiu o uso de sacarose, com um efeito significativo sobre a qualidade e a produtividade da goma xantana. No entanto, os resultados deste estudo sugerem a necessidade de novas pesquisas utilizando substratos que sejam ricos em nutrientes como

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Assim, podendo oferecer inúmeras vantagens para o processo de produção da goma xantana, incluindo benefícios financeiros uma vez que essas variáveis são significativas em muitas cepas usadas para obter essa goma.

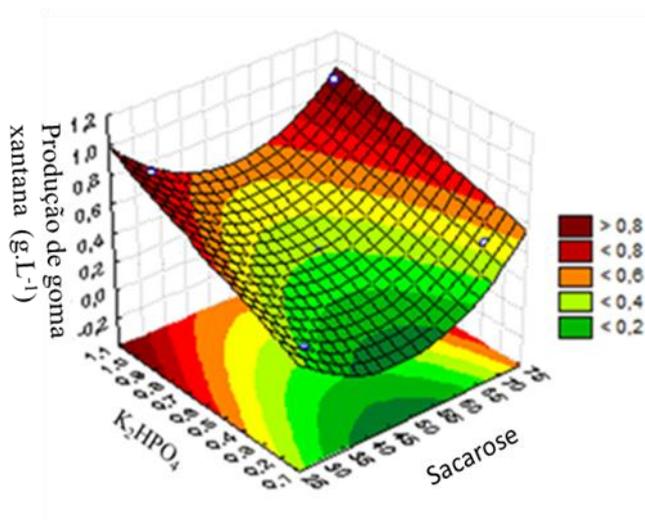
Uma vez que a principal fonte de carbono é fundamental na formação de qualquer bioproduto (sacarose ou açúcar demerara neste trabalho), torna-se importante estudar a interação destas variáveis com as outras, de forma independente e isolada, verificando assim, a interação da fonte de carbono com as fontes de micronutrientes (como os avaliados neste trabalho: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>).

A partir de modelos empíricos estabelecidos pelo software Statistica<sup>®</sup> 8.0, foi possível observar os gráficos de superfície que ratificaram a significância das variáveis estudadas. A superfície de resposta é a descrição gráfica do modelo, o que simplifica a interpretação dos resultados. O objeto da metodologia de superfície de resposta é detectar quais parâmetros experimentais podem gerar sinais capazes de influenciar significativamente o experimento, ou seja, o relacionamento desejado entre resposta e fatores que determina uma combinação dos níveis para uma resposta ótima (BOX, 1954; RODRIGUES e IEMMA, 2005).

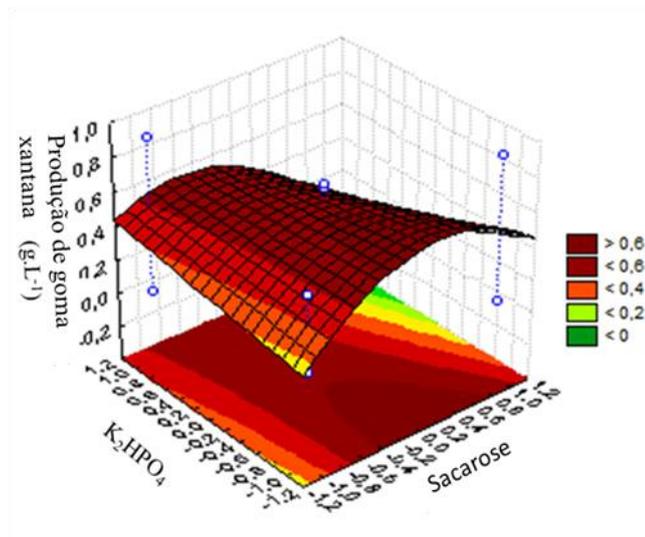
A superfície de resposta apresentada nos gráficos das Figuras 14 e 15 mostra que, para as cepas *Xanthomonas* 290 e *Xanthomonas* 472, respectivamente, quanto maior a proporção de fosfato dibásico de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) em relação à variação sacarose, maior a produção da goma devido ao aumento da concentração de potássio. Diferentemente, a cepa *Xanthomonas* S6 não apresenta aumento da sua produção de goma na concentração máxima de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> em relação à variação de sacarose como pode ser visto no gráfico da Figura 16. Os gráficos da superfície de resposta das Figuras 17 e 18 mostram que, para as cepas *Xanthomonas* 290 e *Xanthomonas* 472, respectivamente, não houve um aumento da produção de goma xantana ao maximizar a concentração de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) em relação à variação de sacarose. O aumento da produção de goma ao maximizar MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ocorre quando se utiliza a cepa *Xanthomonas* S6, como pode ser observado na Figura 19.



