

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Xanthomonas* sp PARA PRODUÇÃO
DE GOMA XANTANA**

IEDA ROTTAVA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de 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, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL

MAIO DE 2005

**SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Xanthomonas* sp PARA PRODUÇÃO DE GOMA
XANTANA**

IEDA ROTTAVA

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Profa. Francine Ferreira Padilha, D.Sc.
Orientadora

Prof. Rogério Luís Cansian, D.Sc.
Orientador

Profa. Claire Tondo Vendruscolo, D.Sc.

Profa. Débora de Oliveira, D.Sc.

Erechim, 09 de maio de 2005.

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 – CAMPUS DE ERECHIM.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Gemin João Rottava e Lourdes De Marco Rottava, e demais familiares, pelo apoio ao longo de todos os caminhos que passei, com amor.

A todas as pessoas que fazem tudo com e por amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus orientadores Francine Ferreira Padilha e Rogério Luís Cansian por acreditarem em mim e pelo apoio dispendido.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, em especial a Helen Treichel, Débora de Oliveira, Eunice Valduga e Marco Di Luccio pelo suporte técnico e por terem sempre um tempo para me ajudar.

Às minhas estagiárias Grasiela Batesini, Edicléa Mayeski Maria Rita Chaves Nogueira, Cris e Carol, por todas as horas que vocês dedicaram ao meu trabalho, pela disponibilidade, persistência e amizade, sem vocês seria difícil estar aqui.

A todos os bolsistas e estagiários do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, em especial a Lindomar Lerin e Alexandre Zanardo de Carvalho, por tanta dedicação e amizade.

A todos os funcionários do Centro Tecnológico da URI - Campus de Erechim, principalmente da Central de Materiais, Rosi, Morgana, Rogério, Leandra, Maiquel, Madalena e Fernanda, pela paciência, atenção e contribuição neste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Ciências da Saúde da URI – Campus de Erechim, Cassiano, Tatiana, Vanessa e Renata, pela disponibilidade e atenção dispensada sempre que solicitados.

Às minhas amigas Adriane da Silva, Andresa Carla Feihmann, Cláudia Kuiawinski, Giovana Cristina Geni e Geciane Toniazzo pela amizade ilimitada, paciência despendida em incansáveis discussões, ensinamentos, explicações e conversas que ajudaram na minha formação tanto científica como pessoal.

Aos demais colegas da turma de mestrado, em especial Maristela e Lisandra, pelas longas horas de estudo e dificuldades superadas que enfrentamos juntos.

Aos colegas do Centro Tecnológico da URI - Campus de Erechim e graduandos do Curso de Engenharia de Alimentos, os quais é difícil citar todos, e seria injusto citar apenas alguns, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu amadurecimento profissional e espiritual.

Aos demais amigos que sempre estiveram ao meu lado, presentes ou ausentes.

À todas as pessoas maravilhosas que conheci e me relacionei em Erechim, e que foram preciosas nesta etapa da minha caminhada, pelo carinho e hospitalidade.

À empresa INTECNIAL, pelo suporte financeiro e concessão de bolsa.

A URI – Campus de Erechim, pela estrutura tanto física como profissional disponibilizada aos alunos do programa de mestrado.

“Tudo vale a pena quando a alma não é
pequena.”

(Fernando Pessoa)

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Xanthomonas* sp PARA PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

Ieda Rottava

Maio/2005

Orientadores: Profa. Francine Ferreira Padilha, D.Sc.

Prof. Rogério Luís Cansian, D.Sc.

Goma xantana, também conhecido como exopolissacarídeos (EPS), um biopolímero microbiano produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*, é o mais aceito comercialmente. Este polímero é usado em aplicações em alimentos e outros produtos como espessante, estabilizante ou viscosificante. Este trabalho teve como objetivo selecionar duas linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana, através de screening de dez linhagens de *Xanthomonas* sp produtoras de goma xantana em agitador orbital, analisando a viscosidade aparente das soluções aquosas e selecionando assim, duas linhagens de *Xanthomonas* sp em relação à produtividade e viscosidade aparente. Para verificação da ocorrência de mutações genômicas, o estudo também objetivou a realização da caracterização molecular das linhagens pesquisadas. Os experimentos de produção de goma xantana foram

realizados em agitador orbital com agitação de 120rpm, para produção de células, e 180rpm, para produção de inóculo, a uma temperatura de 28°C. Para a caracterização molecular das linhagens envolvidas na pesquisa, utilizou-se a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Das dez linhagens estudadas, os melhores microrganismos para a produção da goma xantana são a *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* - 1230 (8,83g.L⁻¹.h⁻¹), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - 254 (9,41g.L⁻¹.h⁻¹), *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* - 1182 (7,97g.L⁻¹.h⁻¹), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - 1078 (9,60g.L⁻¹.h⁻¹) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - 729 (8,16g.L⁻¹.h⁻¹), em termos de produtividade. Existe uma alta variabilidade entre as linhagens de *Xanthomonas* sp estudadas, segundo a análise de RAPD. A análise de RAPD entre as linhagens não permitiu um total agrupamento das linhagens por patovar ou por espécie. Segundo a análise de RAPD, não houve mutações detectáveis destas bactérias durante a pesquisa (repique inicial e final das diferentes linhagens de *Xanthomonas* sp). As duas linhagens com melhor produtividade e viscosidade aparente foram a *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* - 1230 e a *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* - 1182.

Palavras-chave: exopolissacarídeo microbiano, seleção de linhagens, goma xantana, *Xanthomonas* sp

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

STRAINS SELECTION OF *Xanthomonas* sp FOR XANTHAN GUM PRODUCTION

Ieda Rottava

Mês/2005

Advisors: Francine Ferreira Padilha, D.Sc.

Rogério Luís Cansian, D.Sc.

Xanthan gum, also known as extracellular polysaccharide (EPS), a microbial biopolymer produced by *Xanthomonas*, is the most commercially accepted. This polymer is used in food applications and other products as thickener, stabilizer or to increase viscosity. This work aimed to select two strains of *Xanthomonas* for xanthan gum production in orbital shaker, analyzing the apparent viscosity of aqueous solutions. For verification of occurrence of genus mutations, molecular characterization of the strains was carried out. The experiments of xanthan gum production were performed in orbital shaker at 120 rpm, for cell production, and 180rpm, for inoculum production, at 28°C. For molecular characterization of the strains, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) was used. From ten strains investigated, the best microorganisms for xanthan gum production are *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* - 1230 (8,83g.L-1.h-1), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - 254 (9,41g.L-1.h-1), *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* - 1182 (7,97g.L-1.h-1), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - 1078 (9,60g.L-1.h-1) and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - 729 (8,16g.L-1.h-1), in productivity terms. There is a variability between the *Xanthomonas* sp strains, found by RAPD analysis.

The analysis of RAPD between the strains did not allow a total grouping of strains for patovar or for species. Following the analysis of RAPD, no mutation on this bacterium during the research (beginning and ending alarms of different strain of *Xanthomonas* sp) was detected. The two strains with better productivity and apparent viscosity were *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* - 1230 and the *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* - 1182.

Keywords: microbial extracellular polysaccharide, strains selections, xanthan gum, *Xanthomonas* sp.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	V
RESUMO	VIII
ABSTRACT	X
SUMÁRIO.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABELAS	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 EXOPOLISSACARÍDEOS MICROBIANOS.....	4
2.2 <i>XANTHOMONAS SP.</i>	8
2.3 ANÁLISE GENÔMICA DO DNA DE BACTÉRIAS (RAPD).....	10
2.4 GOMA XANTANA.....	13
2.4.1 <i>Propriedades</i>	13
2.4.2 <i>Produção</i>	15
2.4.3 <i>Recuperação do biopolímero</i>	17
2.4.4 <i>Toxicidade</i>	19
2.4.5 <i>Aplicações</i>	19
2.5 CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS	20
2.6 REOLOGIA DE BIOPOLÍMEROS	21
2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 MICRORGANISMOS	24
3.2 METODOLOGIA.....	24
3.2.1 <i>Esterilização dos meios e materiais para trabalhos assépticos</i>	24

