



UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI - ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAÍZA DE ALMEIDA MESQUITA

IMOBILIZAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* COM SÍNTESE
bb9SIMULTÂNEA DE POLIURETANO PARA PRODUÇÃO DE GOMA
XANTANA

ERECHIM, RS - BRASIL

2018

**IMOBILIZAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* COM SÍNTESE SIMULTÂNEA DE
POLIURETANO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA**

RAÍZA DE ALMEIDA MESQUITA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Orientadores: Dra. Jamile Zeni

Dr. Rogério Luis Cansian

ERECHIM, RS - BRASIL

2018

IMOBILIZAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* COM SÍNTESE SIMULTÂNEA DE POLIURETANO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

Raíza de Almeida Mesquita

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI - Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim.

Comissão Julgadora

Prof. Dra. Jamile Zeni
Orientadora
URI - Erechim

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
Orientador
URI - Erechim

Prof. Dra. Eloane Malvessi
UCS – Caxias do Sul

Prof. Dr. Alexander Junges
URI - Erechim

Erechim, 2018

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – ERECHIM.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, minha gratidão eterna à minha família, por serem exemplos de seres humanos, e estarem sempre ao meu lado durante todos os momentos da minha vida. Amo vocês!

Aos meus orientadores, Prof. Dra. Jamile Zeni e Prof Dr Rogério Luis Cansian, obrigada pelo carinho e pela paciência sem fim nessa caminhada. Aos professores do de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, em especial Prof. Dra. Geciane Toniazzi e Prof. Dr. Alexander Junges, pelas valiosíssimas colocações e ideias compartilhadas nos seminários e nos corredores.

Laura Coutinho e Letícia da Costa e Silva, a vocês agradeço pelo privilégio de ter vocês como amigas há tanto tempo, e por não medirem esforços para sempre estarem ao meu lado.

Ilizandra Aparecida Fernandes, obrigada pelo carinho, pelas cuias de chimarrão e pelos bolos, pelos puxões de orelha quando necessário.

Paula Miotto, ainda bem que te encontrei nessa caminhada. Tua companhia e apoio fizeram esse caminho mais alegre!

Guilherme Hassemer, teu cinismo ilumina meu dia. Obrigada pelas doses diárias de sarcasmo, pelas imagens de bichinhos fofos e pelos pacotes de goma divididos – it kept me going.

Bruna Puton e Julia Bernardi, não sei o que seriam de todos esses dias de laboratório sem vocês! Obrigada por existirem!

Jaquilini Piassão e Leidiane Falcão, gratidão pela companhia diária, pelas risadas e momentos de descontração – e de loucura.

Aos bolsistas de iniciação científica, meus pequenos unicórnios, Jorge Picolli, José Kiedis, Vinícius Marchiori, Danquiele Sartori, Luana Bueno Cas e Flora Rodrigues Terra, ainda bem que vocês sobreviveram! Obrigada pela ajuda e pela atenção e tempo dedicados à estes experimentos.

Todos os colegas do Laboratório 9.36, serei eternamente grata pelo companheirismo, carinho e apoio. A CAPES e a URI - Erechim pela concessão de bolsa e apoio financeiro. E, por fim, a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado, meus sinceros agradecimentos.

“Open different doors. You may find a you
there that you never knew was yours.”

(Mary Poppins, 1964)

Resumo da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

IMOBILIZAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* COM SÍNTESE SIMULTÂNEA DE POLIURETANO PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

Raíza de Almeida Mesquita

Fevereiro/2018

Orientadores: Dra. Jamile Zeni

Dr. Rogério Luis Cansian

A goma xantana é um biopolímero utilizado nos mais diversos segmentos industriais, e é produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris*. A imobilização de células é uma alternativa para melhoria do processo de produção de goma xantana, reduzindo o tempo e os custos e elevando o rendimento. O presente trabalho teve como objetivo imobilizar o micro-organismo *Xanthomonas campestris* com síntese simultânea em poliuretano. O processo de imobilização do micro-organismo se deu com a mistura de polioli e isocianato. A imobilização, bem como a estabilidade do imobilizado em relação ao armazenamento e a capacidade de ciclos reacionais foram avaliadas pela quantidade de goma xantana produzida e pelo desprendimento de células da matriz. De acordo com os resultados obtidos, o processo de imobilização apresentou aumento de produção de goma xantana de 274% em relação às células livres. Os resultados do ciclo contínuo demonstraram a possibilidade de reutilizar o imobilizado por até 5 vezes, considerando 50% da produção de goma inicial. O armazenamento em diferentes temperaturas, 4°C, -4°C e -80°C, por trinta dias não afetou a capacidade metabólica das células imobilizadas de produzirem goma xantana, sendo que o armazenamento em *ultrafreezer* (-80°C) apresentou maior produção de goma xantana e menor desprendimento de células.

Palavras-chave: *in situ*, imobilização, *Xanthomonas campestris*, goma xantana.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering.

IMMOBILIZATION OF *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* AND SIMULTANEOUS SYNTHESIS OF POLYURETHANE FOR XANTHAN GUM PRODUCTION

Raíza de Almeida Mesquita

February/2018

Advisors: Dra. Jamile Zeni

Dr. Rogério Luis Cansian

Xanthan gum is a biopolymer with varied applications, being used in many industrial branches, and is produced by the bacteria *Xanthomonas campestris*. Cell immobilization is an alternative to enhance xanthan gum production, reducing both time and costs, while increasing yield. The present study intended to immobilize the micro-organism *Xanthomonas campestris in situ* in polyurethane. The immobilization process occurred with the mixture of polyol and isocyanate. The immobilization, as well as the storage stability of the immobilized cells and the capacity of recycles were evaluated by the production of xanthan gum and by the cell leakage from the matrix. According to the results, the immobilization process increased the xanthan gum production by 274%. The continuous batch fermentations showed the possibility of reusing the immobilized cells up to 5 times, considering 50% of the initial xanthan gum production. The storage in different temperatures, 4°C, -4°C e -80°C during thirty days did not affect the metabolic capacity of the immobilized cells to produce xanthan gum, and the storage in -80°C showed higher xanthan gum production and lower cell leakage from the matrix.

Keywords: *in situ*, immobilization, *Xanthomonas campestris*, xanthan gum.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO GERAL	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 <i>Xanthomonas campestris</i>	17
3.2 GOMA XANTANA	18
3.2.1 Produção e recuperação	19
3.2.2 Propriedades	20
3.2.3 Aplicações	21
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS.....	22
3.3.1 Poliuretanos como suporte para imobilização	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 MICRO-ORGANISMO	27
4.2 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA COM <i>Xanthomonas campestris</i> LIVRE.....	27
4.3 IMOBILIZAÇÃO de <i>Xanthomonas campestris</i> IN SITU EM ESPUMA DE POLIURETANO	28
4.4 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR NO POLIURETANO	28
4.5 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA COM <i>Xanthomonas campestris</i> IMOBILIZADA	29
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS	29
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE GOMA.....	31
4.8 CONSUMO DE SUBSTRATO	32
4.9 PARÂMETROS CINÉTICOS DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	29
4.10 ESTABILIDADE OPERACIONAL	30
4.11 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO LIVRE.....	33

5.3 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR NO POLIURETANO	35
5.4 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA COM <i>Xanthomonas campestris</i> IMOBILIZADA	36
5.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL	41
5.7 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM.....	43
6 CONCLUSÕES.....	45
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	47
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia Eletrônica de Transmissão de <i>Xanthomonas campestris</i>	17
Figura 2: Estrutura química da xantana. M ⁺ : Na, K, ½ Ca.....	19
Figura 3: Fluxograma de produção de goma xantana a nível industrial.....	20
Figura 4: Métodos de imobilização.	25
Figura 5: Diagrama do processo de divisão da espuma para análise de distribuição de micro-organismos.....	28
Figura 6: Produção de goma xantana com da <i>Xanthomonas campestris</i> livre.	33
Figura 7: Comparação entre o poliuretano controle (A) e poliuretano contendo células imobilizadas de <i>X. campestris</i> (B).....	35
Figura 8: Produção de goma xantana com <i>Xanthomonas campestris</i> imobilizada em poliuretano.	36
Figura 9: Produção de goma xantana (a) e difusão de biomassa (b) variando a concentração de cubos de poliuretano no meio reacional.	38
Figura 10: Comportamento de <i>Xanthomonas campestris</i> imobilizada <i>in situ</i> em poliuretano submetida à reusos contínuos.	41
Figura 11: Aspectos dos cubos de poliuretano com <i>Xanthomonas campestris</i> imobilizada <i>in situ</i> após 6 ciclos.	42
Figura 12: Produção de goma xantana e difusão de biomassa através de <i>Xanthomonas campestris</i> imobilizada após armazenamento por 30 dias em diferentes temperaturas.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Micro-organismos imobilizados e suportes utilizados.	23
Tabela 2: Valores de biomassa e goma xantana obtidos de diferentes frações do poliuretano, após fermentação de 96 horas.....	35
Tabela 3: Produção de goma xantana e difusão de biomassa a partir de diversas concentrações de células, em 96 horas de fermentação.	39
Tabela 4: Parâmetros cinéticos do processo de fermentação de <i>Xanthomonas campestris</i> livre e imobilizada.	40
Tabela 5: Produção de goma xantana e difusão de biomassa a partir de cubos de poliuretano com imobilizado, armazenados durante 30 dias em diferentes temperaturas, em 96 horas de fermentação.	44

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	30
Equação 2.....	30
Equação 3.....	30
Equação 4.....	31
Equação 5.....	31

1 INTRODUÇÃO

A goma xantana, um biopolímero de grande importância industrial, foi descoberta em 1950 nos laboratórios do Departamento de Agricultura estado-unidense, e foi o primeiro polímero natural a ser produzido em escala industrial (MARGARITIS & ZAJIC, 1978; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; HABIBI & KHOSRAVI-DARANI, 2017). A goma xantana é resultado da fermentação de glicose e outros açúcares pela bactéria *Xanthomonas campestris*. Devido à sua estrutura, a tem aplicação nos mais diversos segmentos industriais, tais como setor de alimentos, fármacos e indústria petroquímica (ZHANG & CHEN, 2010). As pesquisas desenvolvidas nos anos sessenta culminaram na comercialização da goma xantana com o nome de Kelzan®, pelo laboratório Kelco, no mercado até os dias atuais (SUBHASH, JADHAV & JANA, 2015).

Foi estimado um consumo de 248.578 toneladas de goma xantana no ano de 2016, envolvendo US\$ 699 milhões (BCC RESEARCH, 2017). Nos Estados Unidos, o consumo de goma xantana tem um crescimento anual entre 5 e 10% (SUBHASH et al., 2015; HABIBI & KHOSRAVI-DARANI, 2017). Recentemente, em pesquisa da BCC Research (2017), foi estimado que, em 2017, o mercado de goma xantana movimentou cerca de US\$ 737 milhões, com uma projeção de crescimento anual de 5,7% em cinco anos (2017-2022). Espera-se ainda que o mercado de goma xantana chegue a movimentar no mínimo US\$ 972 milhões em 2022 (BCC RESEARCH, 2017).

As indústrias que se destacam na produção de xantana se encontram em países como Estados Unidos (Merck, Pfizer, Archer-Daniels-Midland Company, CP Kelco US Inc, DuPont, Cargill, Gum Technology Corporation, Wego Chemical Group), China (Fufeng Group Company Ltd, Hebei Xinhe Biochemical Co Ltd, Deosen Biochemical Ltd, Meihua Holdings Group Co Ltd), Áustria (Jungbunzlauer AG) e França (Sanofi SA, Rhône-Poulenc SA) (FRONT RESEARCH, 2016; ZION MARKET RESEARCH, 2016).

Como sua produção industrial se dá pela fermentação de glicose ou de sacarose, e estas matérias-primas têm um custo elevado, a goma xantana possui alto valor agregado, sendo que 50% deste valor final está relacionado com a separação e purificação do processo (SUBHASH, JADHAV & JANA, 2015; LI et al., 2016). Uma alternativa que permite melhor separação e purificação do produto é a imobilização de micro-organismos, sendo uma abordagem de baixo custo para a melhoria do processo, já que o suporte oferece proteção às células e também proporciona a reutilização dos micro-organismos imobilizados (KOSSEVA, 2011).

A imobilização em espuma de poliuretano oferece diversos aspectos positivos, tais como grande resistência à força mecânica, a solventes orgânicos e a ataques microbiológicos, além de ser fácil de manusear e ter custo acessível. O poliuretano tem sido usado como matriz de imobilização para diferentes micro-organismos, e foi amplamente utilizado para diferentes propósitos (PATIL et al., 2006; NIE et al., 2016; WAN-MOHTAR et al., 2016).