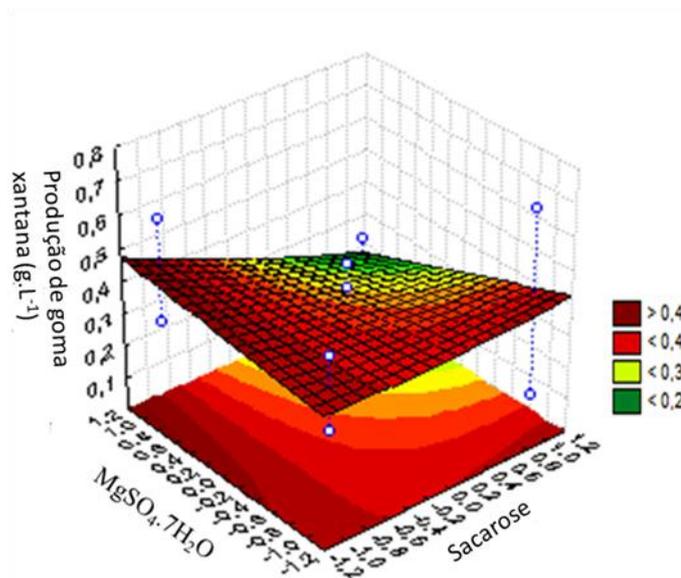
**Figura 14:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e  $K_2HPO_4$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas axonopodis pv manihotis* IBSBF 290.



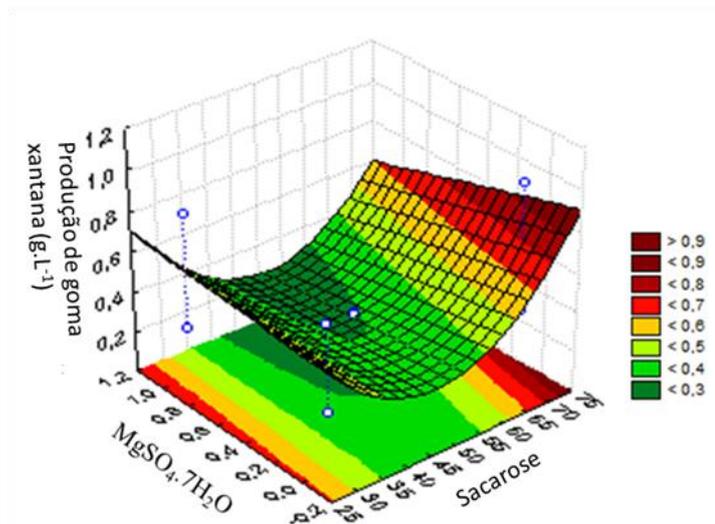
**Figura 15:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e  $K_2HPO_4$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas campestris pv campestris* IBSBF 472.