3.2.2	<i>Repique e caracterização morfológica dos microrganismos</i>	25
3.2.3	<i>Caracterização genética do microrganismo por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)</i>	25
3.2.3.1	Extração de DNA e seleção de <i>primers</i>	25
3.2.3.2	Quantificação do DNA.....	26
3.2.3.3	Reação de amplificação de RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>) 26	
3.2.3.4	Amplificação de RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	27
3.2.3.5	Análise eletroforética dos fragmentos amplificados.....	27
3.2.3.6	Análise dos dados	27
3.2.4	<i>Curva de crescimento microbiano</i>	28
3.2.5	<i>Produção de células</i>	28
3.2.6	<i>Produção da goma xantana</i>	28
3.2.7	<i>Recuperação da goma xantana</i>	29
3.2.8	<i>Cinética do processo fermentativo</i>	29
3.2.9	<i>Análise reológica da goma xantana</i>	30
4	resultados e discussão	32
4.1	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS COLÔNIAS	32
4.2	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO MICRORGANISMO POR RAPD (<i>RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA</i>)	35
4.3	CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO	41
4.4	PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA.....	47
4.5	CINÉTICA DO PROCESSO FERMENTATIVO	52
4.6	REOLOGIA DA GOMA XANTANA.....	60
5	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	67
5.1	CONCLUSÕES.....	67
5.2	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	68
	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da goma xantana (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).....	13
Figura 2 - Biossíntese do exopolissacarídeo goma xantana (DAWES & SUTHERLAND,1992)	17
Figura 3 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, 28°C ± 2°C, 48 horas, de <i>Xanthomonas campestris</i> (01 - 1537) (a) e de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i> (02 - 1230) (b).....	32
Figura 4 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, 28°C ± 2°C, 48 horas, de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (03 - 254) (a) e de <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>arracaciae</i> (04 - 1198) (b).	33
Figura 5 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, 28°C ± 2°C, 48 horas, de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (05 - 1182) (a) e de <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>campestris</i> (06 - 1078) (b).....	33
Figura 6 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, 28°C ± 2°C, 48 horas, de <i>Xanthomonas melonis</i> (07 - 68) (a) e de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (08 - 729) (b).	34
Figura 7 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, 28°C ± 2°C, 48 horas, de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (09 - 607) (a) e de <i>Xanthomonas</i> sp (10 - 1167) (b).....	34
Figura 8 - Gel de agarose demonstrativo obtido com o <i>primer</i> OPH 18.	37
Figura 9 - Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD entre os repiques inicial e final das diferentes linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp. Os números dentro do dendrograma referem-se aos limites de confiança dos agrupamentos, calculados pelo programa Winboot.	38
Figura 10 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas campestris</i> (01 - 1537).....	42
Figura 11 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i> (02 - 1230).....	42
Figura 12 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (03 - 254).....	43
Figura 13 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>arracaciae</i> (04 - 1198).....	43
Figura 14 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (05 - 1182).....	44
Figura 15 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (06 - 1078).....	44
Figura 16 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas melonis</i> (07 - 68).....	45
Figura 17 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (08 - 729).....	45
Figura 18 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (09 - 607).....	46
Figura 19 - Curva de crescimento microbiano da <i>Xanthomonas</i> sp (10 - 1167).	46
Figura 20 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> (01 – 1537) (a) e da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i> (02 - 1230) (b).	50

Figura 21 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (03 - 254) (a) e da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>arracaciae</i> (04 - 1198) (b).....	50
Figura 22 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (05 - 1182) (a) e da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (06 - 1078) (b).....	51
Figura 23 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da <i>Xanthomonas melonis</i> (07 -68) (a) e da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (08 - 729) (b).....	51
Figura 24 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (09 -607) (a) e da <i>Xanthomonas</i> sp (10 - 1167) (b)....	52
Figura 25 – Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> (01 - 1537).....	53
Figura 26 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i> (02 - 1230).....	53
Figura 27 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (03 - 254).....	54
Figura 28 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>arracaciae</i> (04 - 1198).....	54
Figura 29 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (05 - 1182).....	55
Figura 30 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (06 - 1078).....	55
Figura 31 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas melonis</i> (07 -68).....	56
Figura 32 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (08 - 729).....	56
Figura 33 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (09 -607).....	57
Figura 34 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da <i>Xanthomonas</i> sp (10 - 1167).....	57
Figura 35 - Viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas pelas linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> (01 - 1537), <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i> (02 - 1230), <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (05 - 1182) <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (06 - 1078), <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (09 -607), em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, <i>spindle</i> 18 a 25°C.	61
Figura 36 - Viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas pelas linhagens de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (03 - 254), <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>arracaciae</i> (04 - 1198), <i>Xanthomonas melonis</i> (07 -68), <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (08 - 729), <i>Xanthomonas</i> sp (10 - 1167), em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, <i>spindle</i> 18 a 25°C.	62
Figura 37 - Viscosidade aparente de soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas a partir da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i> (02 - 1230) e da <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i> (05 – 1182), em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, <i>spindle</i> 31 a 25°C.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens de <i>Xanthomonas</i> utilizadas na produção de goma xantana.	24
Tabela 2: Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada <i>primer</i> utilizado com os 10 microrganismos.	37
Tabela 3 - Similaridades entre os linhagens analisadas.	38
Tabela 4 - Similaridades entre repiques inicial e final dos microrganismos analisados.	41
Tabela 5 - Concentração celular e produtividade de goma xantana sintetizada em meio de produção com dez linhagens de <i>Xanthomonas</i> sp.	48
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos das fermentações para um tempo final de 96 horas.	58
Tabela 7 – Viscosidade aparente das soluções aquosas das diversas gomas xantana, representando a média de três leituras de cada solução analisada, realizadas em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, <i>spindle</i> 18 a 25°C.	63

1 INTRODUÇÃO

Os biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana, sintetizados por bactérias, fungos e leveduras. Esses polissacarídeos de cadeia complexa também são conhecidos como gomas devido a sua capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso. A importância e potencialidade do uso de gomas nos diversos segmentos industriais é consenso na literatura pertinente. São aplicados nos setores de alimentos, farmacêutico, químico e petroquímico. Nestes setores há uma contínua substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana, por várias razões, como possibilidade de modificação de suas características reológicas através do controle de parâmetros de fermentação, independência climática, controle de qualidade dos lotes, entre outras.

Quatro biopolímeros são aprovados pelo FDA para uso alimentar: xantana, dextrana, curdulana e gelana (PORTILHO, 2002). Na Legislação Brasileira, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), está previsto o uso de xantana e da dextrana e ainda não consta a curdulana e a gelana como um aditivo alimentar usual.

Os biopolímeros apresentam interesse por formarem uma classe de polímeros ou gomas, utilizados amplamente como espessantes, gelificantes, agentes de suspensão, colóides protetores, entre outras aplicações. Exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para definir sua aplicação final. Tais propriedades são determinadas por sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, seu peso molecular médio e sua distribuição (PACE, 1991).

As gomas podem ser definidas como moléculas de alto peso molecular, com características hidrofílicas ou hidrofóbicas, que usualmente têm propriedades coloidais, e a capacidade de produzir géis ao combinar-se com o solvente apropriado, ou que ao se dispersar na água fria ou quente, produzem soluções ou misturas viscosas (PASQUEL, 1999).

Biopolímeros ou polissacarídeos microbianos podem ser intracelulares, da parede celular ou extracelulares (exopolissacarídeos ou EPS), e estes podem ser

capsulares ou livres. Os de maior interesse são os extracelulares livres, devido a sua facilidade de obtenção e menor custo para a indústria.

Goma xantana, o exopolissacarídeo microbiano produzido por *Xanthomonas campestris*, é o mais comercialmente aceito. Este biopolímero é aplicado em alimentos e outros segmentos como agente espessante, estabilizante, emulsificante e em sinergismo com outras gomas pode atuar como gelificante (LÓPEZ, *et al.*, 2001).

A xantana é o biopolímero mais utilizado na recuperação terciária de petróleo (EOR), não tendo até o momento nenhum outro em escala comercial que supere suas qualidades. A goma xantana tem sido usada junto com hidróxido de sódio e surfactantes na técnica conhecida como APS (álcali-polímero-surfactante) (NAVARRETE *et al.*, 2001; NAVARRETE & SHAH, 2001).

Nos EUA, a indústria de petróleo não utiliza grandes quantidades deste biopolímero, e sim associações de características não tão específicas, devido ao custo elevado de produção da goma xantana. No Brasil, o substrato representa um baixo custo de produção; entretanto, em outros países o custo do meio de fermentação representa um fator crítico sob o aspecto comercial na produção do polissacarídeo. Portanto, o Brasil mostra-se com um grande potencial para a fabricação deste biopolímero em escala industrial, já que dispõe de matéria-prima básica para a produção: açúcar, extrato de levedura e álcool do setor sucro-alcooleiro (PADILHA, 2003).

A caracterização molecular das linhagens envolvidas na pesquisa é de elevada importância especialmente para comprovar a não ocorrência de mutações durante os repiques sucessivos aos quais o microrganismo é submetido. A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma técnica simples, requer pequenas quantidades de DNA, não sendo necessário o conhecimento prévio do genoma e o nível de regiões polimórficas é geralmente alto (WILLIAMS *et al.*, 1990, 1993).

A seleção de microrganismos que produzam polissacarídeos com propriedades funcionais economicamente interessantes bem como os estudos para otimizar o rendimento e a produtividade dos processos fermentativos na obtenção destes é um desafio constante (BOZA, 2002).

A maioria dos estudos informa uma dependência clara entre linhagens usadas, rendimento e propriedades da goma xantana. Assim, a seleção da linhagem deveria ser o primeiro passo quando é tentado um processo específico de produção (LOPEZ *et al.*, 2001; HASSLER e DOHERTY, 1990).

Os estudos realizados também se têm focalizado na otimização das condições de cultura para produção de exopolissacarídeos e mais recentemente, no isolamento, clonagem e sequenciamento dos genes envolvidos na síntese de biopolímeros.