Os estudos disponíveis na literatura avaliam diversos meios de reduzir o custo de produção da goma xantana através do uso de fontes de carbono alternativas (SILVA et al., 2009; ZABOT et al., 2011; SUBHASH, JADHAV & JANA, 2015; LI et al., 2016) e através do uso de fermentação em estado sólido (ZHANG & CHEN, 2010). Até o presente momento, apenas um estudo (NIKNEZHAD et al., 2016) aborda a produção de goma xantana utilizando a técnica de imobilização para o micro-organismo *X. campestris*, sendo este em alginato , fazendo com que o presente estudo de imobilização *in situ* em poliuretano para este micro-organismo seja pioneiro.

2 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista as possibilidades da imobilização celular, o objetivo geral deste trabalho foi imobilizar *Xanthomonas campestris* em suporte de poliuretano para produção de goma xantana.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir goma xantana a partir de *X. campestris* na forma livre;
- Imobilizar *X. campestris in situ* em suporte de espuma de poliuretano;
- Produzir goma xantana a partir de *X. campestris* imobilizada;
- Avaliar a estabilidade de estocagem e o reciclo operacional do biocatalisador imobilizado.

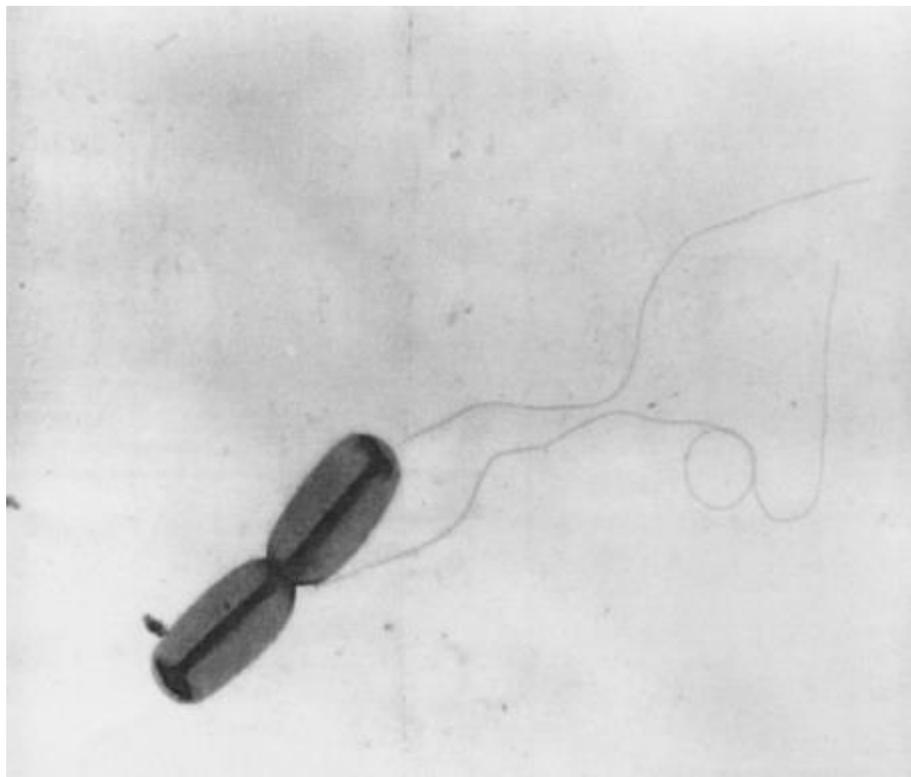
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item será apresentado uma breve revisão da literatura sobre *X. campestris*, o produto da sua fermentação, goma xantana, suas características, propriedades e aplicações; imobilização de micro-organismos e suportes utilizados.

3.1 *Xanthomonas campestris*

X. campestris é uma bactéria pertencente à família Pseudomonadaceae. É um fitopatógeno, Gram-negativa, com formato de bastonete de 0,4-0,7 μm de largura e 0,7-1,8 μm de comprimento, possuindo um único flagelo polar, de 1,7-3 μm de comprimento (CADMUS et al., 1976; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; LOPES et al., 2015). Uma imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão é apresentada na Figura 1. A *X. campestris* é um micro-organismo quimio-organotrófico e estritamente aeróbio, não desnitrificante, catalase-positiva e oxidase-negativa (CADMUS et al., 1976; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Figura 1: Microscopia Eletrônica de Transmissão de *Xanthomonas campestris*.



FONTE: García-Ochoa et al. (2000)

Suas colônias são amareladas e regulares, e o meio mais utilizado para seu crescimento é o meio Yeast Malt (YM) e sua variante YG-T (Yeast-Glucose-Tripton) (CADMUS et al., 1976; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). O magnésio tem um efeito positivo no crescimento celular, e grandes concentrações de nitrogênio estimulam a reprodução de células, sendo principalmente utilizados para produção de enzimas e para o metabolismo catabólico e anabólico das células, mas não têm papel na estrutura da xantana. Nitrogênio, fósforo e enxofre tem efeito significativo na produção de goma xantana (HABIBI & KHOSRAVIDARANI, 2017).

Diversos estudos foram realizados para otimizar processos de fermentação usando *X. campestris*, onde foi determinado que a melhor faixa de temperatura para seu crescimento é entre 22° a 35°C, sendo 28°C a temperatura ótima. A agitação é indispensável, e Assis et al. (2014) concluíram que baixas agitações elevam a produção de goma xantana e a concentração de biomassa. O ideal para o crescimento de *X. campestris* é pH neutro, sendo que este decresce a valores próximos a 5,0 durante a fermentação (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; LEELA & SHARMA, 2000; SUBHASH, JADHAV & JANA, 2015; LOPES et al., 2015). De acordo com García-Ochoa et al. (2000), o controle de pH melhora o crescimento de células, mas não tem efeito na produção de goma xantana. Ainda, quando o pH é controlado, a produção de xantana cessa quando a fase estacionária se inicia, independente do modo de controle utilizado. Sem a adição de álcalis para controle de pH, a produção de goma continua durante a fase estacionária.

3.2 GOMA XANTANA

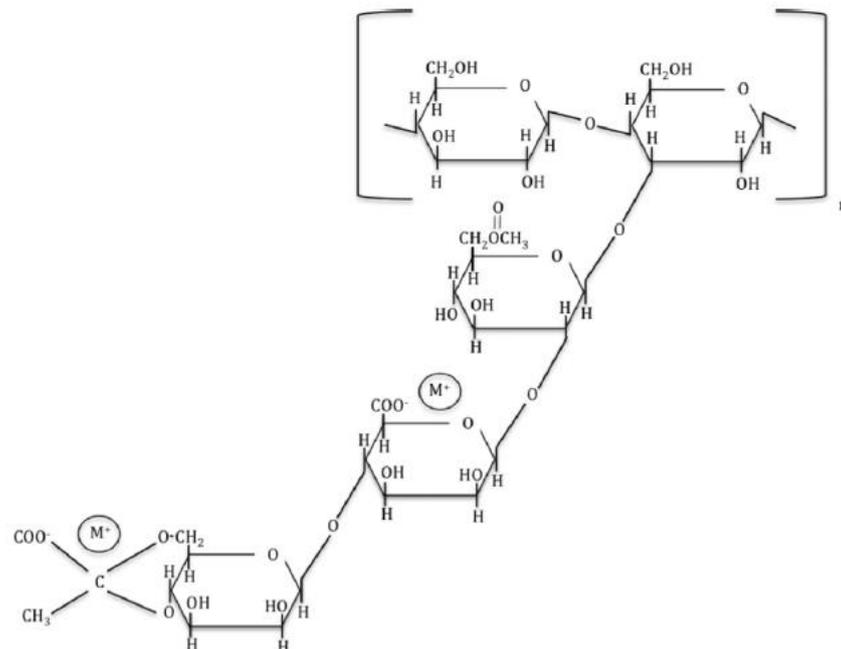
3.2.1 Características

Goma xantana é um exopolissacarídeo complexo, produzido através da fermentação da glicose pelas bactérias do gênero *Xanthomonas*. É o polissacarídeo de fonte bacteriana mais usado, e o único biopolímero bacteriano significativo no mercado de hidrocoloides global. Soluções de xantana possuem propriedades espessantes, com comportamento pseudoplástico, sendo estáveis em uma grande variedade de temperaturas, pHs e pKs. O peso molecular varia entre 2,0 e 20,0·10⁶ Da, composta por unidades repetidas de D-glicose, D-manose, D-ácido glucorônico, grupos D-acetil e ácido pirúvico. Sua molécula está representada na Figura 2. A goma xantana é altamente solúvel em água, tanto quente quanto fria, e o tamanho de sua

molécula e suas interações proporcionam grande viscosidade em soluções aquosas (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; SUBHASH, JADHAV & JANA, 2015; FREITAS, ALVES & REIS, 2015).

Donot et al. (2012) descrevem que a síntese de heteropolissacarídeos, de maneira geral, ocorre através da assimilação dos açúcares e conversão destes para nucleotídeos, seguido da ligação das subunidades de pentassacarídeo a um transportador lipídico e, por fim, a polimerização das unidades repetidas de pentassacarídeos e excreção para o ambiente.

Figura 2: Estrutura química da xantana. M^+ : Na, K, $\frac{1}{2}$ Ca.



FONTE: Donot et al. (2012)

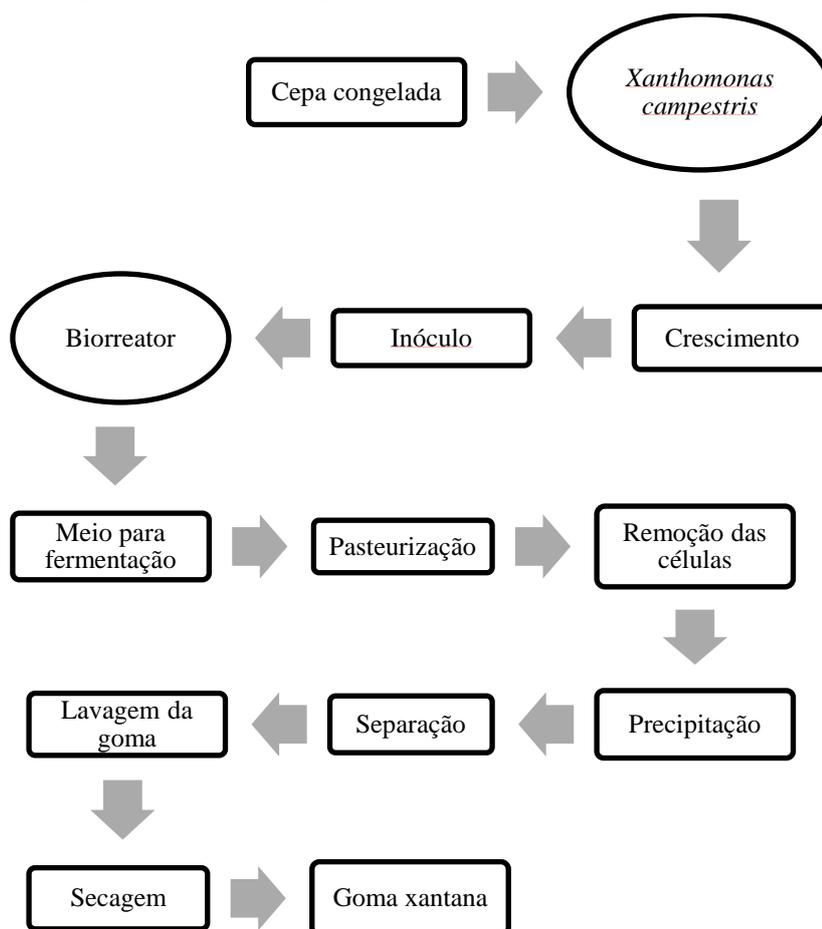
3.2.2 Produção e recuperação

A produção industrial da goma xantana está esquematizada na Figura 3 e se dá através da fermentação em tanques agitados com aeração, onde se tem um meio de cultura contendo fonte de carbono, fonte de nitrogênio e minerais. Quando a fermentação encerra, o meio possui células, goma, nutrientes residuais e outros metabólitos, sendo necessária a pasteurização para eliminação das bactérias, e a filtração ou precipitação com álcool isopropílico para recuperação da goma xantana. O polímero é seco, moído/liofilizado, e embalado (KATZBAUER, 1998; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

García-Ochoa et al. (2000) sugerem diversos métodos para eliminação das células bacterianas, tais como tratamento com agentes químicos, com enzimas ou o aquecimento, destacando que normalmente é utilizada a pasteurização.

Para a recuperação do polímero, é feita sua precipitação, através da diminuição da solubilidade. São usadas técnicas de adição de sal, concentração por evaporação, ultrafiltração e adição de alcoóis (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Figura 3: Fluxograma de produção de goma xantana a nível industrial.



FONTE: Adaptado de García-Ochoa et al. (2000).