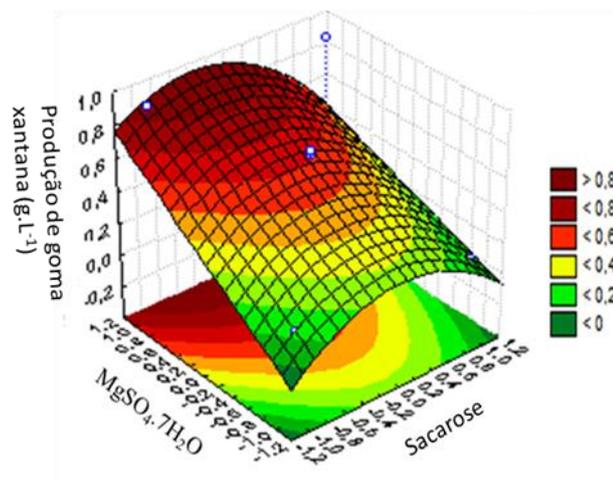
**Figura 16:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e  $K_2HPO_4$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas* sp S6.



**Figura 17:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290.



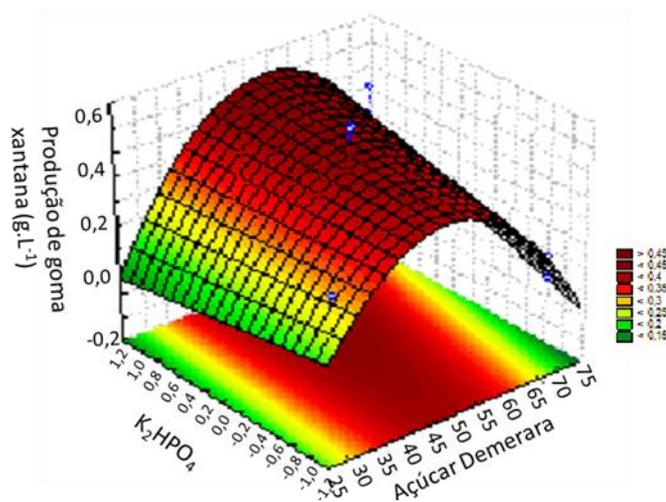
**Figura 18:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472.



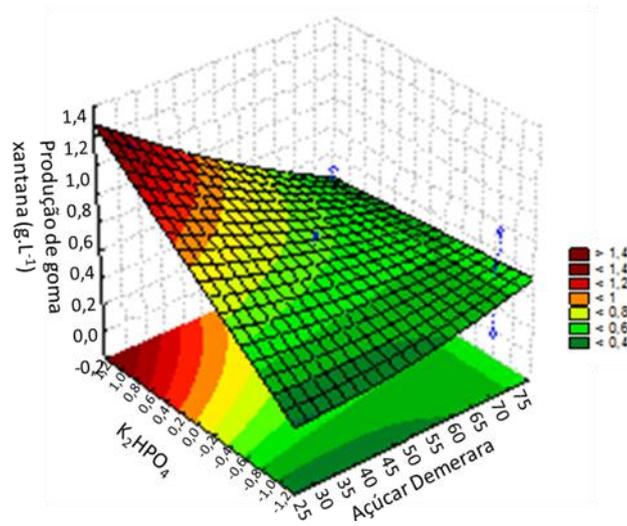
**Figura 19:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de sacarose e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas* sp S6.

Para os experimentos onde foi utilizado açúcar demerara como fonte principal de carbono, os gráficos de superfície das Figuras 20 e 21 apresentam que para cepas *Xanthomonas* 290 e *Xanthomonas* 472, respectivamente, assim como quando utilizou-se sacarose como fonte de carbono, altas concentrações do sal fosfato dibásico de potássio ( $K_2HPO_4$ ) proporcionou um aumento significativo da produção de goma xantana. Além disso, é possível verificar que ao utilizar o açúcar demerara, mesmo em um baixo nível de  $K_2HPO_4$ , é possível manter a produção de goma xantana próxima do seu nível mais avançado para a cepa *Xanthomonas* 290. No gráfico da cepa *Xanthomonas* S6, Figura 22, não pode ser visto uma grande variação da produção de goma xantana ao variar o sal  $K_2HPO_4$ .