Dentro deste contexto, este trabalho teve como objetivo geral selecionar duas linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana, e como objetivos específicos:

- Realizar screening de dez linhagens de *Xanthomonas* sp produtoras de goma xantana em agitador orbital de modo a selecionar duas linhagens em relação à produtividade e viscosidade aparente das soluções aquosas.
- Fazer a caracterização molecular de dez linhagens de *Xanthomonas* sp, utilizando a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Exopolissacarídeos Microbianos

Os biopolímeros são macromoléculas polissacarídicas que, devido as suas características físico-químicas, como atuar em baixas concentrações, ampla faixa de pH e temperatura, estão sendo cada vez mais utilizadas em diversos ramos industriais. Pela diversificação do consumo de biopolímeros, faz-se necessária a produção dos mesmos em quantidade e qualidade cada vez maiores (PADILHA, 1997).

Os polissacarídeos são constituintes normais de todas as células microbianas, incluindo as bactérias, leveduras e fungos. Estão divididos em três grupos, de acordo com a sua localização morfológica: intracelular, localizado no interior da célula ou como parte da membrana citoplasmática; da parede celular, formados como parte estrutural da células; e polissacarídeos extracelulares, produzidos no interior da célula, sendo posteriormente, secretados para o exterior da mesma (SUTHERLAND, 1982).

As bactérias Gram-negativas apresentam a parede celular mais fina, consequência da menor quantidade de peptidoglicano, em comparação às Gram-positivas, e têm como maior componente um macropolímero, denominado lipopolissacarídeo. A presença do lipopolissacarídeo fornece uma barreira hidrofílica à superfície celular (PORTILHO, 2002). Em muitas bactérias, a hidroflicidade da superfície celular é aumentada pela presença de uma camada de polissacarídeo extracelular (EPS). O EPS pode estar organizado de modo a formar uma camada coesiva e aderente, denominada “cápsula” ou consistir em um polissacarídeo livre e “mucilaginoso” (*slime*), com pouca ou nenhuma aderência celular. O termo polissacarídeo extracelular ou exopolissacarídeo pode ser usado tanto para descrever o polissacarídeo mucilaginoso como o capsular (PORTILHO, 2002).

Os EPS microbianos podem ser constituídos por um único tipo de monossacarídeo, sendo classificados como homopolissacarídeos, como as gomas dextrana e curdulana. Outros, entretanto, possuem estrutura mais complexa

podendo, inclusive, conter além de diferentes monossacarídeos, outros compostos químicos, como a goma xantana (SUTHERLAND, 1994).

Muitos microrganismos produzem grandes quantidades de polissacarídeos sob as mais variadas condições. Esses polissacarídeos têm papéis específicos como compostos de armazenamento (glicogênio), compostos estruturais (quitina), mediadores das interações do microrganismo com o meio ambiente (polissacarídeos extracelulares) (PACE, 1991).

Os EPS são, geralmente, considerados metabólitos secundários, produzidos quando uma fonte de carboidratos está presente em excesso (PACE & RIGHELATO, 1980). Os metabólitos secundários são definidos como compostos sintetizados pelos microrganismos quando as células crescem lentamente ou cessam o crescimento. Seu papel no crescimento e metabolismo do microrganismo nem sempre é definido. DEMAÏN (2000) destaca a importância dos metabólitos secundários para o microrganismo também como efetivos na diferenciação microbiana.

A biossíntese de EPS está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio ambiente (MOREIRA, 2002), sendo que esses EPS desempenham diferentes papéis, que incluem: proteger o microrganismo contra desidratação; servir de barreira, impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular; acoplar e neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuar como fonte de carbono e energia; converter o excesso de substrato em uma massa espumosa que é mais difícil de ser metabolizada por outros microrganismos; interagir com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas (PACE, 1991).

Os EPSs possuem duas propriedades que ajudam a determinar suas funções: (a) os polissacarídeos capsulares são altamente hidratados, e portanto, protegem a bactéria da dessecação, evitando que moléculas hidrofóbicas penetrem na cápsula e cheguem à membrana celular; (b) os EPSs ácidos produzidos pela maioria das bactérias fitopatogênicas são altamente aniônicos e assim, podem atuar como resinas de troca iônica, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula. Outra função importante do polissacarídeo capsular, no solo ou em ambientes aquáticos, é

auxiliar na adesão da bactéria a superfícies biológicas ou inertes, nas quais existem altas concentrações de nutrientes. As bactérias fitopatogênicas precisam crescer ou sobreviver no solo, em folhas ou raízes de plantas para completar seu ciclo de vida, portanto a proteção contra o meio ambiente hostil pode ser um motivo para que a bactéria produza EPS (SILVA *et al.*, 2001).

As áreas de interesse para os EPS microbianos, ou biopolímeros, como são comumente referidos, são bastante variadas, como: indústria de alimentos, agroquímica, recuperação de óleo bruto, médica e farmacêutica, química fina e cosmética (VANDAMME *et al.*, 1996).

Na indústria de alimentos os biopolímeros encontram um vasto campo de aplicação como agentes espessantes, estabilizantes e gelificantes e vêm substituindo gradativamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais como plantas. A preferência por biopolímeros microbianos se deve às suas propriedades funcionais, somadas às vantagens de sua produção ser independente de condições climáticas (BOZA, 2002).

As gomas podem ser entendidas como polissacarídeos de cadeia longa, que podem ser pouco, muito, ou nada ramificados, mas que devem interagir com a água. Uma goma pode ser definida em sentido amplo, como qualquer polissacarídeo solúvel em água, que pode ser extraído, a partir de vegetais terrestres ou marinhos, ou de microrganismos, que possui a capacidade, em solução, de incrementar a viscosidade e/ou formar géis (PASQUEL, 1999).

Segundo revisão de PASQUEL (1999), várias gomas são importantes na engenharia de alimentos, como por exemplo:

- Gomas extraídas de plantas marinhas – os alginatos, a goma agar e a goma carragenana são extratos de algas vermelhas e marrons, que, em conjunto, em inglês, são conhecidas como *seaweeds*.
- Gomas extraídas de sementes de plantas terrestres – um segundo grupo importante de gomas são as galactomanas obtidas das sementes de certas plantas, goma locuste e goma guar.

- Gomas obtidas como exudados de plantas terrestres – um terceiro grupo importante de gomas usadas na indústria dos alimentos é o grupo das gomas exudadas por árvores, goma arábica, goma ghatti, goma karaya e goma tragacante.
- Gomas obtidas a partir de processos microbiológicos – é importante destacar as gomas produzidas por algumas espécies de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*, que apresentam propriedades incomuns no que diz respeito à textura, goma xantana e goma gelana.
- Gomas obtidas por modificação química de produtos vegetais – destacam-se nesse grupo as modificações químicas da celulose e da pectina, conducentes à obtenção de hidrocolóides com propriedades gelificantes, gomas celulósicas (carboximetilcelulose, metilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose) e pectinas.

Vários biopolímeros têm sido produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana (produzido por bactérias Gram-negativas pertencentes a vários gêneros, como *Leuconostoc* e *Streptococcus*), xantana (produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*), curdulana (produzido pela bactéria *Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes*), alginato bacteriano (produzido pela bactéria *Azotobacter vinelandii*), zanflo (produzida pela bactéria *Erwinia tahitica*), gelana (produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea*), welana (produzido pela bactéria *Alcaligenes* sp), succinoglicanas (nome genérico dado a um grupo de polissacarídeos, produzidos por *Pseudomonas* sp) (SANDFORD, 1982 e 1979; SUTHERLAND, 1983 e 1982; QUEIROZ, 1987; MASAKUNI e MASAHIRO, 1990; DUSSAP *et al.*, 1993). Encontram-se em estudo o desenvolvimento de vários biopolímeros como: indicana (*Beijerinckia indica*); pululana (*Pullularia pullulans*) e vários outros produzidos por *Pseudomonas* (SANDFORD, 1979; WILLIAMS *et al.*, 1979; KENNEDY *et al.*, 1982; UHLINGER & WHITE, 1983; CHRISTENSEN *et al.*, 1985; CONGREGADO *et al.*, 1985; MANRESA *et al.*, 1987).

Até o momento, dextrana e xantana são, praticamente ainda os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em larga escala, dividindo fatias importantes do mercado de gomas. A goma gelana e curdulana também são produzidos comercialmente por biossíntese microbiana e aprovados pelo FDA (*Food*

and Drugs Administration), para uso em alimentos. A xantana foi o segundo polissacarídeo microbiano usado na indústria de alimentos como espessante, emulsificante, estabilizante e agente de suspensão, aprovado pelo FDA em 1969. No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965 (ABIA, 1992).

2.2 *Xanthomonas* sp

Em 1940, VERS isolou a bactéria denominada *Xanthomonas campestris*, capaz de elevar a viscosidade do meio onde se desenvolve. A viscosidade é produzida pela secreção no meio de um heteropolissacarídeo aniônico, denominado goma xantana, produzido em escala industrial por fermentação aeróbia pela *X. campestris* (MAURY & ROQUE, 1986).

As bactérias *Xanthomonas* pertencem à família *Pseudomonaceae*. São bastonetes, 0,4-0,7 µm de largura e 0,7-1,8 µm de comprimento, Gram-negativas, móveis por flagelo único (1,7-3 µm de comprimento). O microrganismo é quimiorganotrófico e estritamente aeróbio, com um tipo de metabolismo respiratório que requer oxigênio como o aceptor de elétron terminal, resistentes à estreptomicina. A bactéria não desnitrifica, é catalase-positiva e oxidase-negativa. *Xanthomonas* sp pode oxidar a glicose e o caminho de *Entner-Doudoroff* é predominantemente usado para o catabolismo da glicose (o caminho da pentose fosfato também acontece, mas usa só 8-16% da glicose total consumida); o ácido tricarbóxico e os ciclos de glioxilato estão presentes (GARCÍA-OCHOA, 2000).