Quanto à purificação, o método usado depende da finalidade da goma. Para uso alimentício, a goma xantana resultante deve ser livre de biomassa e dos reagentes usados no processo de recuperação (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

3.2.3 Propriedades

A goma xantana é diferente dos outros exopolissacarídeos microbianos não apenas por sua estrutura química, mas também devido às suas propriedades reológicas em soluções

aquosas (LEELA & SHARMA, 2000). De acordo com Katzbauer (1998), suas soluções seguem o comportamento de um fluido não-Newtoniano e altamente pseudoplástico. Essa pseudoplasticidade aumenta as qualidades sensoriais em produtos alimentícios e garante um grau alto de mixabilidade, capacidade de bombeamento e versatilidade.

A rede tridimensional formada pelas cadeias associadas faz da goma xantana um eficiente estabilizante para suspensões e emulsões. A viscosidade das soluções de xantana praticamente não se altera com a temperatura entre 4 e 93°C, com o pH entre 1 e 13 e com forças iônicas equivalentes a concentrações de cloreto de sódio entre 0,05 e 1%. Há compatibilidade plena com uma grande diversidade de insumos usados industrialmente, como metais, ácidos, sais, agentes redutores, outros texturizantes, solventes, enzimas, surfactantes e conservantes (KATZBAUER, 1998).

3.2.4 Toxicidade

A toxicidade da goma xantana tem sido intensivamente pesquisada. Estudos de irritação dérmica concluem que concentrações de até 1% de goma xantana não geraram irritações em pele em coelhos, nem suspensões com 0,1% tiveram ação irritativa em porcos-da-índia. Coelhos que tiveram seus olhos expostos a soluções de 1% de goma xantana também não tiveram irritações (FIUME et al., 2016). Freitas, Alves & Reis (2015) trazem que estudos de toxicidade aguda através de ingestão não tiveram toxicidade notada para até 20 g/kg de peso corpóreo. Estudos relacionados à alimentação a longo prazo, com doses de 1 g/kg de peso corporal durante 2 anos, não mostraram diferenças significativas entre grupos teste e grupos controle de ratos albinos e cachorros da raça beagle. Em humanos, a ingestão de 150 mg/kg de peso durante 23 dias não mostrou diferença significativa nos parâmetros de análise hematológica, química ou de urina (FREITAS, ALVES & REIS, 2015).

3.2.5 Aplicações

A goma xantana tem diversas aplicações como emulsificante, lubrificante, agente espessante e de mobilidade em recuperação de petróleo (PALANIRAJ & JAYARAMAN, 2011). Em 1988, o valor de Ingestão Diária Aceitável da goma xantana foi alterado para “não especificado”, confirmando sua segurança como aditivo alimentar (HABIBI & KHOSRAVI-DARANI, 2017). Como a goma xantana não é digerível pelo ser humano, é usada para

diminuir o valor calórico dos alimentos, pois seu valor calorífico é de aproximadamente 0,6 kcal/g (KATZBAUER, 1998).

Em alimentos, é usada com os mais diversos fins, sendo aplicada em produtos de panificação para aumentar a coesão dos grãos de amido, contribuir para a estrutura e aumentar a vida de prateleira, devido à retenção de umidade. Também é usada como substituto de ovos, principalmente da clara, sem afetar aparência e gosto do produto. Em misturas prontas para bolos, controla a reologia da massa, e retém gás. Sua aplicação também evita a sinérese e inibe a retrogradação (KATZBAUER, 1998; SHARMA et al., 2006; LI & NIE, 2014).

Sua aplicação em bebidas é principalmente como agente espessante. A goma xantana também é eficiente para suspender polpa de frutas durante longo período (PALANIRAJ & JAYARAMAN, 2011). É usada como estabilizante e espessante em molhos para salada. O seu uso permite estabilidade da emulsão a longo prazo (PETRI, 2015). Também é usada em rações para animais, principalmente como estabilizante em rações enlatadas (KATZBAUER, 1998; SHARMA et al., 2006; PALANIRAJ & JAYARAMAN, 2011).

Seu uso em alimentos lácteos é principalmente como estabilizante de sorvetes, sherbets, milk shakes e iogurtes. É aplicada em cream cheese, dando consistência e corpo para o produto. Xaropes, molhos e coberturas contendo xantana têm consistência e viscosidade, e a aplicação da goma nestes produtos é ideal devido à sua estabilidade em ácidos e às suas propriedades pseudoplásticas (SHARMA et al., 2006; PALANIRAJ & JAYARAMAN, 2011).

Quando aplicada em alimentos congelados, a goma xantana aumenta a estabilidade através da ligação com a água livre, limitando o crescimento de cristais de gelo e promovendo a textura desejada (KATZBAUER, 1998).

Também é usada em produtos farmacêuticos, como cremes e afins, como espessante e estabilizante, e em cremes dentais, onde proporciona brilho e facilita a passagem pela embalagem. Além disso, controle de água e estabilização em condições extremas faz com que seja usada em fluidos de perfuração de petróleo (PALANIRAJ & JAYARAMAN, 2011).

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

A imobilização de micro-organismos consiste no confinamento físico ou químico das células em uma região, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos, possibilitando a reutilização das mesmas. A maioria dos processos fermentativos industriais

convencionais utiliza células livres, embora o uso de microrganismos imobilizados permita um aumento da produção devido à elevada concentração de células (COVIZZI et al., 2007).

A tecnologia de imobilização de células é muito ampla, podendo ser utilizada para diversos micro-organismos, em suportes variados. A Tabela 1 apresenta algumas das imobilizações reportadas pela literatura.

Tabela 1: Micro-organismos imobilizados e tipos de suportes utilizados.

Suporte	Micro-organismo	Referência
Alginato	<i>Lactobacillus caseii</i>	KOURKOUTAS et al., 2004
Quitosana	<i>Enterococcus faecalis</i>	YANG, 2015
Espuma de poliuretano	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	BHASARKAR, DIKSHIT & MOHOLKAR, 2015
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	DIKSHIT & MOHOLKAR, 2016
	<i>Bacillus gottheilii</i>	SUBBALAXMI & MURTY, 2016
Álcool polivinílico	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	REBROŠ et al., 2016
Membrana de fibra oca	<i>Escherichia coli</i>	MAN et al., 2016
Sílica mesoporosa	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ZHAO et al., 2016
Alginato de cálcio e Alginato de cálcio com álcool polivinílico	<i>Xanthomonas campestris</i>	NIKNEZHAD et al., 2016
Membrana de microfibra de polipropileno	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	CHEN et al., 2017

O estudo da imobilização de células para uso na indústria de alimentos tem sido bem documentado, mas não há uma resposta universal para a indagação de qual seria o método e o suporte mais apropriado para imobilização celular (KOSSEVA, 2011).

De acordo com Giese (2015), o uso dos micro-organismos na forma imobilizada contribui para a diminuição do tempo de cultivo e para o aumento do rendimento do processo; gerando maior densidade celular, maior estabilidade e, como a matriz de imobilização pode proteger as células, ainda proporciona maior tolerância aos componentes tóxicos gerados.

O processo fermentativo de bateladas contínuas é estimulado pela imobilização celular, pois descarta a necessidade de adaptação do micro-organismo, diminui a contaminação, e facilita a recuperação do produto final, pois as células permanecem em uma região específica do biorreator. Ainda, as células podem ser utilizadas novamente, processo

chamado de reciclo, sem a necessidade de remoção dos mesmos dos fermentadores (KOSSEVA, 2011; GIESE, 2015).

Karel, Libicki & Robertson (1985 apud KOSSEVA, 2011) sugerem que é necessário o entendimento das propriedades biológicas das células imobilizadas tanto para melhora quanto para o desenvolvimento de novas técnicas. Tais propriedades são: 1) Fisiologia e morfologia da célula – são alteradas quando o micro-organismo é imobilizado; 2) Mobilidade da célula – relacionada com a capacidade do imobilizado de se desprender do suporte; e 3) Interações entre as células, o suporte e a solução. A capacidade de prever o comportamento desses sistemas facilita o *design* e a otimização do reator com células imobilizadas e a aplicação em alimentos.

Apesar das vantagens da imobilização celular, o comportamento das células muda, gerando alterações na atividade. Isto pode ser atribuído a diversos fatores, sendo os principais o efeito estérico ou conformacional, devido às interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre o suporte e o meio, e o efeito difusional, onde há resistência para a movimentação do substrato até este chegar à célula, e resistência para o produto chegar da célula ao meio (KOSSEVA, 2011).

Os métodos de imobilização de micro-organismos são baseados na imobilização de enzimas. No processo de imobilização por adsorção, a enzima ou célula é ligada a um material inerte. Por não ser um método que envolve uma reação química, no caso de enzimas, pode haver um bloqueio no sítio ativo, diminuindo a atividade destas. Como não há barreiras entre as células e a solução, pode ocorrer o desprendimento e relocação, com potencial equilíbrio entre as células livres e as células adsorvidas (KOURKOUTAS et al., 2004; ASGHER et al., 2014).

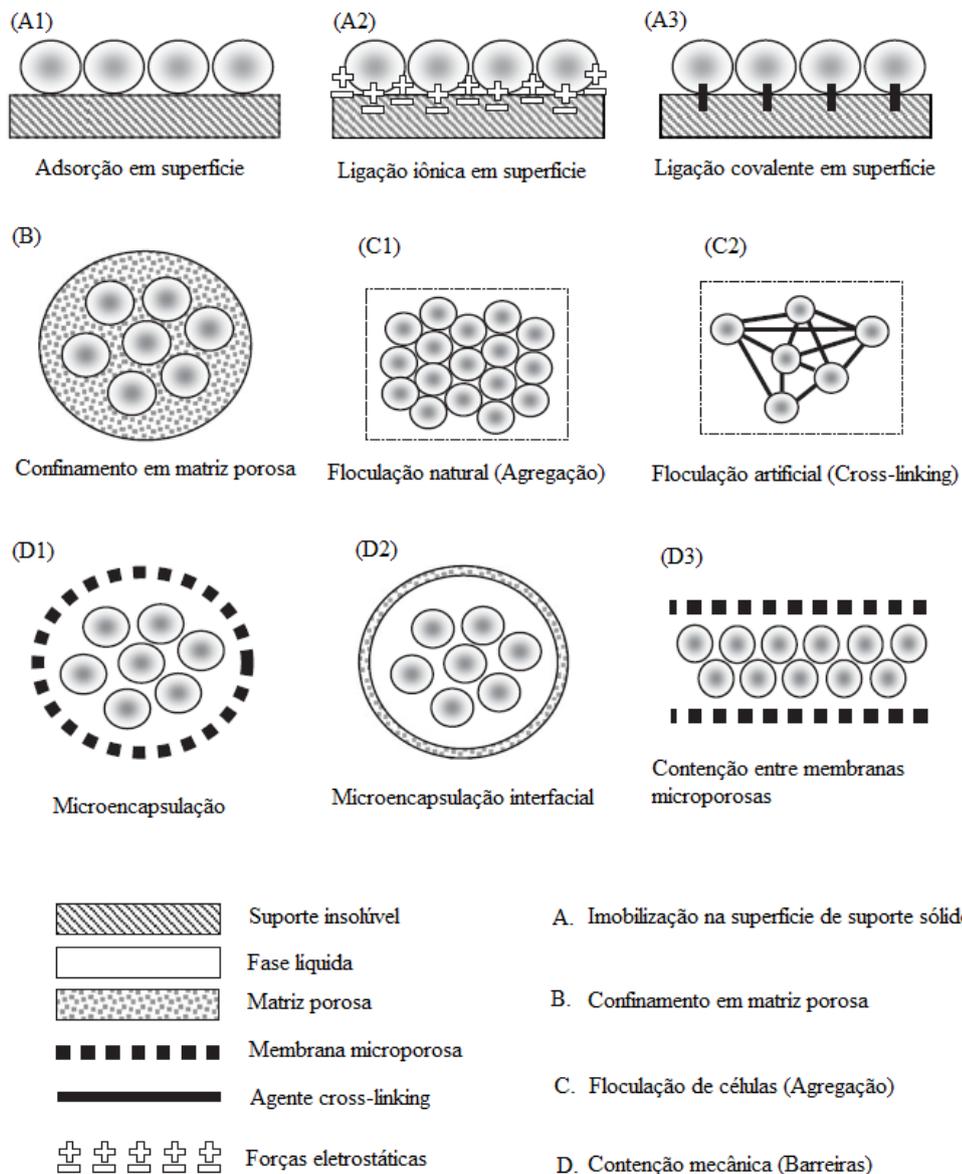
Quando o biocatalisador é ligado covalentemente, há uma reação química que envolve uma ligação direta entre a enzima/célula e o suporte. Normalmente é feita através do uso de reagentes que levam à união entre o biocatalisador e o suporte. Este método é o mais efetivo, e também pode ser feito uma ligação covalente multiponto, que aumentará a estabilidade e a reusabilidade da célula ou enzima (ASGHER et al., 2014).