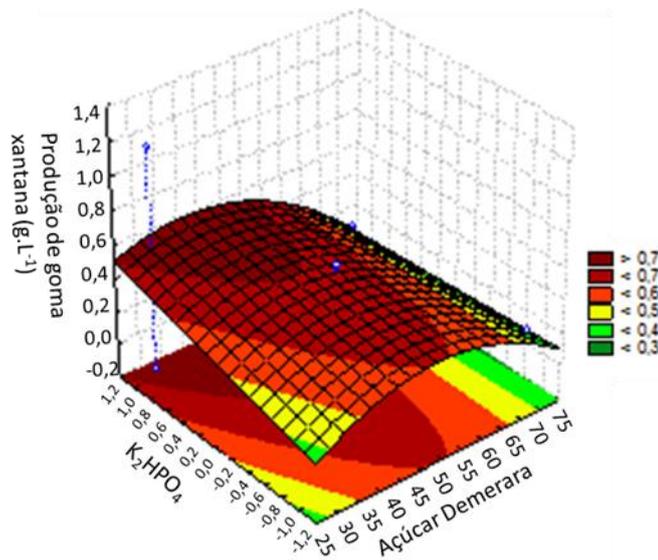
As Figuras 23 e 24 mostram a atuação das cepas *Xanthomonas* 290 e *Xanthomonas* 472, respectivamente, na produção de goma xantana estudando as proporções de sulfato de magnésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) em relação à variação de açúcar demerara. Onde pode ser visto que tal sal não demonstrou tamanha significância à produção de goma xantana comparado ao sal  $K_2HPO_4$ . Diferentemente de quando se utilizou sacarose, a cepa *Xanthomonas* S6 também não demonstrou significância estatística para variação de sulfato de magnésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) em relação à variação de açúcar demerara como pode ser visto na Figura 25.



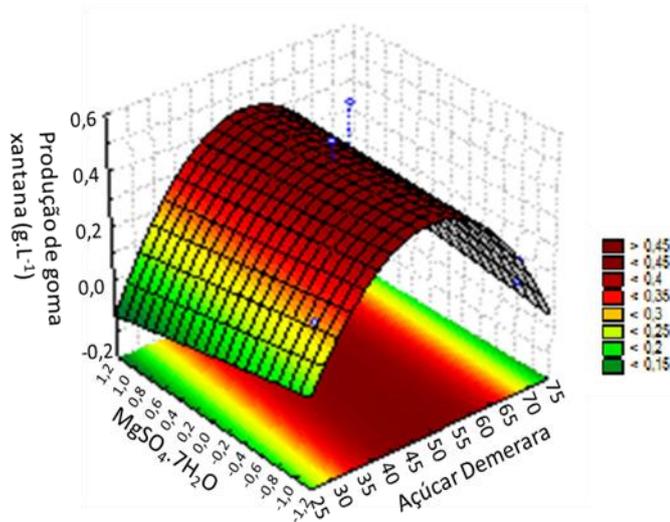
**Figura 20:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e  $K_2HPO_4$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290.



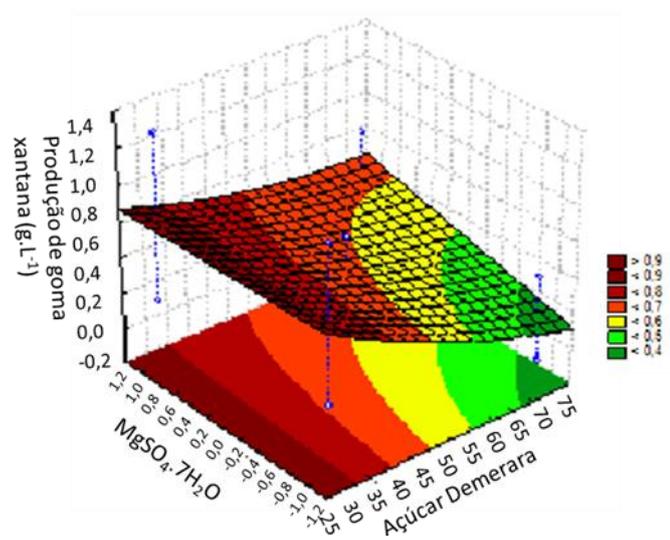
**Figura 21:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e  $K_2HPO_4$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas campestris pv campestris* IBSBF 472.