As colônias de *Xanthomonas* sp são normalmente amarelas, lisas e viscosas. A estrutura do envoltório da célula é semelhante a das outras células Gram-negativas. Pigmentos amarelos estão presentes em todas as espécies de *Xanthomonas*, mas podem estar ausentes quando acontece alguma degradação (BRADBURY, 1984; GARCÍA-OCHOA, 2000). São essencialmente fitopatogênicas, com exceção da *Xanthomonas maltophilia* (HAYWARD, 1993; SWINGS *et al.*, 1993; GARCÍA-OCHOA, 2000). São amplamente distribuídas e infectam mais de 240 gêneros de plantas mono e dicotiledôneas, que incluem alguns de interesse agrícola, por exemplo, repolho, alface e feijões (CIVEROLO & HATTINGH, 1993). A espécie *Xanthomonas campestris*, a mais numerosa e abundante, diferencia-se em

aproximadamente 125 patovares, que infectam e causam doenças em vários hospedeiros (BRADBURY, 1984).

Vários patovares de *Xanthomonas campestris*, particularmente, e outras espécies de *Xanthomonas*, produzem EPS. Por serem bactérias essencialmente fitopatogênicas, a produção de EPS está relacionada com sua sobrevivência, enquanto na superfície do vegetal hospedeiro, pois este é um ambiente inóspito à bactéria, com a invasão e a patogenicidade. Causam uma variedade de doenças e sintomas, incluindo necrose, gomose e/ou doenças vasculares ou parenquimatosas em folhas, ramos ou frutos de muitas plantas (HAYWARD, 1993). Em geral, *Xanthomonas* não apresentam crescimento epífito, isto é, superficial, considerável, especialmente nas folhas. São fatores limitantes a água livre, luz solar, especialmente os raios UV, e temperaturas extremas (~ 50°C) (RUDOLPH, 1993).

As bactérias colonizam a superfície dos vegetais pela adesão a certas estruturas, o EPS parece regular esse processo. Após invadirem os espaços intercelulares, desenvolvem microcolônias rodeadas de material fibrilar, provavelmente o EPS xantana. Passadas 24 horas, encontram-se abundantemente rodeadas por EPS, que preenche os espaços intercelulares. Como o muco secretado pela bactéria apresenta alta capacidade de retenção de água, os espaços tornam-se congestionados; este fenômeno é conhecido como *water soaking*. Isso causa uma contínua desintegração tecidual e é o primeiro sintoma da infecção e pré-requisito para a efetiva colonização bacteriana (RUDOLPH, 1993). Como a congestão é progressiva, os danos vão agravando-se. A fotossíntese é reduzida e a permeabilidade da membrana celular aumenta, apressando o murchamento da planta. A bactéria utiliza como substrato o tecido necrosado, uma vez que é capaz de secretar diversas enzimas que degradam os polissacarídeos estruturais como a celulose e pectinas (SUTHERLAND, 1993). A eficiência da capacidade de formação do *water soaking* está relacionada à virulência da cepa; correlaciona-se a virulência com a quantidade e qualidade do EPS produzido *in vitro* quando diferentes cepas são comparadas (RUDOLPH, 1993).

2.3 Análise genômica do DNA de bactérias (RAPD)

Segundo FERREIRA & GRATTAPAGLIA (1998), um dos aspectos mais fundamentais da revolução causada pela PCR (reação da polimerase em cadeia) foi a possibilidade de se gerar grandes quantidades de DNA de segmentos específicos do genoma. DNA em grande quantidade pode ser facilmente detectado a olho nu diretamente em gel de eletroforese através de corantes específicos para DNA (ex. brometo de etídio). Entretanto, a técnica de PCR ainda apresentava uma limitação significativa na obtenção de marcadores moleculares anônimos distribuídos pelo genoma, com exceção de alguns genes de seqüência conhecida. A construção de *primers* para a amplificação via PCR dependia essencialmente do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse. Para se conhecer estas seqüências é necessária a clonagem e sequenciamento da região.

O grande avanço na área de marcadores moleculares baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, não se fazendo necessário o conhecimento prévio de seqüência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. WILLIAMS *et al.* (1990) patentaram a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DNA polimórfico amplificado ao acaso. O grupo descreveu a técnica no contexto da análise Mendeliana, demonstrando a identificação de marcadores genéticos para mapeamento. WELSH & MCCLELLAND (1990) propuseram a denominação AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction*) uma vez que os *primers* possuem seqüência arbitrária, mas a amplificação tecnicamente não ocorre ao acaso e sim em lugares específicos no genoma. O experimento deste grupo foi essencialmente a geração de *fingerprints* (impressões digitais) genômicos simples e reprodutíveis para a identificação de linhagens, utilizando géis de eletroforese em poliacrilamida de maior poder de resolução juntamente com *primers* um pouco mais longos. Após alguns meses um terceiro grupo liderado por Peter M. Gresshof desenvolveu o mesmo método com o nome de DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é uma variação do PCR (reação da polimerase em cadeia), com duas características distintas: utiliza um *primer* (seqüência iniciadora) único ao invés de um par de *primers*; o *primer* único tem seqüência arbitrária e, portanto, sua seqüência alvo é desconhecida (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

É uma técnica simples que requer pequenas quantidades de DNA, não necessitando o conhecimento prévio da biologia molecular dos organismos a serem estudados, podendo ser aplicada a qualquer espécie. O polimorfismo entre os produtos de amplificação é detectado freqüentemente e o nível de regiões polimórficas é geralmente elevado. São úteis como marcadores genéticos e podem ser detectados através do exame de um gel de agarose corado com brometo de etídio (WILLIAMS *et al.*, 1990, 1993; SILVEIRA *et al.*, 2000).

A técnica consiste no anelamento do *primer* com o DNA alvo em ciclos de amplificação a baixa estrinência (especificidade), resultando em produtos de amplificação que são característicos de um genoma em particular e denominado *fingerprinting*. Sua alta capacidade discriminatória é útil para estudos epidemiológicos, investigação de fontes de contaminação, relacionamento de isolados de origens diferentes e identificação de isolados diferentes de uma mesma origem e na obtenção de mapas genéticos (WILLIAMS *et al.*, 1990; SILVEIRA *et al.*, 2000).

Um alto grau de padronização e controle interno fazem-se necessários para se obter perfis reprodutíveis de DNA. Há muitos parâmetros nos quais pequenas mudanças alteram os perfis. Apesar do conceito da técnica ser simples, esses parâmetros devem estar dentro de limites ótimos para reprodutibilidade; isto é, concentrações adequadas de DNA, magnésio, *primer* e enzima, assim como o número de ciclos. Aumentando-se a seqüência e o tamanho dos *primers* usados para RAPD pode-se obter um número ilimitado de comparações possíveis entre os perfis, aumentando assim seu poder discriminatório (SILVEIRA *et al.*, 2000; ZHOU & JIAO, 2004).

Vários autores citam o RAPD como ideal no estudo do polimorfismo genômico; o método tem sido usado para comparar diferenças intra e inter específicas em

bactérias, podendo ser usado tanto em DNA purificado como em extratos de células cultivadas em caldo ou em agar (WILLIAMS *et al.*, 1990; SILVEIRA *et al.*, 2000).

Embora seja recente e apresente suas limitações, a técnica de RAPD tem sido aplicada com resultados satisfatórios para vários microrganismos (SILVEIRA *et al.*, 2000).

Entre vários exemplos de utilização da técnica de RAPD pode-se citar o estudo de ZHOU e JIAO (2004) que investigaram a contaminação por *Listeria monocytogenes* em alimentos, em mercados chineses, através de análise de RAPD e descobriram que os modelos *fingerprint* gerados por RAPD são fortemente influenciados pela reação de amplificação, preparo do molde de DNA, e pela técnica de separação usada, tal como tamanho e composição do gel e condições de migração, quando é usada a eletroforese. Mostraram que através de padronização rigorosa, o método de RAPD apresenta dados reprodutíveis e que a concentração correta de dNTP, que deve ser selecionada e usada, irá influenciar também na formação de modelos de bandas mais claros e mais polimórficos. Através deste trabalho foi estabelecido um método de RAPD simples, rápido, discriminatório e reprodutível para a sub-tipagem molecular de *Listeria monocytogenes*.

BAEZA e GIANNINI (2004) realizaram a diferenciação de cepas de *Trichophyton rubrum* (importante agente causal de dermatomicose) por amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD). Foram usadas as seqüências aleatórias 1 – (5' - d [GGTGCGGGAA] - 3') e 6 – (5' – d [CCCGTCAGCA] - 3') para tipagem molecular deste fungo por RAPD, produzindo variabilidade intraespecífica. Cinco padrões foram observados entre os 10 isolados de *T. rubrum*, com ambas as seqüências. Foi concluído que a análise por RAPD pode ser utilizada para estudos epidemiológicos.