O método de imobilização *cross-link* gera imobilizados mais estáveis e mais fáceis de recuperar, embora tenha alguns problemas de difusão e limitações devido à baixa resistência mecânica (ASGHER et al., 2014). O encapsulamento de células pode ser feito através de membranas microporosas, confinamento em microcápsulas ou imobilização em interface de líquidos imiscíveis. É ideal quando se precisa de produtos sem presença de células (KOURKOUTAS et al., 2004).

O uso de confinamento envolve a adsorção da enzima/célula no suporte através de interações iônicas, forças de Van der Waal e pontes de hidrogênio. O método baseia-se na inclusão das células em uma matriz rígida, prevenindo a difusão destas para o meio, embora permita a transferência de massa de nutrientes e metabólitos. Pode ser feito de dois modos: a) as células penetram na matriz até que sua mobilidade seja obstruída pela presença de outras células; ou b) o material poroso é feito *in situ* com uma cultura de células (KOURKOUTAS et al., 2004; ASGHER et al., 2014).

A Figura 4 apresenta os métodos de imobilização de modo esquematizado, facilitando o entendimento.

Figura 4: Métodos de imobilização.



FONTE: Adaptado de Kourkoutas et al. (2004).

3.3.1 Poliuretanos como suporte para imobilização

Os poliuretanos são polímeros versáteis devido à variedade dos grupos constitutivos e da possibilidade de polimerização controlada, permitindo a adaptação do processo e composição para a obtenção de materiais de aplicações variadas. As propriedades destes polímeros estão ligadas à morfologia. Esta condição permite obter uma gama de compostos com diferentes propriedades físicas, químicas e morfológicas, de acordo com necessidades específicas de uma determinada aplicação (NYARI, 2013; ANTUNES, 2015).

Um poliuretano pode ser definido como um polímero resultante da reação de um isocianato e um composto hidroxilado, em que ambos podem ser di ou polifuncionais, podendo ainda ocorrer a adição de outros reagentes para o desenvolvimento de características desejáveis (NYARI, 2013; ANTUNES, 2015).

A polimerização do poliuretano ocorre em duas fases: a) dispersão dos reagentes; e b) nucleação. Na segunda parte do processo, bolhas de ar são introduzidas através da agitação. Com o crescimento das bolhas, ocorre a difusão do gás recém-formado para as bolhas existentes; há produção de gás carbônico; o gás se expande nas bolhas em consequência do calor de reação e se difunde para as bolhas maiores (NYARI, 2013; ANTUNES, 2015).

A imobilização em espuma de poliuretano pode ocorrer de duas maneiras: na primeira, as enzimas ou células se ligam ao poliuretano por adsorção física e inclusão; na segunda, a imobilização ocorre *in situ* durante a síntese do poliuretano. Nesse caso, não há consenso entre os autores, onde alguns propõem que a imobilização se dá via confinamento vinculado com ligações químicas durante a síntese da espuma de poliuretano, e outros sugerem que a imobilização ocorre através de ligações covalentes e adsorção física na superfície, e o confinamento no poliuretano tem pouca influência no processo de imobilização (BUSTAMANTE-VARGAS et al., 2015).

As células de micro-organismos são aderidas ao suporte e mecanicamente retidas nos poros da espuma, permitindo a otimização dos fluxos de substratos e produtos entre as espécies imobilizadas na matriz polimérica (NYARI, 2013).

Tendo em vista as características exploradas nesta seção, buscou-se determinar os melhores métodos para realização do presente trabalho, que se encontram no capítulo a seguir.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste item serão apresentadas as metodologias utilizadas na produção de goma xantana a partir de *X. campestris* livre e imobilizada, assim como o processo de imobilização em poliuretano, ciclos operacionais contínuos e estabilidade de estocagem.

4.1 MICRO-ORGANISMO

A cepa da bactéria *X. campestris* (ATCC 13951) foi obtida da Fundação André Tosello, na forma ultracongelada a -80°C . O micro-organismo foi reativado através de repiques sucessivos em placas contendo meio Ágar Yeast Malt (YMA).

4.2 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA COM *Xanthomonas campestris* LIVRE

Após a reativação da bactéria, a produção de células foi realizada em duas etapas. Primeiro preparou-se um pré-inóculo, partindo de uma alçada de cultura crescida sobre ágar YM e incubada em estufa por 24 h, na temperatura de 35°C . Esta foi então inoculada em 10 mL de meio YM líquido, em erlenmeyers com capacidade de 50 mL, incubado em *shaker* com agitação de 180 rpm, a uma temperatura de 28°C , durante 24 h, condições estas baseadas nos estudos realizados por García-Ochoa et al. (2000), Leela & Sharma (2000), Rottava et al. (2009), Lopes et al. (2015), Subhash, Jadhav & Jana (2015) e Li et al. (2016). Decorrido o tempo de incubação, as células foram decantadas através de centrifugação a 9625 g, 4°C durante 30 minutos, ressuspendidas em 10 mL de água destilada estéril e inoculadas no meio para produção de goma.

A produção de goma xantana ocorreu em meio YM modificado, composto por: sacarose (50 g/L, Synth), fosfato de potássio dibásico (5 g/L, Cinética), fosfato de amônio monobásico (2,5 g/L, Vetec), sulfato de amônio (2 g/L, Nuclear), ácido bórico (0,006 g/L, Dinâmica), cloreto férrico (0,0024 g/L, Merck), cloreto de cálcio (0,002 g/L, Synth) e sulfato de zinco (0,002 g/L, Merck). Em erlenmeyers de 250 mL adicionou-se 90 mL de meio de cultura, e 10mL de inóculo contendo *X. campestris* na concentração de aproximadamente 10^5 UFC/mL, os quais foram incubados a 28°C , 180 rpm por 96 h (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ROTTAVA et al., 2009; LI et al., 2016). Amostras foram coletadas de tempos em

tempos para quantificação de goma xantana, células e consumo de substratos (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ROTTAVA et al., 2009; LI et al., 2016).

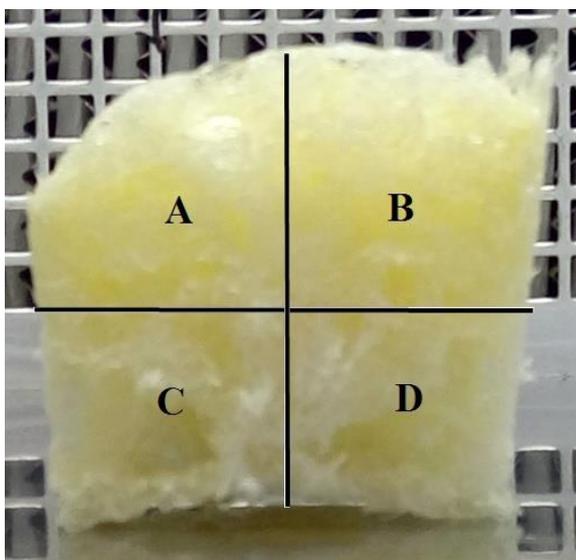
4.3 IMOBILIZAÇÃO de *Xanthomonas campestris* IN SITU EM ESPUMA DE POLIURETANO

A imobilização em poliuretano (PU) foi desenvolvida adaptando as condições descritas por Nyari et al. (2016). Centrifugou-se 10 mL de meio de cultura contendo 10^5 UFC/mL e seu precipitado (aproximadamente 0,45 g) foi resuspendido em 1 mL de água destilada estéril. Este inóculo foi adicionado a 6 mL de polioliol e homogeneizado. Então, 4 mL isocianato foram acrescentadas à mistura sob agitação constante. A polimerização foi realizada a temperatura ambiente, e após 24 h de secagem a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), a espuma resultante foi cortada em cubos de 1 cm^3 .

4.4 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR NO POLIURETANO

A imobilização foi analisada em relação à distribuição espacial das células microbianas nos cubos de poliuretano. Para isso, o poliuretano foi dividido verticalmente, com o auxílio de bisturi. A partir dessa divisão, a espuma foi classificada em A, B, C e D, de acordo com a Figura 5.

Figura 5: Diagrama do processo de divisão da espuma para análise de distribuição de micro-organismos.



Cada fração resultante foi cortada em cubos de aproximadamente 1 cm³, e os cubos foram fermentados separadamente por 96 h. Após o tempo de fermentação, foram feitas análises de desprendimento de biomassa e produção de goma.

4.5 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA COM *Xanthomonas campestris* IMOBILIZADA

Os cubos de espuma contendo as células de *X. campestris* imobilizadas foram imersos em meio de cultura YM modificado (50 g/L de sacarose, 5 g/L de fosfato de potássio dibásico, 2,5 g/L de fosfato de amônio monobásico, 2 g/L de sulfato de amônio, 0,006 g/L de ácido bórico, 0,0024 g/L de cloreto férrico, 0,002 g/L de cloreto de cálcio e 0,002 g/L de sulfato de zinco) na proporção de 1 cubo para 9 mL de meio, imediatamente após o término da secagem. As condições de cultivo foram 28° C, 180 rpm por 96 h. Amostras foram coletadas de tempos em tempos para quantificação de goma xantana, células e consumo de substratos.

A fim de maximizar a produção de goma xantana a partir do biocatalisador imobilizado, foram realizadas fermentações com variação na quantidade de cubos de poliuretano (1, 3, 5 e 10 cubos) no meio reacional, respeitando a razão de 1 cubo para 9 mL de meio.

4.6 PARÂMETROS CINÉTICOS DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

A partir dos valores globais de biomassa, substrato e produto, em relação ao tempo, é possível determinar as velocidades de crescimento microbiano (r_x), consumo de substrato (r_s , carbono) e formação de produto (r_p), utilizando as equações 1 a 3 (BAILEY & OLLIS, 1986), tanto para o micro-organismo livre, quanto para *X. campestris* imobilizada.

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (2)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

Onde: $dX = X_f - X_0$, sendo X_f a concentração de biomassa no tempo t_f e X_0 a concentração de biomassa no tempo zero. Em relação ao consumo de substrato: $dS = S_f - S_0$, onde S_f representa o substrato medido no tempo t_f e S_0 a medida de substrato no tempo zero. Quanto a formação de produto: $dP = P_f - P_0$, sendo P_f a quantidade de produto no tempo t_f e P_0 a quantidade de produto no tempo zero. Em relação ao tempo, $dt = t_f - t_0$, onde t_f representa 96 horas e t_0 o tempo inicial.

Para o cálculo da velocidade de crescimento microbiano (r_x) do micro-organismo imobilizado, considerou-se que: (a) as células resultantes da duplicação celular não possuem a capacidade de ficar aderidas à matriz polimérica, e (b) as células confinadas ao poliuretano têm velocidade de crescimento (r_x) similar às que se difundiram da matriz de poliuretano para o meio.

Partindo dos resultados obtidos nas equações 1 a 3, determinou-se os valores dos fatores de conversão de substrato (carbono) em células ($Y_{X/S}$) e de substrato em goma xantana ($Y_{P/S}$), conforme as equações 4 e 5 (BAILEY & OLLIS, 1986).

$$Y_{X/S} = \frac{r_x}{r_s} \quad (4)$$

$$Y_{P/S} = \frac{r_p}{r_s} \quad (5)$$

4.7 ESTABILIDADE OPERACIONAL

A estabilidade da imobilização foi avaliada através de ciclos operacionais contínuos. Após uma fermentação de 96 h, utilizando a proporção de 1 cubo para 9 mL de meio de cultura, os cubos de poliuretano foram lavados com água destilada estéril e utilizados em uma nova fermentação. Para cada fermentação ocorrida, foram realizadas análises de desprendimento de biomassa e de produção de goma após 96 horas. Os ciclos foram realizados até se obter um rendimento menor que 50% do valor inicial.

4.8 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM

A fim de avaliar a estabilidade de estocagem do biocatalisador imobilizado, os cubos, após o tempo de secagem, foram cortados e imediatamente armazenados em geladeira (4°C),

freezer (-4°C), e ultrafreezer (-80°C) por 30 dias. Decorrido o tempo de armazenamento, os cubos foram fermentados (nas condições descritas no item 4.5, utilizando 1 cubo para 9 mL de meio) e análises de quantificação de biomassa e goma xantana foram realizadas.

4.9 METODOLOGIA ANALÍTICA

As análises de quantificação de células, quantificação de goma xantana e de consumo de substrato foram feitas utilizando amostragem destrutiva. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.9.1 Quantificação de células

A quantificação de células foi feita através da técnica de peso seco. O conteúdo do erlenmeyer (10 mL) foi vertido em um tubo falcon previamente dessecado e pesado. Centrifugou-se a amostra a 9625 g, durante 30 minutos, em 4°C, causando a decantação das células presentes. O sobrenadante, contendo a goma xantana, foi removido assepticamente e o precipitado foi lavado com água destilada e centrifugado novamente. A amostra foi transferida para uma placa de petri e colocada em estufa a 105°C até peso constante (SILVA et al., 2009).