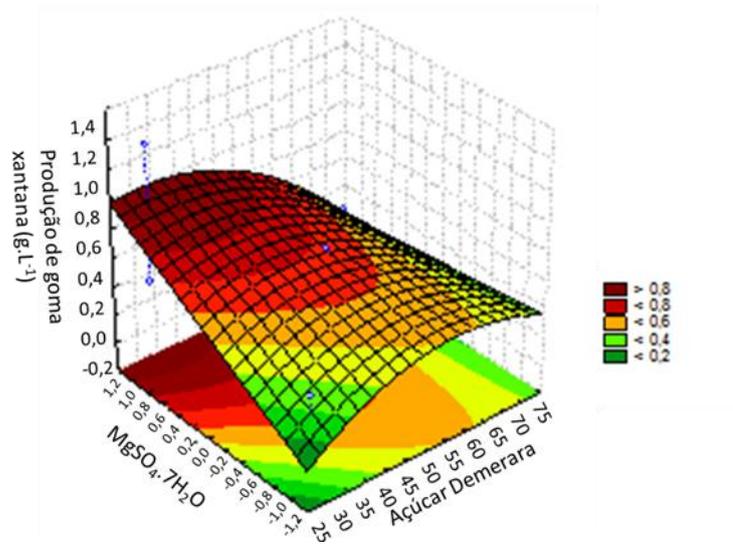
**Figura 22:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e  $K_2HPO_4$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas sp* S6.



**Figura 23:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290.



**Figura 24:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472.



**Figura 25:** Superfície de resposta que representa o efeito das concentrações de açúcar demerara e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e seus efeitos mútuos na produção de goma xantana pela cepa *Xanthomonas* sp S6.

### 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi estudado a utilização do açúcar demerara como fonte de carbono principal em diferentes cepas de *Xanthomonas*, bem como a influencia de concentração de sais frente ao substrato utilizado, foi observado que:

- O fosfato dibásico de potássio ( $K_2HPO_4$ ) mostrou-se uma variável significante para a produção de goma xantana tanto para a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* IBSBF 290 quanto para a cepa *Xanthomonas campestris* pv *campestris* IBSBF 472, utilizando sacarose ou açúcar demerara como fonte de carbono.
- A produção de goma xantana utilizando a cepa *Xanthomonas* sp S6 apresentou como variável significativa apenas o sal sulfato de mognésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) em meio contendo sacarose; e não apresentou nenhuma variável significativa em meio contendo açúcar demerara;
- O açúcar demerara mostrou-se eficaz na produção da goma xantana devido à sua riqueza nutricional. Sendo capaz, inclusive, de substituir parcialmente os sais estudados.

## 6 RECOMENDAÇÕES FUTURAS

Os resultados obtidos mostraram a viabilidade do bioprocesso desenvolvido utilizando açúcar demerara como substrato e suplementação de micronutrientes através da adição dos sais ( $K_2HPO_4$  e  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) como suporte na produção de goma xantana, por fermentação em meio líquido. Porém, alguns pontos ainda podem ser explorados, como por exemplo:

- Caracterizar as gomas produzidas com açúcar demerara quanto à sua reologia e composição físicoquímica;
- Realizar a otimização desses experimentos com a finalidade de aumentar a produção de goma xantana;
- Realizar o estudo cinético dessas cepas em meio contendo açúcar demerara;
- Estudar a influência de outros valores de temperatura na produção do inóculo e durante a fermentação.
- Utilizar novas linhagens de *Xanthomonas* para verificar sua produção de goma xantana em meio contendo açúcar demerara;
- Testar outras fontes micronutrientes a fim de se reduzir o custo de produção da goma xantana;
- Testar a influência de diferentes sais na produção de goma xantana;

# Capítulo 7

## 7 REFERÊNCIAS

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VEDRUSCOLO, J. L. S.; VEDRUSCOLO, 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*, 6, p.317-322, jul./dez. 2003.