TEIXEIRA *et al.* (2004) utilizaram marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*, fungos obtidos de sementes de milho, provenientes de diferentes regiões produtoras brasileiras. Pela análise do DNA, 25 *primers* OPERON Technologies geraram polimorfismos, os quais tornaram possível e seguro o agrupamento de isolados de *A. strictum* e sua diferenciação de *Fusarium verticillioides*.

A principal limitação do uso de marcadores RAPD é o baixo conteúdo de informações genéticas por loco. Além disso, algumas bandas são de fácil interpretação enquanto outras são ambíguas. Também pode se citar a não discriminação dos genótipos heterozigotos dos homozigotos e a baixa reprodutibilidade entre laboratórios (WILLIAMS *et al.*, 1990; SILVEIRA *et al.*, 2000).

2.4 Goma Xantana

2.4.1 Propriedades

Segundo LIMA *et al.* (2001) xantana é um poli- β -(1 \rightarrow 4)-D-glucopirranose, assemelhando-se à celulose, mas com ramificações alternadas nas posições C-3, constituídas por três açúcares conforme observado na figura 1.

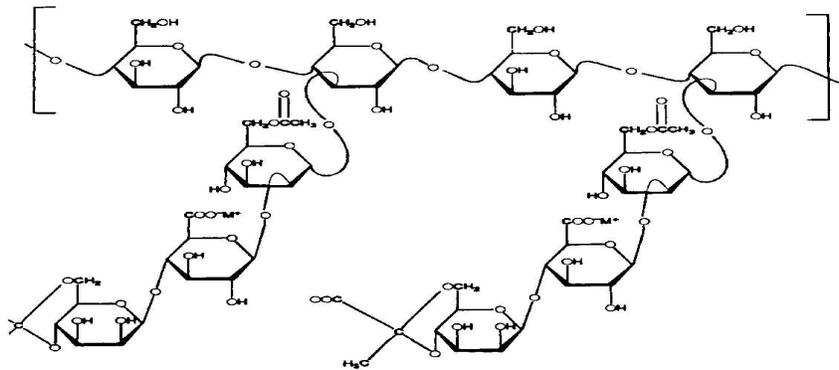


Figura 1 – Estrutura da goma xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo, cuja unidade básica repetidora é um pentassacarídeo, constituído por duas unidades de glicose, duas de manose, uma de ácido glucurônico, na proporção molar de 2,8:2,0:2,0 e grupos piruvato e acetil. Sua cadeia principal consiste em unidades de β -D-glucose com ligações nas posições 1 e 4. O trissacarídeo da cadeia lateral contém uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glucose da cadeia principal. Aproximadamente metade dos resíduos D-manose terminais contém um ácido pirúvico ligado, com distribuição indeterminada. A unidade D-manose ligada na cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-

6. A presença dos ácidos acético e pirúvico produz um polissacarídeo do tipo aniônico (SUTHERLAND *et al.*, 1992; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; PORTILHO, 2002). Cerca de 30% das ramificações possuem um grupo piruvato carregado. O peso molecular da xantana varia de 2 a 12 X 10⁶Da (Daltons), dependendo do processo fermentativo e da linhagem utilizada (LIMA *et al.*, 2001).

A principal característica da xantana é sua capacidade de modificar a reologia ou o comportamento de fluxo das soluções (MARGARITIS & PACE, 1985). Suas propriedades são determinadas por sua composição química, arranjos e ligações moleculares (PACE, 1980). O meio de cultivo e as condições operacionais influenciam no rendimento e estrutura da goma xantana produzida (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A goma xantana é um polissacarídeo natural e um importante biopolímero industrial. Foi descoberta na década de 1950 e comercializada a partir da década de 1960 (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). A xantana é completamente atóxica, tendo sido aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) dos EUA desde 1969, como aditivo em alimentos. No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (LIMA *et al.*, 2001).

É um polissacarídeo de elevado interesse industrial, principalmente para a indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica. A xantana foi o segundo biopolímero bacteriano a ser comercializado e o primeiro utilizado na indústria de alimentos, tendo sido produzida comercialmente em 1961 (MORRIS, 1992). O interesse deve-se as suas propriedades físico-químicas que superam todos os outros polissacarídeos disponíveis no mercado. Dentre estas propriedades destaca-se a sua elevada viscosidade em baixas concentrações (0,05-1%), devido a sua estrutura ramificada e seu alto peso molecular, bem como estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH (VENDRUSCOLO, 1995; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

No que concerne às propriedades reológicas, as soluções de xantana mostram um comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido. A viscosidade das soluções praticamente não se altera com a temperatura entre 4 e 93°C, com 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. Uma propriedade interessante da goma xantana é que em conjunto com galactomananas (goma guar e goma de algaroba) apresenta um aumento sinérgico de viscosidade e formam géis termorreversíveis (LIMA *et al.*, 2001). Embora não seja um agente gelificante, em combinação com a goma locuste, pode formar géis elásticos e termorreversíveis (PASQUEL, 1999).

A goma xantana com alto grau de acetilação e especialmente baixo grau de piruvatação, aumenta a viscosidade de suas soluções porque associações intermoleculares são favorecidas. Um problema importante relacionado com a produção de xantana deve-se à instabilidade das linhagens de *X. campestris*, resultando numa variação de peso molecular do polissacarídeo, assim como no grau de piruvatação e acetilação. Com a identificação dos genes responsáveis pela síntese do polissacarídeo é possível, através de manipulações genéticas, alterar o grau de acetilação, aumentar o grau de piruvatação em 45% e aumentar o rendimento da goma em 20% (LIMA *et al.*, 2001; MAUGERI, 2001).

2.4.2 Produção

É um heteropolissacarídeo produzido por cultivo aeróbio, a 28°C aproximadamente, de culturas de *Xanthomonas campestris*, normalmente pelo patovar *campestris* (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; LIMA *et al.*, 2001). O meio de cultura consiste geralmente de 2-4% glicose ou sacarose como fonte de carbono, 0,05-0,1% de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio ou uréia), fósforo e traços de outros minerais. O pH deve ser mantido próximo ao da neutralidade. O polímero é sintetizado, principalmente ao cessar o crescimento microbiano. Geralmente, a concentração final atinge 20 a 30g.L⁻¹, com rendimento de 50 a 70% e produtividade típica de 0,5g.L⁻¹.h⁻¹ (LIMA *et al.*, 2001; PORTILHO, 2002).

As temperaturas empregadas para a produção de xantana variam de 25-34°C. SHU e YANG (1990) concluíram que a temperatura ótima para a produção de

xantana depende do meio de produção utilizado, sendo esta de 28°C para o meio otimizado por García-Ochoa *et al.*, 2000.

A maioria dos pesquisadores aponta o pH neutro como ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que este decresce para 5,0 durante a produção de xantana, devido aos grupos ácidos presentes no polímero. Um estudo dos efeitos do pH mostrou que seu controle melhora o crescimento celular, mas não tem efeito sobre a produção de xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A faixa de oxigenação recomendável para a produção de xantana é de 1,5-3,5 mM O₂/L/minuto, e um bom nível de aeração é requerido para se obter uma boa produção de goma em processos fermentativos, uma vez que ocorre grande aumento da viscosidade do meio ao longo da fermentação (WOICIECHOWSKI, 2001). O tempo de fermentação é de 48 a 96 horas (LIMA *et al.*, 2001).

O grande interesse de produção de goma xantana no país, despertou o interesse no desenvolvimento de pesquisas que melhorassem geneticamente as linhagens produtoras de goma xantana, visando aumentar a sua produção e qualidade. Estudos dos genes responsáveis pela síntese de goma xantana vêm sendo realizados há muitos anos, sempre tendo como enfoque o processo de biossíntese da goma e os fatores que a relacionam com a virulência quando infectam as plantas (PADILHA, 2003).

No processo de biossíntese, dois sistemas foram identificados na rota do metabolismo de glicose em *X. campestris*, um periplásmico e oxidativo, e um segundo intracelular e fosforilativo, que foi proposto como um desvio da rota de *Enter-Doudoroff*, a glicose-6-fosfato (Glc-6-P) com derivados intermediários do fosfoenolpiruvato (PEP) e acetil Coenzima A (AcCoA), a síntese de xantana requer uma proporção significativa de cofatores, nicotinamida e ATP (LETISSE *et al.*; 2001; HSU & LO, 2003).

Estudos *in vitro* têm indicado que a biossíntese da goma ocorre em dois estágios no mínimo: primeiramente, a unidade repetitiva pentassacarídica é seqüencialmente montada ligando-se ao poliprenol através de uma ligação difosfato; num segundo estágio, as unidades repetitivas são excretadas e polimerizadas sendo

o polímero liberado para o meio de crescimento (IELPI *et al.*, 1993; VOJNOV *et al.*, 1998) (Figura 2).