Em relação às células imobilizadas, realizou-se a quantificação de biomassa desprendida do poliuretano para o meio através do mesmo método, apenas removendo o cubo de poliuretano do meio previamente à centrifugação.

4.9.2 Quantificação de goma

A quantificação de goma foi realizada utilizando o sobrenadante resultante da primeira centrifugação do item 4.9.1. Este foi misturado assepticamente com isopropanol (Dinâmica®, 99,5%) na proporção 1:3 e centrifugado nas mesmas condições. Após a centrifugação, colocou-se a amostra em placa de petri, previamente dessecada, e armazenada em estufa a 50°C até peso constante (NIKNEZHAD et al., 2016).

4.9.3 Consumo de substrato

O consumo de fontes de nitrogênio e de carbono foi feito através das técnicas de Nitrogênio Total e Carbono Orgânico Total (TOC-V SHIMADZU) (GENG et al., 2017).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do estudo referente ao processo de imobilização de *X. campestris* e produção de goma xantana utilizando o biocatalisador imobilizado.

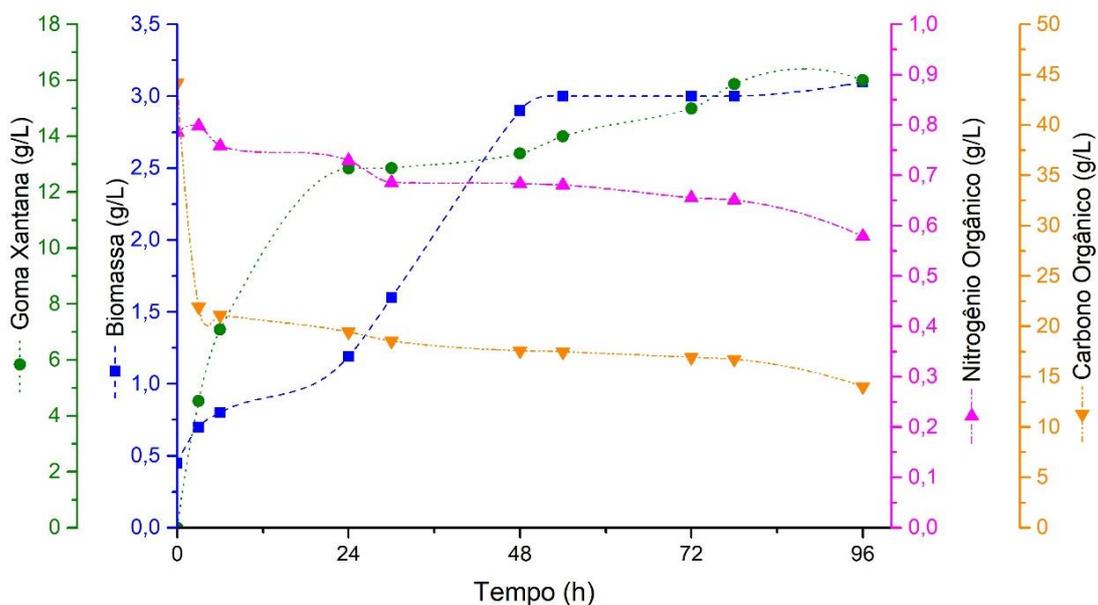
5.1 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO LIVRE

A Figura 6 apresenta os resultados da produção de goma xantana, ao longo de 96 horas de cultivo, a partir de *X. campestris* livre. Observa-se que a máxima produção de goma xantana (16 g/L) ocorreu em 96 horas de fermentação. Destaca-se que, nas primeiras 24 horas de fermentação, a produção é exponencial e, com o decorrer do tempo, se torna mais linearizada. O aumento da viscosidade do meio pode levar a problemas de transferência de massa, assim como a queda de pH com o decorrer do tempo de fermentação, fatores que podem explicar a menor velocidade de produção a partir de 24 horas.

A fase log do crescimento da *X. campestris* ocorre entre as 24 e 48 horas, sendo que após 48 horas a biomassa atinge a fase estacionária.

Em relação ao consumo de substrato, 50,37% do carbono disponível foi consumido nas primeiras três horas. Após 96 horas, houve uma redução de 68,26% do carbono inicial. O nitrogênio disponível teve um consumo baixo e linear (26,35% em 96 horas).

Figura 6: Produção de goma xantana com *X. campestris* livre.



Leela & Sharma (2000) alcançaram produção similar, 14-16 g/L, utilizando 10% de inóculo e partindo de uma concentração de 20 g/L de glicose. Esgalhado, Roseiro e Collaço (1995) obtiveram resultados semelhantes ao usar *X. campestris* NRRL B-1459, com uma produção de goma xantana de 17,7 g/L e uma concentração de biomassa de 3,2 g/L após fermentação em shaker orbital a 200 rpm, partindo de 30 g/L de glicose, assim como Casas, Santos e García-Ochoa (2000), que, com uma concentração de 40 g/L de sacarose, 28°C e 500 rpm, obtiveram 17 g/L de goma xantana.

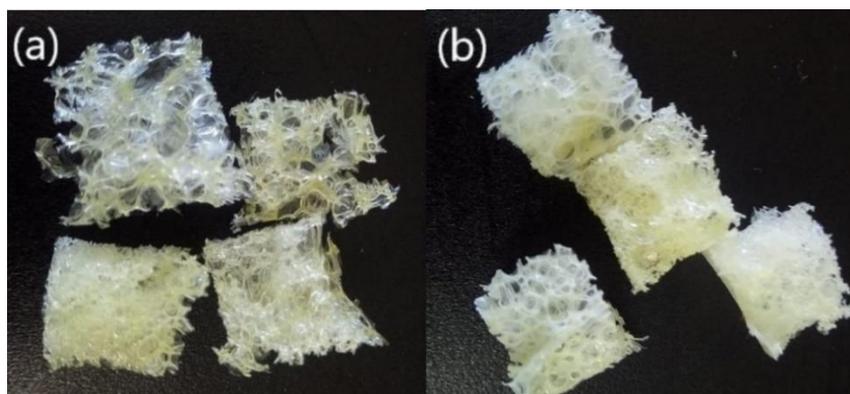
Já Mirik et al. (2011), ao usarem o mesmo micro-organismo (*X. campestris* NRRL B-1459), mas em condições diferenciadas (30°C, 250 rpm, concentração inicial de glicose de 40 g/L) obtiveram uma produção máxima de 14,8 g/L de goma xantana. Umashankar et al. (1996) atingiram produção máxima de 9 g/L, iniciando a fermentação com 30 g/L de glicose e 500 rpm, em 30°C.

O uso de fontes alternativas de carbono (subprodutos) tende a aumentar a produção de goma xantana, como pode ser observado em diversos trabalhos. Tal fato possivelmente ocorre pelos resíduos industriais terem, além de açúcares, diversos minerais necessários para a manutenção celular. O uso de 175 g/L de xarope de beterraba permitiu Kalogiannis et al. (2003) produzirem 53 g/L de goma xantana em 24 horas ao fermentar *X. campestris* ATTC 1395 a 28°C e 200 rpm. Mesomo et al. (2009), utilizando soro de leite obtido a partir da produção de queijo, obteve uma produção de goma xantana de 36 g/L, ao fermentar *X. campestris pv mangiferaeindicae* IBSBF 1230 a 28°C e 390 rpm. A partir de 84,68 g/L de suco de tâmara (padronizado em 20° Brix), Salah et al. (2010) atingiram produção de 43,35 g/L de goma xantana, com fermentação em 30,1°C e 180 rpm.

5.2 IMOBILIZAÇÃO DE *Xanthomonas campestris* IN SITU EM ESPUMA DE POLIURETANO

A Figura 7 apresenta uma comparação entre o poliuretano controle (sem micro-organismo), e o poliuretano contendo células imobilizadas de *X. campestris*. Através desta, observa-se que a adição de células não ocasionou mudanças visíveis no poliuretano.

Figura 7: Comparação entre o poliuretano controle (A) e poliuretano contendo células imobilizadas de *X. campestris* (B).



5.3 AVALIAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR NO POLIURETANO

A fim de analisar a distribuição de micro-organismos no poliuretano após a imobilização, segmentou-se o suporte em quatro frações, conforme a Figura 5. Após a divisão, os cubos resultantes foram fermentados durante 96 horas, e posteriormente quantificou-se a biomassa desprendida do poliuretano e a goma xantana presente, cujos resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de biomassa e goma xantana obtidos de diferentes frações do poliuretano, após fermentação de 96 horas.

Fração	Desprendimento de células (g/L)	Produção de goma (g/L)
A	$1,04 \pm 0,12^a$	$52,47 \pm 3,02^a$
B	$1,33 \pm 0,16^a$	$58,27 \pm 3,12^a$
C	$1,14 \pm 0,10^a$	$54,67 \pm 2,33^a$
D	$1,06 \pm 0,13^a$	$55,30 \pm 1,69^a$

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 0,5% nas colunas.

É possível observar que não houve diferença significativa tanto nos valores de biomassa desprendida do poliuretano para o meio quanto em relação à produção de goma xantana. Tal fato sugere que a distribuição do micro-organismo no poliuretano foi homogênea, possibilitando o uso de todas as frações para produção de goma xantana através de fermentação com o imobilizado.

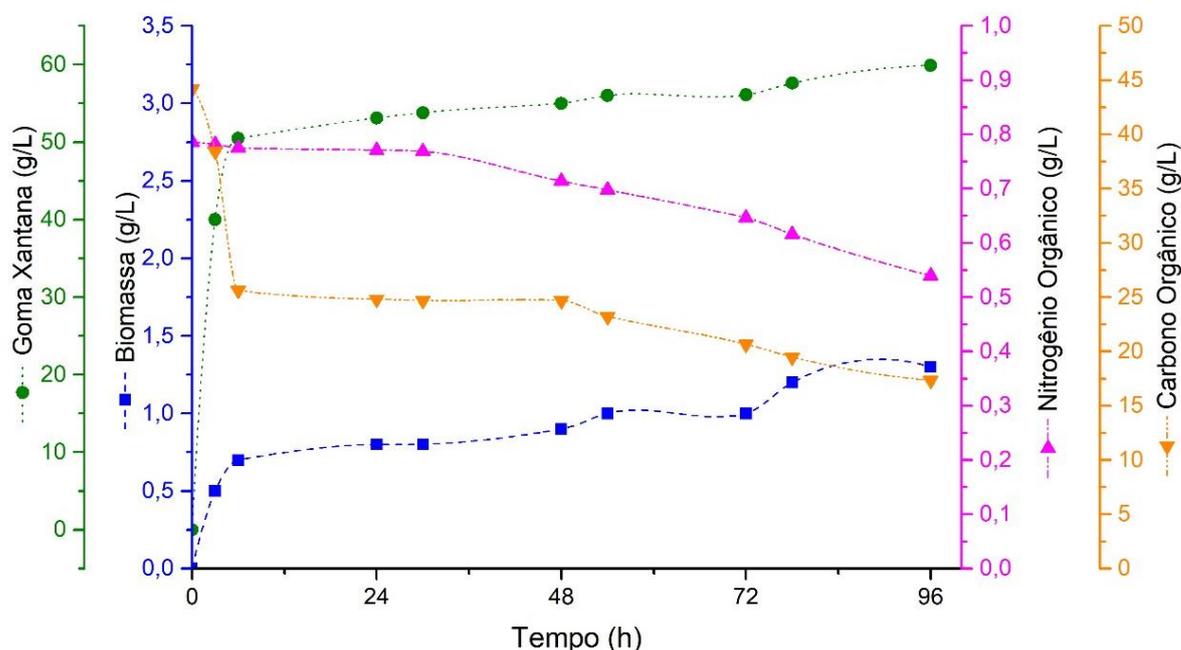
Tais resultados demonstram que o processo de imobilização viabilizou a manutenção do metabolismo da célula, mostrando que não houve desnaturação da célula, além de permitir

a permeabilidade do substrato entre a matriz do suporte e a saída do produto (NYARI et al., 2016).

5.4 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA COM *Xanthomonas campestris* IMOBILIZADA

A Figura 8 apresenta os resultados da produção de goma xantana a partir do micro-organismo imobilizado. Pode-se observar que a imobilização de *X. campestris in situ* em poliuretano foi positiva para a produção de goma xantana, atingindo sua fase estacionária de produção em 24 horas. A produção máxima obtida foi de 59,9, resultando em um aumento de 274% de produção de goma em relação à fermentação com o micro-organismo livre. O consumo de substrato se deu de forma mais lenta, onde 13,06% do carbono disponível foi utilizado pelas células nas primeiras três horas. Passadas 96 horas, 60,78% do carbono foi consumido. Em relação ao nitrogênio, o consumo deste foi de 31,3% após 96 horas.