BAYMA, C. Tecnologia do açúcar: da matéria-prima à evaporação. *Coleção Canavieira*, n.3, Rio de Janeiro, RJ, 1974.

BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. Fenômenos de transporte, 2º ed, *Editora LTC*, São Paulo, SP, 2004.

BORGES, C. D.; VEDRUSCOLO, T. C. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção, *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 29, p. 171-188, 2008.

BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L. F. M.; ROITMAN, T. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros, *Polímeros*, 18, jul/set. 2008.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial: fundamentos, v.1, *Editora Edgard Blücher LTDA*, São Paulo, SP, 2001.

BOX, G. E. P. The exploration and exploitation of response surfaces: some general considerations and examples, *Biometrics*, 10, 1954.

BOX, G. E. P. Statistics for experimenters. *Editora J. Wiley & Sons*, New York, 1998.

BRANDÃO, L. V.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J. I. Utilização de soro de mandioca como substrato fermentativo para biossíntese de goma xantana: viscosidade aparente e produção, *Revista Polímeros*, 20, p.175-180, 2010.

BRASIL. Decreto nº 50040, de 24 de janeiro de 1961. Dispõe sobre Normas Técnicas Especiais Reguladoras do Emprego de Aditivos Químicos a Alimentos. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 28 de janeiro de 1961.

CAPRON, I.; BRIGAND, G.; MULLER, G. Thermal denaturation and renaturation of a fermentation broth of xanthan: rheological consequences, *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, p.215-225, 1998.

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*, 26, p.282-291, 2000.

CHOPPE, E.; PUAUD, F.; NICOLAI, T.; BENYAHIA, L. Rheology of xanthan solutions as a function of temperature, concentration and ionic strength, *Carbohydrate Polymers*, 82, p.1228-1235, 2010.

DAWES, I. W.; SUTHERLAND, I. W. Microbial physiology, 2nd ed, *Editora Blackwell Scientific Publications*, Londres, 1992 *apud* CANUTO, A. P. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

DEMAIN, A. L. Small bugs business: the economic power of the microbe. *Biotecnology Advances*, 18, p.499-514, 2000.

FARIA, S.; VIEIRA, P. A.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. Application of a model using the phenomenological approach for prediction of growth and xanthan gum production with sugar cane broth in a batch process. *Food Science and Technology*, 43, p.498–506, 2010.

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

GONZÁLEZ, M. E. L.; XAVIER FILHO, L; CÓRDOBA, C. V. Metabolitos vegetales y microbianos para la industria: um enfoque biotecnológico, *Editora Âmbito Cultural Edições LTDA*, Rio de Janeiro, RJ, 2008.

GUMUS, T.; DEMIREI, A. S.; MIRIK, M.; ARICI, M.; AYSAN, Y. Xanthan gum production of xanthomonas spp. isolated from different plants, *Food Science Biotechnology*, 19, p.201-206, 2010.

JACKSON, R. W. Plant pathogenic bacteria: genomics and molecular biology, *Caister Academic Press*, Norfolk, UK, 2009.

JACUÁ, M. G. S. Reologia de sistemas dispersos. In: MALDONADO, G. G. *Anais da primeira mesa redonda sobre emulsões na indústria de petróleo*, Petrobrás, CENPES, 1985.

KALOGIANNIS, S; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDES, D. A.; SKARACIS, G. N. Optimization of xanthan gum production by *xanthomonas campestris* grow in molasses, *Process Biochemistry*, 39, p.249-256, 2003.