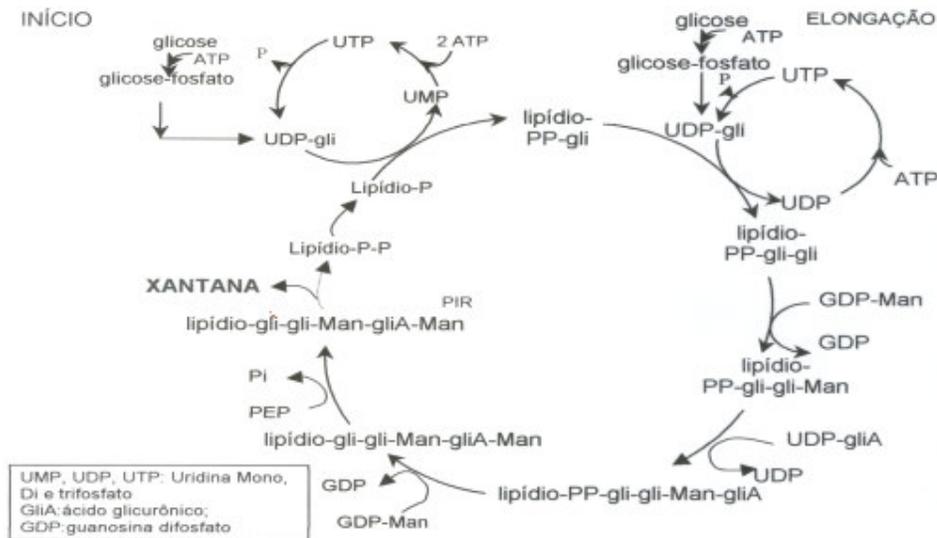


Figura 2 - Biossíntese do exopolissacarídeo goma xantana (DAWES & SUTHERLAND, 1992)

A industrialização e comercialização extensiva da xantana teve início a partir de 1964. Atualmente, os maiores produtores de goma são Merck, Kelco e Pfizer nos Estados Unidos, Rhône-Poulenc, Mero-Rousselot-Satia e Sanofi-Elf, na França e Jungbunzlauer na Áustria (GARCÍA-OCHOA, 2000; LIMA *et al.*, 2001).

2.4.3 Recuperação do biopolímero

Após a fermentação o caldo pode ser esterilizado para eliminar o microrganismo e para melhorar as características da goma em solução. Uma vez as células eliminadas, a xantana é precipitada com álcool ou sais quaternários de amônio ou separada por ultrafiltração (LIMA *et al.*, 2001).

GARCÍA-OCHOA *et al.* (2000) apresentaram um processo de recuperação de xantana que envolve etapas de: desativação ou lise das células, através de processos químicos, mecânicos ou térmicos; remoção das células por filtração (se necessário, fazer a diluição antes da filtração); recuperação do polímero por precipitação com solventes orgânicos (etanol, álcool isopropílico, misturas de sais e álcool); separação precipitado/solvente, sendo o precipitado lavado várias vezes

com o solvente que é evaporado posteriormente; secagem do biopolímero em secadores contínuos ou em batelada, a vácuo ou com circulação forçada de gás inerte.

As células podem ser eliminadas fisicamente através de centrifugação (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; GIAVASIS *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; CHI & ZHAO, 2003; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003; BOZA *et al.*, 2004) ou filtração (KANG *et al.*, 1982; GIAVASIS *et al.*, 2000).

Os polímeros são recuperados por centrifugação e precipitados preferencialmente com solventes orgânicos solúveis em água como álcool ou acetona (KANG *et al.*, 1982; MARTINS & SÁ-CORREIA, 1993; ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; GIAVASIS *et al.*, 2000; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003; CHI & ZHAO, 2003; BOZA *et al.*, 2004). A quantidade de solvente necessário para a completa precipitação depende da força iônica e da composição do polímero apesar de não depender de sua concentração. A precipitação com solventes, resulta também em purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis no solvente (PACE, 1991).

Como métodos alternativos de recuperação primária do polímero, a literatura cita a precipitação seletiva com detergentes catiônicos e ainda a produção de uma forma insolúvel de polímero por adição de certos sais ou por ajuste de pH (PACE, 1991; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; DRUZIAN, 2000).

Posteriormente os polímeros são purificados e secos em estufa, a baixas temperaturas (KANG *et al.*, 1982; ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; GIAVASIS *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; BOZA *et al.*, 2004) ou liofilizados (GIAVASIS *et al.*, 2000; DILTZ & ZELLER, 2001) e, então, preparados para as análises subseqüentes de determinação da estrutura e reologia. A purificação dos EPS pode ser feita por sucessivas diálises contra água deionizada (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; DILTZ & ZELLER, 2001; CHI & ZHAO, 2003), por reprecipitação fracionada com solvente (ASHTAPUTRE & SHAH, 1995a, 1995b, 1995c; CHI & ZHAO, 2003) ou com detergentes catiônicos, pelo uso de métodos cromatográficos ou ainda com agentes químicos ou enzimas que interagem de forma específica com certos grupos (DRUZIAN, 2000).

A secagem rápida a altas temperaturas pode resultar em um produto com baixa solubilidade ou com reologia pobre em solução, como pode ocorrer com o alginato bacteriano. Porém, o aquecimento controlado da xantana pode resultar em um produto com melhor reologia em solução (PACE, 1991).

O polissacarídeo pode ser tratado, química, física ou biologicamente durante sua separação visando se obter certas características especiais no produto final. Por exemplo, para aumentar sua dispersibilidade é tratado com dialdeídos; para aumentar sua viscosidade faz-se reagir com formaldeído e para torná-la compatível com outros polissacarídeos como a carboxi metil celulose (CMC), trata-se com celulasas (LIMA *et al.*, 2001).

2.4.4 Toxicidade

Os aspectos toxicológicos e de segurança deste polímero para aplicações em produtos alimentícios e farmacêuticos foram amplamente estudados. A xantana é um produto atóxico, não é capaz de promover sensibilização e não causa irritação na pele ou olhos (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

2.4.5 Aplicações

Sua aplicação em inúmeros segmentos industriais entre eles alimentos, fármacos, químico, petroquímico deve-se, principalmente, às suas propriedades reológicas que permitem a formação de soluções viscosas a baixas taxas de concentração (0,05-1%) e ampla faixa de estabilidade a pH e temperatura, características conferidas devido à sua estrutura ramificada e seu alto peso molecular (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; SUTHERLAND, 2002).

A goma xantana tem sido empregada numa variedade de produtos alimentícios devido às suas características, incluindo a estabilização de emulsões, estabilidade térmica, compatibilidade com ingredientes alimentícios e suas propriedades reológicas (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Ela encontra aplicações em molhos prontos (*French dressings*), alimentos congelados, suco de frutas e coquetéis, sobremesas instantâneas, produtos cárneos, etc. Fora da indústria de alimentos incluem agente de suspensão e espessante em pasta de dentes, desodorantes em

forma de géis, impressão em tecidos, suspensão de compostos químicos de uso agrícola e aumento na recuperação de petróleo (LIMA *et al.*, 2001).

A goma xantana deve provavelmente continuar sendo o polímero mais utilizado nos próximos anos, devido às suas características reológicas singulares. A vantagem da goma xantana sobre outras existentes no mercado é que ela é muito estável em relação a pH e temperatura e, apesar de mais cara por unidade de peso, é mais barata por unidade de viscosidade obtida (LIMA *et al.*, 2001).

2.5 Cinética da Produção de Biopolímeros

Para muitos microrganismos, a cinética e a eficiência de produção de polímeros, o peso molecular e sua estrutura podem ser afetados por variações nas condições de crescimento. As relações cinéticas entre o crescimento e a formação de produtos são importantes para determinar o modo de operação mais econômico. A velocidade e eficiência de formação de polímero são influenciadas pela natureza dos fatores limitantes de crescimento, assim como por outras variáveis ambientais como oxigênio dissolvido, pH e temperatura. Variações nos grupos substituintes podem afetar drasticamente as propriedades reológicas do polímero e, portanto, sua aplicação (PACE, 1991).

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração iniciais, intermediários e finais, de um ou mais componentes do sistema de cultivo (biomassa, produtos e substrato), em função do tempo de fermentação, permitindo assim os traçados das curvas de ajuste. Escolhe-se para o estudo cinético o produto de interesse econômico e o substrato limitante, isto é, o valor da concentração inicial de substrato (S_0) que definirá a concentração máxima da população microbiana (X_m) (HISS, 2001).

Uma vez que esses valores de concentração representam parte de um conjunto de dados, necessários ao dimensionamento de uma instalação produtiva, fica evidente que sem o conhecimento da cinética torna-se inviável a transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial. Cabe mencionar que a cinética possibilita também uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo (pH, temperatura, etc.), por intermédio de variáveis como: velocidades de transformação e fatores de conversão, obtidos a partir das curvas de

ajuste $X=X(t)$ (biomassa em função do tempo), $P=P(t)$ (produto em função do tempo) e $S=S(t)$ (substrato em função do tempo) (HISS, 2001).

Entretanto, os critérios de comparação entre diferentes condições são relativos, isto é, dependem do que se espera obter de um determinado processo fermentativo. Outro aspecto que merece atenção, é que os métodos comumente utilizados para a medida da concentração celular representam uma informação muito simples do que ocorre em um fenômeno biológico. O microrganismo promove a transformação de substrato em produto através da atividade de enzimas que são sintetizadas pelo próprio microrganismo. Sendo essas sínteses controladas pelo meio externo (fenômenos de indução e repressão), torna-se muito difícil, senão impossível, identificar qual(is) medida(s) são realmente representativas da transformação em estudo; dificuldade esta que ocorre mesmo nos sistemas mais homogêneos (HISS, 2001).