Figura 8: Produção de goma xantana com *Xanthomonas campestris* imobilizada em poliuretano.



Um aumento de eficiência também foi visualizado por Nie et al. (2016), que imobilizaram *Pseudomonas aeruginosa* NY3 em poliuretano a fim de remover hidrocarbonetos de efluente com alta concentração de óleo. Essa melhoria de rendimento possivelmente se deve às ótimas características do poliuretano como um suporte, como suas excelentes propriedades mecânicas, porosidade, resistência aos solventes orgânicos e grande

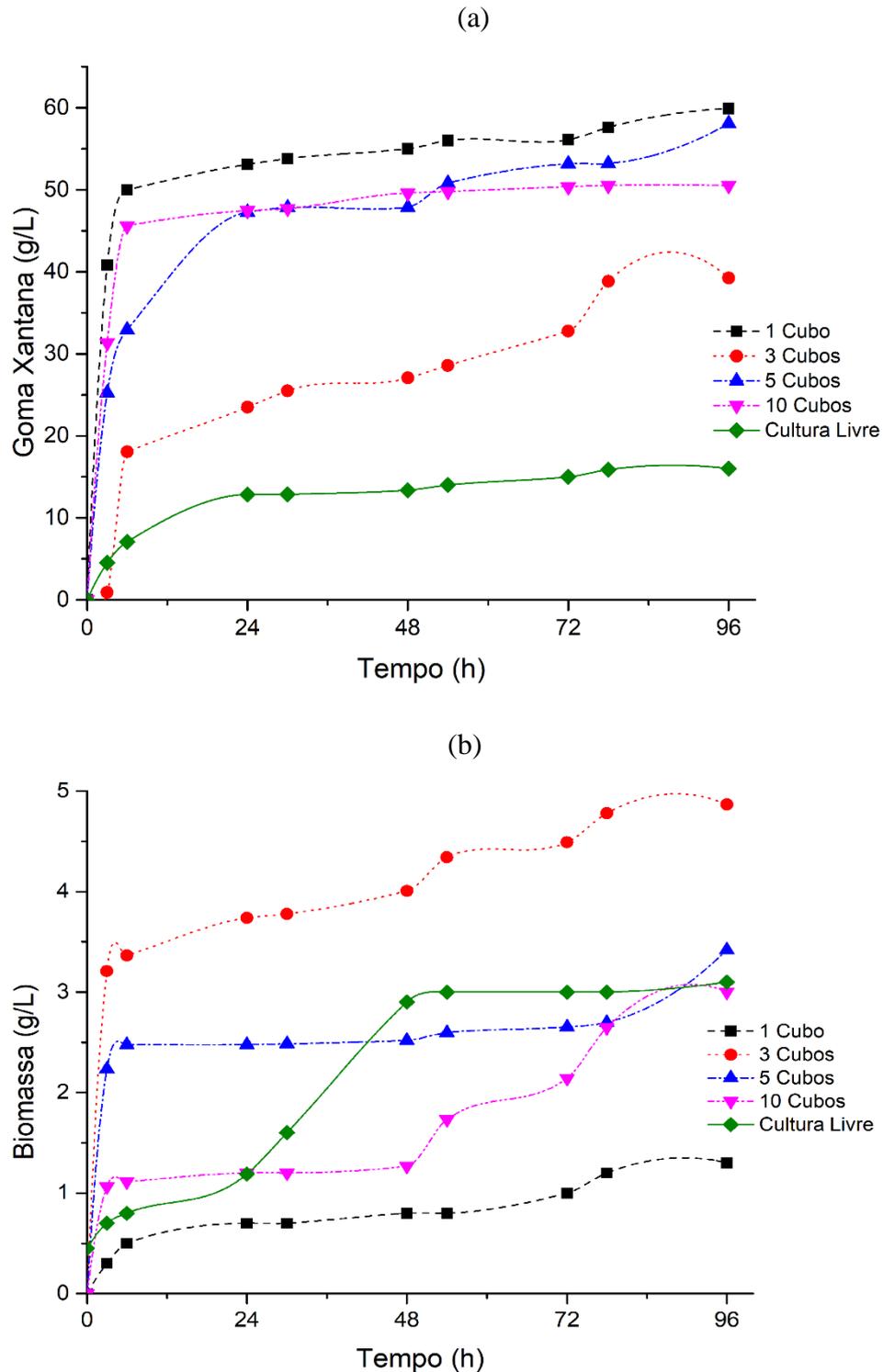
área exposta. Além disso, as características hidrofóbicas do poliuretano permitem uma interação forte com a maioria das células microbianas, fazendo com que a espuma de poliuretano seja um material apropriado para a imobilização de micro-organismos (NIE et al., 2016). Ainda, a imobilização altera as propriedades físico-químicas do microambiente, o que inclui as cargas iônicas, atividade de água, tensão superficial e pressão osmótica (PATIL et al., 2006).

Ao imobilizar *Ganoderma lucidum* em poliuretano visando produção de exopolissacarídeos, Wan-Mohtar et al. (2016) similarmente obtiveram elevada produção, justificando através da redução das limitações de transferência de massa, que possibilitou maior acesso ao substrato por parte das células. Niknezhad et al. (2016), ao imobilizar *X. campestris* em esferas de alginato de cálcio com álcool polivinílico, obteve um aumento de 17% em relação a produção de goma xantana com o micro-organismo livre fermentado em glicose. A melhoria relativamente menor é explicada por Patil et al. (2006), que traz que, devido a porosidade e força mecânica, as células imobilizadas em espuma de poliuretano tem mais estabilidade e atividade microbiana do que as imobilizadas em alginato.

Também é visível através da Figura 8 que a quantificação de células que se difundiram do poliuretano para o meio apresentou um valor crescente durante as 96 horas de fermentação. É possível que esse valor represente as células resultantes da duplicação celular, pois a imobilização não impede a reprodução do micro-organismo, e as células difundidas continuam metabolicamente ativas (ALONSO; RENDUELES; DÍAZ, 2015). Diversos fatores influenciam a adesão dos micro-organismos na matriz, tais como a idade e o estado fisiológico das células. Além disso, as estruturas superficiais, como flagelos e outros apêndices, as cargas e a hidrofobicidade também têm um papel importante na aderência das células em superfícies sólidas (MARTINS et al., 2013).

A Figura 9 apresenta a produção de goma xantana e difusão de biomassa a partir de quantidades de cubos variadas, visando verificar se há maior rendimento a partir da maior concentração de células no meio reacional.

Figura 9: Produção de goma xantana (a) e difusão de biomassa (b) variando a concentração de cubos de poliuretano no meio reacional.



A partir da análise da Figura 9a, verifica-se que, independentemente da quantidade de cubos utilizados, há aumento da produção de goma xantana em relação à produção a partir do micro-organismo livre. As fermentações a partir de 1, 5 e 10 cubos tiveram comportamento

semelhante, e resultaram em valores de goma xantana maiores que 50 g/L após decorridas 96 horas do início da fermentação. Ao se usar três cubos no meio reacional, foi possível perceber uma tendência diferenciada de produção de goma, além de um valor menor após transcorridas 96 horas (39,26 g/L). É possível observar, através da Figura 9b, que a fermentação utilizando apenas um cubo como inóculo teve menor difusão em relação aos outros. Tanto a reação usando cinco cubos, quanto a usando 10 cubos mostraram valores de células desprendidas próximos aos obtidos através da fermentação com o micro-organismo livre, após 78 horas. O comportamento da difusão de biomassa usando três cubos como inóculo não foi apenas diferenciado, como também proporcionou maior valor de células desprendidas.

Após obterem-se os valores, foi feita análise estatística da produção de goma e difusão de biomassa no ponto de 96 horas, cujos resultados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Produção de goma xantana e difusão de biomassa a partir de diversas concentrações de células, em 96 horas de fermentação.

Fermentação	Produção de goma xantana (g/L)	Biomassa difundida da matriz (g/L)
1 cubo	59,90 ± 0,36 ^a	1,30 ± 0,03 ^c
3 cubos	39,26 ± 0,40 ^c	4,87 ± 0,48 ^a
5 cubos	58,08 ± 0,12 ^a	3,42 ± 0,06 ^b
10 cubos	50,50 ± 0,12 ^b	3,00 ± 0,30 ^b
Livre	16,00 ± 3,00 ^d	3,10 ± 0,28 ^b

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 0,5% nas colunas.

Assim, verifica-se que não há diferença significativa entre a produção de goma xantana em fermentações com 1 ou 5 cubos em 96 h. As outras condições de fermentações têm produção de goma xantana estatisticamente diferentes entre si.

Verifica-se, portanto, que as fermentações com cinco e dez cubos, apesar de proporcionarem rendimento de mais de 50 g/L de goma xantana, tiveram uma alta taxa de difusão de células, não sendo estes valores diferentes estatisticamente das células obtidas após 96 horas de fermentação com o micro-organismo livre. A reação a partir de um cubo foi onde obteve-se menor difusão de biomassa, e a fermentação com três cubos mostrou grande desprendimento de células após 96 horas, além de comportamento diferenciado durante a reação.

Ao aumentar a quantidade de cubos presentes no início da fermentação, assim como o meio de cultura, na mesma proporção inicialmente utilizada (1 cubo:9 mL de meio), foi necessário aumentar o tamanho do Erlenmeyer utilizado. Embora o aumento do meio disponível para as células tenha sido proporcional, o aumento do volume total dos frascos não foi linear, sendo possível que este tenha influenciado na disponibilidade de espaço para movimentação dos cubos e, portanto, na transferência de massa.

5.5 PARÂMETROS CINÉTICOS DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

A partir dos resultados obtidos na fermentação de *X. campestris* livre e imobilizada em poliuretano, foi possível calcular os parâmetros cinéticos do processo, apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos do processo de fermentação de *Xanthomonas campestris* livre e imobilizada.

Micro-organismo	r_x (g.L⁻¹.h⁻¹)	r_s (g.L⁻¹.h⁻¹)	r_p (g.L⁻¹.h⁻¹)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$
Livre	0,03	0,31	0,17	0,09	0,53
Imobilizado	0,01	0,28	0,62	0,03	2,23

Ao analisar a Tabela 4, pode-se observar que a imobilização foi positiva para a produção de goma xantana do processo. A velocidade de crescimento microbiano r_x de *X. campestris* livre é três vezes maior que a velocidade de crescimento das células imobilizadas, sendo plausível pressupor que a imobilização, de alguma maneira, reduz a duplicação celular ou esta passa a ocorrer mais lentamente, possivelmente devida à restrição física do suporte.

Em relação aos valores de velocidade de consumo de substrato, tanto o micro-organismo livre quanto o imobilizado apresentaram valores próximos ao de Rottava (2005), que obteve um r_s médio de 0,32 g.L⁻¹.h⁻¹ ao selecionar linhagens de *X. campestris* para a produção de goma xantana. Também é possível observar que a imobilização diminui o fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$). Diversos estudos mostram que a imobilização, especialmente em matrizes porosas como poliuretano, faz com que o acesso ao substrato seja facilitado (PATIL et al., 2006; ASGHER et al., 2014; ANTUNES, 2015; NIE et al., 2016; NYARI et al., 2016; WAN-MOHTAR et al., 2016), sugerindo, novamente, que a imobilização altera o metabolismo celular em relação ao crescimento das células.