LO, Y.; YANG, S.; MIN, D. B. Ultrafiltration of xanthan gum fermentation broth: process and economic analyses. *Journal of Food Engineering*, 31, p.219-236, 1997.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica, *Editora E-papers*, Rio de Janeiro, RJ, 2001.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação e aplicação, *Estudos Tecnológicos*, 5, p.50-67, jan./abr. 2009.

MCNELLY, W. H.; KANG, K. S. Xanthan and some other biosynthetic gums. In: WHISTLES, R. L.; BEMILLER, J.N., *Editors Industrial gums*, Academic Press, New York, p. 473-497, 1973.

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

NERY, Tatiana Barreto Rocha. Biossíntese de goma xantana a partir da fermentação de soro de leite: rendimento e viscosidade, *Revista Química Nova*, 31, p.1937-1941, 2008.

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

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

PELCZAR Jr., J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; EDWARDS, D. D.; PELCZAR, M. F. Microbiologia: conceitos e aplicações, 2 ed, v.1, *Editora Perarson Makron Books*, São Paulo, SP, 2004.

PHILLIPI, S. T. Tabela da composição química de alimentos, *Autoria Própria*, 1995.

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

REHM, B. H. A. Microbial production of biopolymers and polymer precursors: application and perspectives, *Caister Academic Press*, Norfolk, UK, 2009.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos, *Editores Casa do Pão*, São Paulo, 2005.

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

ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M. F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp., *Carbohydrate Polymers*, 77, p.65-71, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia industrial: engenharia genética, *Editores Edgard Blücher LTDA*, v.2, São Paulo, SP, 2001.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.. Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos, *Editores Edgard Blücher LTDA*, v.3, São Paulo, SP, 2001.

SEN, R. Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR, *Progress in Energy and Combustion Science*, 34, p.714-724, 2008.

SILVA, M. F.; FORNARI, R.C.G.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, R. L.; LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Production and characterization of xanthan gum by *xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source, *Journal of Food Engineering*, 90, p.119-123, 2009.

SHIT TU, T.; AMINU, R. A.; ABULUDE, E. O. Functional effects of xanthan gum on composite cassava-wheat dough and bread, *Food Hydrocolloides*, 23, p.2254-2260, 2009.

SLAVIN, J. L; GREENBERG, N. A. Partially hydrolyzed guar gum: clinical nutrition uses, *Nutrition*, 19, p. 549-552, 2003.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharide, *Elsevier Science*, 16, p.41-46, 1998.

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

União da Indústria de Açúcar – UNICA. Em nova revisão, estimativa de moagem da safra 2011/2012 será de 510,24 milhões de toneladas de cana na região Centro-Sul. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode=%7BC9F3A339-4AAA-4B26-8F65-73C8D25AEDD2%7D> . Acessado em: 07/02/2012.

VORHÖLTER, F.J.; SCHNEIKER, S.; GOESMANN, L. K.; BEKEL, T.; KAISER, O.; LINKE, B.; PATSCHKOWSKI, T.; RÜCKERT, C.; SCHMID, J.; SIDHU, V. K.; SIEBER, V.; TAUCH, A.; WATT, S. A.; WEISSHAAR, B.; BECKER, A.; NIEHAUS, K.; PÜHLER, A. The genome of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* b 100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis, *Journal of Biotechnology*, 134, p.33-45, 2008.

WHITCOMB, P. J.; EK, B. J.; MACOSKO, C. W. Rheology of xanthan gum solutions, *Extracellular Microbial Polysaccharide*, 45, , p.160-173, 1977.

WU, X.; LI, O.; CHEN, Y.; ZHU, L.; QIAN, C.; TENG, Y.; TAO, X. A carotenoid-free mutant strain of *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 for the commercial production of gellan, *Carbohydrate Polymers*, 84, p.1201-1207, 2011.

ZHANG, Z.; CHEN, H. Fermentation performance and structure characteristics of xanthan produced by *Xanthomonas campestris* with a glucose/xylose mixture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160, 1653–1663, 2010.

*The End*