2.6 Reologia de Biopolímeros

A reologia é o estudo da deformação e do escoamento da matéria; sendo que a deformação aplica-se no caso da matéria sólida e o escoamento quando a matéria é líquida. No caso mais simples, a propriedade reológica de interesse no caso de sólidos é a sua elasticidade, e nos líquidos é a viscosidade, que pode ser interpretada como a resistência que um fluido oferece para escoar ou também como a medida da fricção interna de um fluido (PASQUEL, 1999).

As propriedades reológicas das soluções mudam com a natureza do polímero, dependem do peso molecular médio, da estrutura molecular, dos grupos acetil ou piruvato. (CASAS *et al.*, 2000; MORADI-ARAGHI, 2000; DILTZ & ZELLER, 2001; NAVARRETE *et al.*, 2001).

Viscoelasticidade é uma das propriedades reológicas mais simples de substâncias de comportamento reológico complexo, como são os biopolímeros, uma vez que soluções de biopolímeros com interesse de aplicação comercial exibem propriedades viscoelásticas, isto é, a capacidade de formar géis verdadeiros em baixas concentrações e, portanto, com características intermediárias entre sólidos e líquidos (SZCZESNIAK, 1983).

Entretanto, uma das importantes indicações de que um biopolímero tem propriedades funcionais com viabilidade de aplicação comercial como agente espessante, estruturante ou gelificante, é o resultado da medida da viscosidade aparente de suas soluções aquosas (SZCZESNIAK, 1985).

A viscosidade de uma solução polimérica é uma função do tamanho e da forma e conformação que adotam suas moléculas no solvente, sendo que no caso de alimentos e bebidas, o solvente é uma solução aquosa de outros solutos. Assim sendo, as soluções de gomas são dispersões de moléculas hidratadas e/ou agregados de moléculas hidratadas, e seu comportamento reológico é determinado pelo tamanho, forma, facilidade de deformação ou flexibilidade, e presença e magnitude da carga elétrica nessas moléculas hidratadas e/ou agregados. As soluções de polissacarídeos exibem dois tipos gerais de comportamento reológico: pseudoplástico e tixotropia. As soluções da maioria das gomas experimentam uma diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura, sendo que a goma xantana é uma exceção entre 0°C e 100°C (PASQUEL, 1999).

A xantana é extremamente pseudoplástica, e esta é uma característica muito desejada em diversas situações. Efetivamente, polissacarídeos que possuem comportamento pseudoplástico provocam menos sensação de gomosidade na boca do que aqueles com comportamento newtoniano (é aquele em que a viscosidade se mantém inalterada com o aumento da taxa de deformação) (NAVARRO, 1997; MORRIS, 1984). Sua associação com hidrocolóides, como proteínas e outros biopolímeros, pode potencializar o efeito pseudoplástico (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

As soluções de xantana apresentam uma pequena tixotropia; a diminuição verificada na viscosidade é quase que totalmente reversível, desde que não haja imediata destruição da estrutura interna, causada pela aplicação de taxa de deformação muito alta (NAVARRO, 1997). Uma certa tixotropia é de grande utilidade para cosméticos, como loções e xampus, e tintas, por exemplo, pois facilita a retirada do produto da embalagem (sem ocorrer escorrimento exagerado) e seu espalhamento durante a utilização (MOREIRA, 2002).

A estrutura química de cada biopolímero, bem como os grupos substituintes que ele possui determinam suas características reológicas e, portanto, suas potenciais aplicações (PACE, 1991).

2.7 Considerações Finais

O interesse comercial pelo EPS sintetizado por *Xanthomonas* sp deve-se às características reológicas apresentadas, como alta viscosidade em baixa concentração, altos níveis de pseudoplasticidade e tolerância à presença de sais e mudanças no pH das suas soluções aquosas ((SUTHERLAND, 1982). Outro fator relevante é o rendimento de biopolímero pelas linhagens, a partir de glicose ou sacarose, em fermentações líquidas (MORRIS, 1984).

Portanto, o sucesso comercial da goma xantana induziu a realização de *screening* a partir de linhagens de *Xanthomonas* sp isoladas no Brasil, a fim de selecionar as que possam produzir o biopolímero com igual ou maior interesse comercial aos que são utilizados atualmente nas produções em escala industrial.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Foram utilizadas dez linhagens do gênero *Xanthomonas*. As linhagens foram obtidas a partir da Coleção de Culturas do Instituto Biológico – Campinas – SP (Tabela 1).

Tabela 1 – Linhagens de *Xanthomonas* utilizadas na produção de goma xantana.

CONTROLE	NÚMERO LINHAGEM	DENOMINAÇÃO LINHAGEM
01	1537	<i>Xanthomonas campestris</i>
02	1230	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i>
03	254	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
04	1198	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>arracaciae</i>
05	1182	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i>
06	1078	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
07	68	<i>Xanthomonas melonis</i>
08	729	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
09	607	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>
10	1167	<i>Xanthomonas</i> sp

3.2 Metodologia

3.2.1 Esterilização dos meios e materiais para trabalhos assépticos

Todos os materiais empregados nos ensaios microbiológicos e de produção foram esterilizados por meio de vapor úmido (em autoclave) a temperatura de 121°C por um período de 30 minutos. Os meios de cultivo e de fermentação foram esterilizados também por meio de vapor úmido (em autoclave) a temperatura de 121°C por um período de 15 minutos.

3.2.2 Repique e caracterização morfológica dos microrganismos

Os microrganismos foram mantidos em meio YM (Yeast Malt) contendo (g.L⁻¹): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0; agar 20,0; água destilada q.s.p., pH 7,0. Para o crescimento celular não foi adicionado agar (JEANNES *et al.*, 1976).

Os repiques foram realizados a cada 30 dias 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.

Para preservar as culturas e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento das linhagens em *freezer* -80°C . O procedimento de congelamento constou das seguintes etapas: incubação da cultura em meio YM líquido, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, até atingir uma absorbância (560nm) entre 2,5 e 5,5 (dependendo da linhagem); adição de um agente crioprotetor estéril (glicerol 13% p/v); homogeneização da mistura, sendo a suspensão aliquoteada em microtubos estéreis (1,5mL), devidamente identificados; e congelamento imediato em *freezer* -80°C . Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica (STANBURY *et al.*, 2000).

3.2.3 Caracterização genética do microrganismo por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

3.2.3.1 Extração de DNA e seleção de *primers*

Foi utilizada a metodologia segundo SAMBROOK *et al.* (1989), conforme descrição abaixo, com algumas modificações previamente testadas em outros estudos.

O DNA cromossômico foi extraído a partir das células crescidas em meio YM líquido por 24 horas. O processo de extração do DNA consistiu basicamente em separar as células por centrifugação (13000rpm, 5 minutos, 10°C), sendo acrescentado ao precipitado 600 μL de tampão Tris-HCl 25mM pH 8,0, 10mM EDTA, 50mM glicose e 50 μL de enzima lítica (lisozima), para romper a parede celular. Após 10 minutos de repouso, adicionou-se 66 μL SDS 10% e 3 μL de 2-mercaptoetanol,

incubou-se a temperatura de 65°C por 30 minutos, acrescentou-se 190µL de acetato de sódio 3M e levou-se à geladeira ($\pm 5^\circ\text{C}$) durante 30 minutos. Foi realizada uma centrifugação, retirando-se o sobrenadante para uso, ao qual foi adicionado 1 volume de isopropanol, misturado e levado ao *freezer* ($\pm -15^\circ\text{C}$) por 10 minutos. Após nova centrifugação, foi descartado o sobrenadante e deixado secar o precipitado que foi ressuspenso em 200µL de TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0). Para verificar se ocorreu a extração do DNA foi realizada uma corrida com 10µL de amostra, em gel de agarose 0,8%, por 1 hora, em voltagem constante de 90 Volts, em tampão TBE (0,089M Trisma, 0,089M ácido bórico e 0,008M EDTA).

Foram testados 60 *primers* pertencentes aos kits de *primers* randômicos OPA, OPB, OPF, OPH, OPW e OPY da OPERON *Technologies*, escolhidos aleatoriamente.

3.2.3.2 Quantificação do DNA

Para quantificação adicionou-se 20µL de amostra em 980µL de água Mili-Q estéril. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro UV a 260nm e confirmação da pureza e integridade em espectrofotômetro UV a 280nm (proteína) e em gel de agarose 0,8%. Fez-se as diluições visando obter uma concentração final de DNA de 10ng/µL.

3.2.3.3 Reação de amplificação de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Foi utilizada a reação descrita por WILLIAMS *et al.* (1991), com algumas modificações. Com um volume total de 25µL: tampão de reação (50mM Tris-HCl pH 9,0, 50mM KCl), dNTPs (200mM de cada), 0,2mM de *primer*, 3mM de MgCl₂, 0,25mM de Triton-X-100, 1,5U (unidades) de Taq DNA *polymerase recombinant* da Invitrogen (*Life Technologies*, São Paulo, Brasil) e aproximadamente 40ng de DNA (4µL de amostra).

3.2.3.4 Amplificação de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

A amplificação foi realizada em termociclador MJ Rsearch Inc., Watertown, MA (modelo PTC100™ *Programmable Thermal Controller*). O processo de amplificação foi baseado na seguinte seqüência: 3 minutos a 92°C, 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 35°C e 2 minutos a 72°C. Após, 3 minutos a 72°C e resfriamento a 4°C até a retirada das amostras.