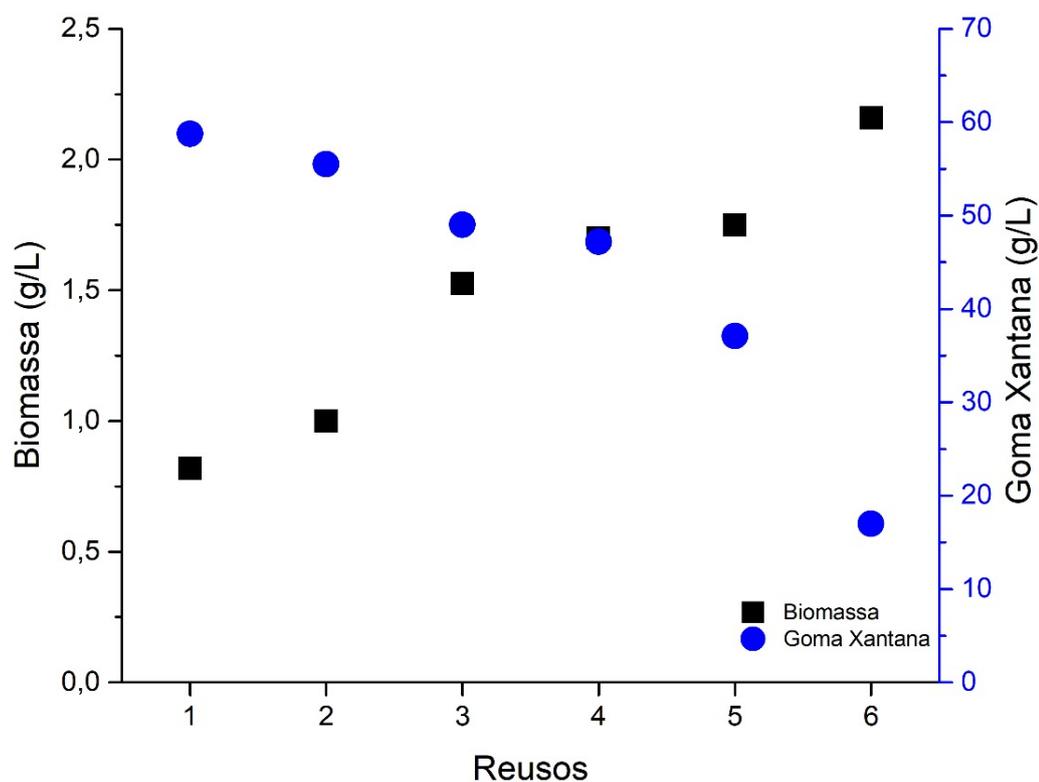
A velocidade de formação do produto r_p do micro-organismo livre é 3,65 vezes menor do que a formação de produto através das células imobilizadas, onde o valor r_p obtido a partir

de *X. campestris* imobilizada foi semelhante ao encontrado por Faria et al. (2009), de $0,63 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ao produzir goma xantana em biorreator em condições otimizadas. Assim, nota-se que a imobilização celular, embora tenha diminuído o valor da velocidade de crescimento das células, aumentou a produção de goma xantana. O fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) teve seu valor elevado em 4,21 vezes com a imobilização das células de *X. campestris*, sendo este 9,65 vezes maior que a média obtida por Rottava (2005) e 6,19 vezes maior em relação ao relatado por Brandão et al. (2013), ao produzir goma xantana a partir de glicerol.

5.6 ESTABILIDADE OPERACIONAL

A Figura 10 traz os resultados de produção de goma xantana pelo imobilizado, e a difusão de biomassa do poliuretano para o meio após reciclos contínuos até obtenção de rendimento menor que 50% do inicial, juntamente com os dados referentes ao rendimento das fermentações, calculados a partir do peso de goma xantana obtidos em cada reciclo. O aspecto dos cubos de poliuretano após o reciclo reacional constante pode ser observado na Figura 11.

Figura 10: Comportamento de *Xanthomonas campestris* imobilizada *in situ* em poliuretano submetida a reusos sucessivos.



As células imobilizadas mostraram capacidade de reutilização, e seis fermentações em batelada puderam ser realizadas. Pode-se observar, a partir dos dados acima, que o rendimento da goma xantana diminui conforme os ciclos ocorrem, caindo drasticamente no sexto reuso, onde se obteve valor menor que 50% do rendimento inicial. As fermentações constantes mostram que, conforme se desenvolvem os ciclos, reduz a produção de polissacarídeo e aumenta a concentração de células livres.

O valor da biomassa que se difundiu do poliuretano para o meio aumenta a cada reciclo, reiterando que parte das células oriundas da reprodução não ficam aderidas à matriz. Assim, ao reinocular o cubo de poliuretano em novo meio, não somente o micro-organismo mantém-se metabolicamente ativo e produz novas células, que se propagam no meio de cultura, mas células que estão fracamente aderidas ao poliuretano também se disseminam (MARTINS et al., 2013; ALONSO, RENDUELES & DÍAZ, 2015).

Figura 11: Aspectos dos cubos de poliuretano com *Xanthomonas campestris* imobilizada *in situ* após 6 reciclos.



Após seis ciclos reacionais constantes, pode-se observar a goma aderida ao cubo de poliuretano. Tal comportamento não foi observado nos ciclos anteriores, possivelmente sendo a razão da queda de 34,2% de produção de goma xantana entre o quinto e o sexto reciclo. É possível supor que o invólucro de goma formado dificultou o acesso das células ao substrato, influenciando na transferência de massa necessária para a produção de goma.

A goma que recobria o poliuretano foi facilmente retirada com o auxílio de pinças. O poliuretano estava visualmente idêntico à fermentação inicial, mostrando assim sua estabilidade mecânica.

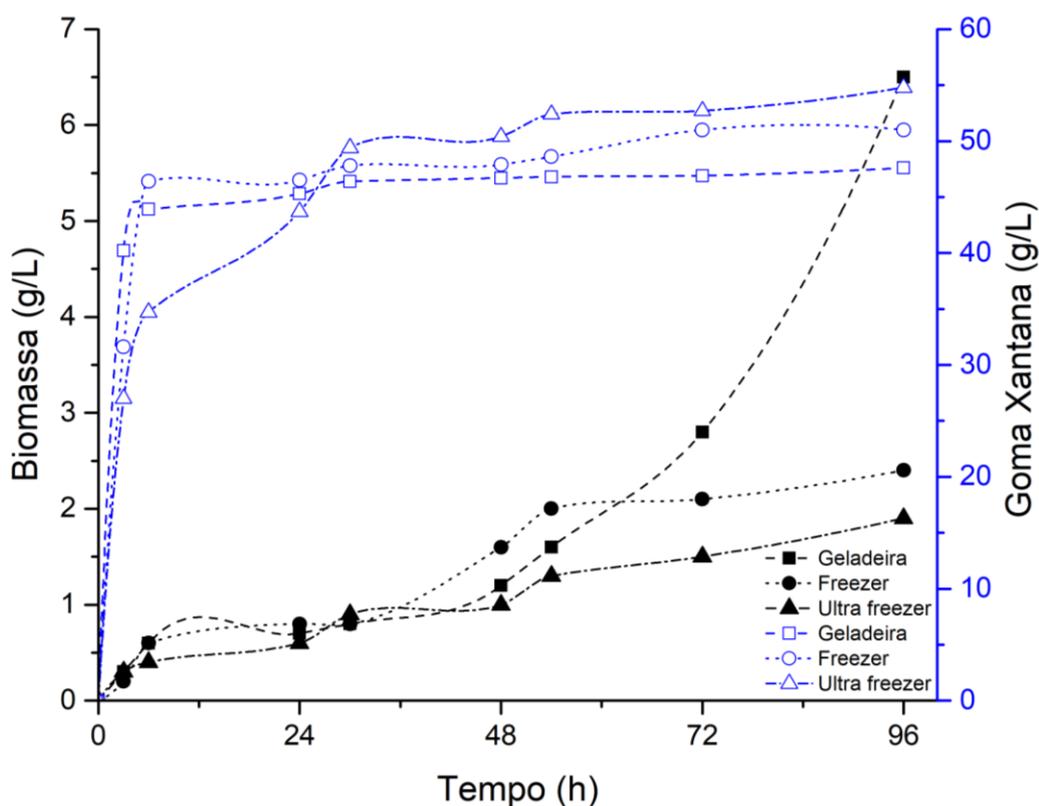
Niknezhad et al. (2016), após imobilizar *X. campestris* em cápsulas de alginato de cálcio observaram que estas eram inapropriadas para fermentações contínuas, pois houve

rompimento durante o primeiro uso. Após adicionar álcool polivinílico ao alginato de cálcio, os autores obtiveram maior estabilidade mecânica das cápsulas, possibilitando três ciclos constantes, com queda na produção de goma xantana conforme os reusos ocorriam. Usando glicose como fonte de carbono, o aumento de rendimento na primeira fermentação foi de 17% em relação às células livres, e ao alterar a fonte de carbono de glicose para amido, os autores observaram aumento de 40% da produção da goma xantana (NIKNEZHAD et al., 2016).

5.7 ESTABILIDADE DE ESTOCAGEM

A estabilidade de armazenamento é um fator essencial para aplicações práticas de células imobilizadas. A viabilidade do micro-organismo imobilizado foi analisada após armazenamento durante 30 dias em três condições: em ultrafreezer (-80°C), freezer (-4°C) e em geladeira (4°C). Após decorrido o tempo de armazenamento, os cubos de poliuretano foram fermentados e fez-se cinéticas de produção de goma xantana e de biomassa difundida dos cubos para o meio, que podem ser observadas na Figura 12.

Figura 12: Produção de goma xantana e difusão de biomassa através de *Xanthomonas campestris* imobilizada após armazenamento por 30 dias em diferentes temperaturas.



Ao analisar a Figura 12, vê-se que, primeiramente, o micro-organismo imobilizado continua viável após ser armazenado por 30 dias. Ainda, as células na matriz tiveram capacidade de produzir goma xantana em todas as condições de armazenamento, com rendimentos maiores que 45 g/L após 30 horas de fermentação. Decorrido este tempo, a produção de goma se estabiliza, independente da condição de armazenamento. Porém, é possível ver comportamentos diferentes na difusão de células da matriz para o meio. Após ser armazenado durante trinta dias em ultrafreezer (-80°C), o imobilizado apresentou 1,9 g/L de células soltas em 96 horas de fermentação, enquanto o armazenamento em freezer gerou difusão de 2,4 g/L e em geladeira de 6,5 g/L. Os resultados de difusão de biomassa e de produção de goma xantana após 96 horas podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5: Produção de goma xantana e difusão de biomassa a partir de cubos de poliuretano com imobilizado, armazenados durante 30 dias em diferentes temperaturas, em 96 horas de fermentação.

Armazenamento	Difusão de biomassa (g/L)	Produção de goma xantana (g/L)
Ultrafreezer	1,90 ± 0,17 ^c	54,80 ± 0,30 ^a
Freezer	2,40 ± 0,34 ^b	51,00 ± 0,24 ^b
Geladeira	6,50 ± 0,38 ^a	47,60 ± 0,25 ^c

Letras iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 0,5%.

Através da análise estatística da Tabela 5, pode-se ver que, apesar de produções de goma xantana relativamente próximas, estas são estatisticamente diferentes, assim como a difusão de biomassa. A temperatura em que um micro-organismo é mantido está intrinsicamente ligada com o metabolismo da célula.

Temperaturas abaixo de -20°C previnem o crescimento microbiano, mas não necessariamente causam morte celular, e a maneira como as células são armazenadas é de plena importância. Apesar da divisão celular não ocorrer, o metabolismo celular pode se manter ativo (MADIGAN et al., 2012). Assim, além de o armazenamento na temperatura de -80°C oferecer maior garantia da suspensão da atividade celular, a matriz de poliuretano atua como barreira para o frio, reduzindo a possibilidade de injúria decorrente das condições de armazenamento e prolongando a vida útil da cultura.

6 CONCLUSÕES

Esse estudo apresenta um método de aumento de produção de goma xantana, através da síntese de poliuretano e simultânea imobilização *in situ* do micro-organismo *X. campestris*, até então não relatada na literatura.

A utilização da estratégia de imobilização de *X. campestris* para produção de goma xantana mostrou-se efetiva ao manter inalteradas as características físicas do poliuretano e possibilitando uma distribuição uniforme de células na matriz polimérica.

O emprego do micro-organismo imobilizado apresentou um aumento de 274% na produção de goma xantana. A variação na quantidade de biomassa presente, a partir do aumento de cubos de poliuretano com células imobilizadas, não se mostrou eficiente, onde a maior produção obtida foi a partir de fermentações com 1 e 5 cubos (59,9 e 58,08 g/L, respectivamente), sendo estas idênticas estatisticamente.

Através da análise dos parâmetros cinéticos da fermentação com as células livres e imobilizadas, pode-se observar que o confinamento das células em matriz de poliuretano reduziu a velocidade de crescimento destas, assim como diminuiu a velocidade de consumo de substrato. O fator de conversão de substrato em biomassa também apresentou decréscimo significativo, no entanto, o mesmo não ocorreu com a velocidade de formação do produto, que foi elevada 3,65 vezes em relação ao micro-organismo livre. A conversão de substrato em produto aumentou 4,21 vezes com a imobilização celular, sugerindo que, embora reduza a velocidade de crescimento, o confinamento influencia positivamente na produção de goma xantana, elevando-a consideravelmente.

A estabilidade operacional das células imobilizadas foi analisada através da sua capacidade de reuso, até obtenção de goma xantana menor que 50% do valor inicial. Foi possível a realização de cinco ciclos contínuos, onde a produção de goma xantana foi de 63,16% do inicial, com difusão de biomassa para o meio de 1,75 g/L.

O imobilizado mostrou-se capaz de produzir goma xantana após armazenamento de 30 dias nas temperaturas de 4°C, -4°C e -80°C, resultando, após 96 horas de fermentação, em produção de 47,6, 51 e 54,8 g/L, respectivamente. A temperatura de -80°C se mostrou mais promissora em relação ao desprendimento de células da matriz de poliuretano, sendo esta de 1,9 g/L de células difundidas para o meio. O armazenamento a 4°C resultou em desprendimento de 6,5 g/L, enquanto a temperatura de -4°C proporcionou a difusão de 2,4 g/L.

Apesar de não substituir a separação e a purificação do produto final, pois há difusão de células da matriz de poliuretano, a imobilização de *X. campestris* simultânea à síntese de poliuretano é promissora, sendo uma estratégia potencial para obter maior rendimento do processo em relação às células livres.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados alcançados, sugere-se a realização dos seguintes tópicos para trabalhos futuros:

- Caracterização da goma xantana produzida;
- Modelagem matemática dos dados de cinética;
- Microscopia Eletrônica de Varredura do poliuretano com e sem células imobilizadas;
- Variação da quantidade de células imobilizadas visando aumentar a produção de goma xantana;
- Tratamentos pós-imobilização para maior adesão da célula na matriz polimérica;
- Caracterização do poliuretano;
- Uso de fontes alternativas de carbono, tais como resíduos industriais;
- Imobilização em poliuretanos de diferentes densidades;
- Fermentação em diferentes tipos reatores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, S.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. A novel approach to monitor stress-induced physiological responses in immobilized microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 8, p. 3573–3583, 2015.

ANTUNES, A. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B (CALB) *in situ* em espuma flexível de poliuretano de diferentes densidades**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, URI, 2015.

ASGHER, M.; SHAHID, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Recent trends and valorization of immobilization strategies and ligninolytic enzymes by industrial biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 101, p. 56–66, 2014.

ASSIS, D.; BRANDÃO, L. V.; DE SOUSA COSTA, L. A.; FIGUEIREDO, T. V. B.; SOUSA, L. S.; PADILHA, F. F.; DRUZIAN, J. I. A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 5, p. 2769–2785, 2014.

BAILEY, J.; OLLIS, D. **Fundamentals of Biochemical Engineering**. [s.l.] McGraw-Hill College, 1986.

BCC RESEARCH. **Xanthan Gum: Applications and Global Markets**. Agosto de 2017. Disponível em <<https://www.bccresearch.com/market-research/advanced-materials/xanthan-gum-global-markets-report-avm149a.html>>. Acesso em 30 de Janeiro de 2018.

BHASARKAR, J. B.; DIKSHIT, P. K.; MOHOLKAR, V. S. Ultrasound assisted biodesulfurization of liquid fuel using free and immobilized cells of *Rhodococcus rhodochrous* MTCC 3552: A mechanistic investigation. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 369–378, 2015.

BRANDÃO, L. V.; ASSIS, D. J.; LÓPEZ, J. A.; ESPIRIDIÃO, M. C. A.; ECHEVARRIA, E. M.; DRUZIAN, J. I. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: Xanthan production and characterization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 4, p. 737–746, 2013.

BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; DE OLIVEIRA, D.; NYARI, N. L. D.; VALDUGA, E.; SOARES, M. B. A.; BACKES, G. T.; DALLAGO, R. M. In situ immobilization of commercial pectinase in rigid polyurethane foam and application in the hydrolysis of pectic oligosaccharides. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 35–43, 2015.

CADMUS, M. C.; ROGOVIN, S. P.; BURTON, K. A.; PITTSLEY, J. E.; KNUTSON, C. A.; JEANES, A. Colonial variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strain. **Canadian journal of microbiology**, v. 22, n. 7, p. 942–948, 1976.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: Molecular structure and rheological properties. **Enzyme and**

Microbial Technology, v. 26, n. 2–4, p. 282–291, 2000.

CHEN, P. C.; ZHENG, P.; YE, X. Y.; JI, F. Preparation of *A. succinogenes* immobilized microfiber membrane for repeated production of succinic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 34–42, 2017.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. DA. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n. 2, p. 143, 2007.

DIKSHIT, P. K.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic analysis of dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* MTCC 904. **Bioresource Technology**, v. 216, p. 948–957, 2016.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012.

ESGALHADO, M. E.; ROSEIRO, J. C.; COLLAÇO, M. T. A. Interactive Effects of pH and Temperature on Cell Growth and Polymer Production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 667–671, 1995.

FARIA, S.; VIEIRA, P. A.; RESENDE, M. M.; FRANÇA, F. P.; CARDOSO, V. L. A comparison between shaker and bioreactor performance based on the kinetic parameters of xanthan gum production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 156, n. 1–3, p. 45–58, 2009.

FIUME, M. M.; HELDRETH, B.; BERGFELD, W. F.; BELSITO, D. V.; HILL, R. A.; KLAASSEN, C. D.; LIEBLER, D. C.; MARKS, J. G.; SHANK, R. C.; SLAGA, T. J.; SNYDER, P. W.; ANDERSEN, F. A.; GILL, L. J. Safety Assessment of Microbial Polysaccharide Gums as Used in Cosmetics. **International Journal of Toxicology**, v. 35, p. 5S–49S, 2016.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology. In: **Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology**. p. 9–24.

FRONT RESEARCH. **Competition in Global Xanthan gum Market to Grow in the Years to Come**. Front Research, 01 Janeiro 2016. Disponível em: <<http://www.frontresearch.com/news/competition-in-global-xanthan-gum-market-to-grow-in-the-years-to-come/>>. Acesso em: 21 Março 2017.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549–579, 2000.

GENG, Z.; YU, Y.; ZHU, S.; YU, H.; LIU, J.; BIAN, D.; YANG, X.; HUO, H.; HUO, M. Comparing polyethersulfone and polyurethane-immobilized cells of *Comamonas testosteroni* QYY in treatment of an accidental dye wastewater. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 33, n. 1, p. 36–43, 2017.

GIESE, E. C. Biocatalisadores imobilizados: prospecção de inovações tecnológicas na última

década. v. 5, p. 2296–2307, 2015.

HABIBI, H.; KHOSRAVI-DARANI, K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, n. May 2016, p. 130–140, 2017.

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

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. The immobilization of whole cells: Engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, n. 8, p. 1321–1354, 1985.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1–3, p. 81–84, 1998.

KOSSEVA, M. R. Immobilization of Microbial Cells in Food Fermentation Processes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1089–1118, 2011.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.

LEELA, J. K.; SHARMA, G. Studies on xanthan production from *Xanthomonas campestris*. **Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 6, p. 687–689, 2000.

LI, J. M.; NIE, S. P. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. **Food Hydrocolloids**, v. 53, n. 2016, p. 46–61, 2014.

LI, P.; LI, T.; ZENG, Y.; LI, X.; JIANG, X.; WANG, Y.; XIE, T.; ZHANG, Y. Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LREL-1 using kitchen waste as the sole substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 684–691, 2016.

LOPES, B.; LOPES LESSA, V.; MORÉ SILVA, B.; DA SILVA CARVALHO FILHO, M. A.; SCHNITZLER, E.; GUSTAVO LACERDA, L. Xanthan gum: properties, production conditions, quality and economic perspective. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 54, n. 3, p. 185–194, 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. **Brock Biology og Microorganisms**. 13. ed. [s.l.] Pearson Education, 2012.

MAN, R.; FAUZI ISMAIL, A.; FATIMAH ZAHARAH MOHD FUZI, S.; FAISAL GHAZALI, N.; MD ILLIAS, R. Effects of culture conditions of immobilized recombinant *Escherichia coli* on cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) excretion and cell stability. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 474–483, 2016.

MARGARITIS, A.; ZAJIC, J. E. Mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, n. 7, p. 939–1001, 1978.

MESOMO, M.; SILVA, M. F.; BONI, G.; PADILHA, F. F.; MAZUTTI, M.; MOSSI, A.; DE OLIVEIRA, D.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* from cheese whey: Production optimisation and rheological characterisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 14, p. 2440–2445, 2009.

MIRIK, M.; DEMIRCI, A. S.; GUMUS, T.; ARICI, M. Xanthan gum production under different operational conditions by *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* isolated from pepper plant. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 1243–1247, 2011.

NIE, M.; NIE, H.; HE, M.; LIN, Y.; WANG, L.; JIN, P.; ZHANG, S. Y. Immobilization of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* NY3 and their application in the removal of hydrocarbons from highly concentrated oil-containing wastewater on the laboratory scale. **Journal of Environmental Management**, v. 173, p. 34–40, 2016.

NIKNEZHAD, S. V.; ASADOLLAHI, M. A.; ZAMANI, A.; BIRIA, D. Production of xanthan gum by free and immobilized cells of *Xanthomonas campestris* and *Xanthomonas pelargonii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 751–756, 2016.

NYARI, N. L. D. **Estudo da imobilização de Lipase *Candida antarctica* B em poliuretano**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentos) Universidade Regional Ingradada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, URI, 2013.

NYARI, N. L. D.; FERNANDES, I. A.; BUSTAMANTE-VARGAS, C. E.; STEFFENS, C.; DE OLIVEIRA, D.; ZENI, J.; RIGO, E.; DALLAGO, R. M. In situ immobilization of *Candida antarctica* B lipase in polyurethane foam support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 124, p. 52–61, 2016.

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

PATIL, N. K.; VEERANAGOUDA, Y.; VIJAYKUMAR, M. H.; ANAND NAYAK, S.; KAREGOUDAR, T. B. Enhanced and potential degradation of o-phthalate by *Bacillus* sp. immobilized cells in alginate and polyurethane. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 57, n. 2, p. 82–87, 2006.

PETRI, D. F. S. Xanthan gum: A versatile biopolymer for biomedical and technological applications. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 23, 2015.

REBROŠ, M.; DOLEJŠ, I.; STLOUKAL, R.; ROSENBERG, M. Butyric acid production with *Clostridium tyrobutyricum* immobilised to PVA gel. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 704–708, 2016.

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

ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M. F.; LERIN, L.; DE 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, v. 77, n. 1, p. 65–71, 2009.

SALAH, R.; CHAARI, K.; BESBES, S.; KTARI, N.; BLECKER, C.; DEROANNE, C.; ATTIA, H. Optimisation of xanthan gum production by palm date (*Phoenix dactylifera* L.) juice by-products using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 121, n. 2, p. 627–633, 2010.

SHARMA, B. R.; NARESH, L.; DHULDHOYA, N. C.; MERCHANT, S. U.; MERCHANT, U. C. Xanthan Gum - A Boon to Food Industry. **Food Promotion Chronicle**, v. 1, n. 27, p. 27–30, 2006.

SILVA, M. F.; FORNARI, R. C. G.; MAZUTTI, M. A.; DE OLIVEIRA, D.; PADILHA, F. F.; CICHOSKI, A. J.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 119–123, 2009.

SUBBALAXMI, S.; MURTY, V. R. Process optimization for tannase production by *Bacillus gottheilii* M2S2 on inert polyurethane foam support. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 48–55, 2016.

SUBHASH, M.; JADHAV, A.; JANA, S. Sustainable Production of Microbial Polysaccharide Xanthan Gum From Supplemental Substrate. **International Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 8, p. 9–11, 2015.

SUBHASH, M.; JADHAV, A. S.; JANA, S.; MOHANRAJ, G. T. Microbial production of Green polymer Xanthan Gum from *Xanthomonas Campestris*. v. 6, n. 8, p. 1045–1052, 2015.

UMASHANKAR, H.; ANNADURAI, G.; CHELLAPANDIAN, M.; KRISHNAN, M. R. V. Influence of nutrients on cell growth and xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 6, p. 307–309, 1996.

WAN-MOHTAR, W. A. A. Q. I.; ABD MALEK, R.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. Exopolysaccharide production by *Ganoderma lucidum* immobilised on polyurethane foam in a repeated-batch fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 24–31, 2016.

YANG, Z. Immobilization of *Enterococcus faecalis* cells with chitosan: A new process for the industrial production of L-citrulline. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1056–1060, 2015.

ZABOT, G. L.; MECCA, J.; MESOMO, M.; SILVA, M. F.; PRÁ, V. D.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; CASTILHOS, F.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. Hybrid modeling of xanthan gum bioproduction in batch bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 8, p. 975–986, 2011.

ZHANG, Z. G.; CHEN, H. Z. Xanthan production on polyurethane foam and its enhancement by air pressure pulsation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2244–2258, 2010.

ZHAO, Z.; XIE, X.; WANG, Z.; TAO, Y.; NIU, X.; HUANG, X.; LIU, L.; LI, Z.

Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in mesoporous silica-based material: An efficiency continuous cell-recycle fermentation system for lactic acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 645–651, 2016.

ZION MARKET RESEARCH. **Xanthan Gum Market for Oil and Gas, Food and Beverage, Pharmaceutical, Cosmetics, and Other Applications - Global Industry Perspective, Comprehensive Analysis, Size, Share, Growth, Segment, Trends and Forecast, 2015 – 2021**. 01 de Novembro de 2016. Disponível em <<https://www.zionmarketresearch.com/report/xanthan-gum-market>>. Acesso em 21 de Março de 2017.