3.2.3.5 Análise eletroforética dos fragmentos amplificados

A separação eletroforética foi realizada em gel de agarose 1,4% em tampão TBE 1X (0,089M Trisma, 0,089M Ácido bórico e 0,008M EDTA) em cuba de eletroforese horizontal. A corrida foi efetuada com voltagem constante de 90 Volts durante 3 horas. Como marcador de peso molecular foi utilizado DNA Lambda Clivado com EcoRI e Hind III da Gibco BRL. A coloração dos fragmentos foi realizada com brometo de etídio e a observação feita sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados pelo sistema fotográfico digital GEL-PRO (*Media Cybernetics, Silver Spring, MD*).

3.2.3.6 Análise dos dados

Na determinação da variabilidade genética, os dados obtidos através da determinação da presença ou ausência de bandas formaram uma matriz que foi analisada com auxílio do programa computacional NTSYS versão 1.7 (ROHLF, 1992) (*Numerical Taxonomy System of Multivariate Analysis System*). Os dendrogramas foram construídos pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*), desenvolvido por SOKAL e MICHENER (1958), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. Os limites de confiança dos agrupamentos formados foram calculados pela randomização de 100 amostragens dos resultados usando o programa Winboot (YAP e NELSON, 1996). De cada microrganismo foi analisada uma amostra do repique inicial e uma do final, totalizando 20 amostras.

3.2.4 Curva de crescimento microbiano

A curva foi realizada em triplicata, a partir da transferência asséptica de 1mL de inóculo inicial ($DO_{560nm} = \pm 2,0$, dependendo da linhagem) em 50mL de meio YM líquido. Este foi incubado em agitador orbital, com agitação de 120rpm, na temperatura de $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$. Foram retiradas amostras a cada 4 horas, de forma asséptica, para verificação do crescimento microbiano.

O crescimento celular foi avaliado através da leitura de absorbância, em comprimento de onda de 560nm, em espectrofotômetro, contra um branco constituído do meio YM sem inóculo; e do plaqueamento em agar YM através da técnica do *pour-plate*. As curvas de crescimento microbiano foram construídas a partir dos dados de absorbância e contagem total.

3.2.5 Produção de células

A produção de células foi realizada em duas etapas. Primeiro preparou-se um pré-inóculo, partindo de uma alçada de cultura crescida sobre agar YM e incubada em estufa por 24 a 48 h, na temperatura de $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$. Esta foi inoculada em 50mL de meio YM líquido, em erlenmeyers com capacidade de 300 mL, incubado em agitador orbital, com agitação de 120rpm, a uma temperatura de $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, até atingir uma $DO_{560nm} = \pm 2,0$ (dependendo da linhagem), o que ocorre em torno de 24 horas.

Transcorrido este período preparou-se o inóculo, através da transferência asséptica de 1mL de pré-inóculo para erlenmeyers de 300 mL, contendo 50mL de meio YM líquido e incubou-se em agitador orbital, com agitação de 120rpm, a uma temperatura de $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, até $DO_{560nm} = 2,5$ a $5,5$, que correspondem ao ótimo da fase log de crescimento dos microrganismos estudados. Essa faixa de absorbância é atingida em aproximadamente 40 horas de incubação e corresponde a uma concentração celular em torno de 10^{11} UFC/mL (dependendo da linhagem).

3.2.6 Produção da goma xantana

Utilizado 14mL de inóculo (com concentração celular em torno de 10^{11} UFC/mL, conforme a linhagem) e adicionado 86mL do meio de produção de biopolímero,

contendo (g.L^{-1}): $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2,5; K_2HPO_4 5,0; H_3BO_3 0,006; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0; FeCl_3 0,0024; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002; ZnSO_4 0,002; sacarose 50,0, pH 7,0. O meio inoculado foi posteriormente incubado em agitador orbital, com agitação de 180 rpm, a uma temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por um tempo de 96 horas, em erlenmeyers de 300 mL. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.7 Recuperação da goma xantana

O caldo de fermentação foi centrifugado em uma velocidade de 5500rpm por um tempo de 40 minutos, a uma temperatura de 4°C , para a remoção das células. Ao sobrenadante foi adicionado etanol (1:3, v/v) para a precipitação da goma, sendo observada a formação do precipitado de imediato. Foi armazenado sob refrigeração ($\pm 4^\circ\text{C}$) durante 12 horas. Transcorrido o tempo de refrigeração as amostras foram novamente centrifugadas em uma velocidade de 7000rpm, durante 30 minutos, a uma temperatura de 4°C , para recuperação do biopolímero precipitado que foi seco em estufa ($50^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$, 24 horas) e pesado até peso constante. O polissacarídeo foi armazenado em frasco vedado para as análises posteriores.

As células sedimentadas, resultantes da primeira centrifugação, foram secas em estufa ($50^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$, 24 horas), pesadas até peso constante, sendo calculado o peso seco de massa celular.

3.2.8 Cinética do processo fermentativo

Com o objetivo de verificar a cinética de consumo de substrato, da produção de biomassa e da produção de biopolímero, foi conduzida uma fermentação com agitação de 180rpm, a uma temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante 96h, com cada linhagem estudada. Foi realizada triplicata de cada uma das linhagens, sendo retiradas, assepticamente, alíquotas para a construção das curvas cinéticas.

A biomassa e a produção de polímero foram determinadas gravimetricamente, seguindo-se o procedimento já descrito para recuperação do biopolímero (PACE, 1991; FIALHO *et al.*, 1999; DILTZ & ZELLER, 2001; GIAVASIS *et al.*, 2003; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003). O consumo de substrato foi medido através do conteúdo de açúcares redutores (ART) presentes no caldo de fermentação, sendo determinado pelo método do DNS (MILLER, 1959).

Foram realizados os cálculos dos seguintes parâmetros cinéticos, para um tempo final de fermentação de 96 horas:

Velocidade volumétrica de formação de biomassa: $r_x = dx/dt = (X_f - X_0)/(t_f - t_0)$ ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Velocidade volumétrica de formação de produto: $r_p = dx/dt = (P_f - P_0) / (t_f - t_0)$ ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Velocidade volumétrica de consumo substrato: $r_s = dx/dt = - (S_f - S_0)/(t_f - t_0)$ ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Eficiência de conversão substrato – produto: $Y_{P/S} = P_f / (S_0 - S_f)$

Eficiência de conversão substrato – biomassa: $Y_{X/S} = X_f / (S_0 - S_f)$

Onde: $X_0 = []$ biomassa medida no tempo t_0

$X_f = []$ biomassa medida no tempo t_f

$P_0 = []$ produto medido no tempo t_0

$P_f = []$ produto medido no tempo t_f

$S_0 = []$ substrato medido no tempo t_0

$S_f = []$ substrato medido no tempo t_f

$t_0 =$ tempo 0 hora

$t_f =$ tempo 96 horas

3.2.9 Análise reológica da goma xantana

Foram preparadas soluções aquosas das gomas sintetizadas pelas 10 linhagens estudadas, na concentração de 3%, para análise de viscosidade aparente, na temperatura de 25°C, no *spindle* 18 e no *spindle* 31.

Para as análises de viscosidade aparente foi utilizado o reômetro digital marca Brookfield, modelo LVDV III+, acoplado a um banho-maria, marca Brookfield, modelo TC-502P; utilizando-se o adaptador para pequenas amostras, *spindle* 18, que, segundo o manual do fabricante, permite variar a taxa de cisalhamento de 0 a 264s^{-1} e a viscosidade de 1,3 a 30000cP. Para as amostras de goma das duas linhagens que apresentaram maior produtividade, utilizou-se também o *spindle* 31. As leituras foram realizadas a intervalos de 10 segundos, variando-se a taxa de cisalhamento ($0-264-0\text{s}^{-1}$), conforme a característica de cada uma das amostras.

As unidades de medida utilizadas foram: centipoise (cP) = mPas/s⁻¹ para viscosidade aparente, 1/segundo (s⁻¹) para taxa de cisalhamento e dyna/centímetro quadrado (D/cm²) para tensão de cisalhamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item serão abordados aspectos relacionados à produção e caracterização dos biopolímeros. A primeira etapa baseou-se na avaliação da manutenção das linhagens de *Xanthomonas* sp em estudo, através de análise das características morfológicas das colônias bem como da caracterização genética com o intuito de agrupar as espécies e patovares, como também de avaliar possíveis alterações genômicas dos microrganismos ao longo do período de manutenção.

A segunda etapa do estudo baseou-se nas curvas de crescimento das linhagens o que possibilita a obtenção de processos fermentativos reprodutivos. Com esta abordagem é possível realizar o *screening* das linhagens quanto à produtividade de goma xantana. A terceira etapa do estudo objetivou caracterizar os biopolímeros obtidos quanto à viscosidade aparente das suas soluções aquosas.

4.1 Características morfológicas das colônias

Neste item, foram realizados ensaios de coloração de Gram e plaqueamento da cultura em agar YM a fim de verificar as características morfológicas das colônias. Observou-se que todas as linhagens estudadas apresentam formato de bastonetes, são Gram-negativas e têm coloração amarela.

As Figuras 3 a 7 apresentam fotografias das colônias das linhagens de *Xanthomonas* sp estudadas.

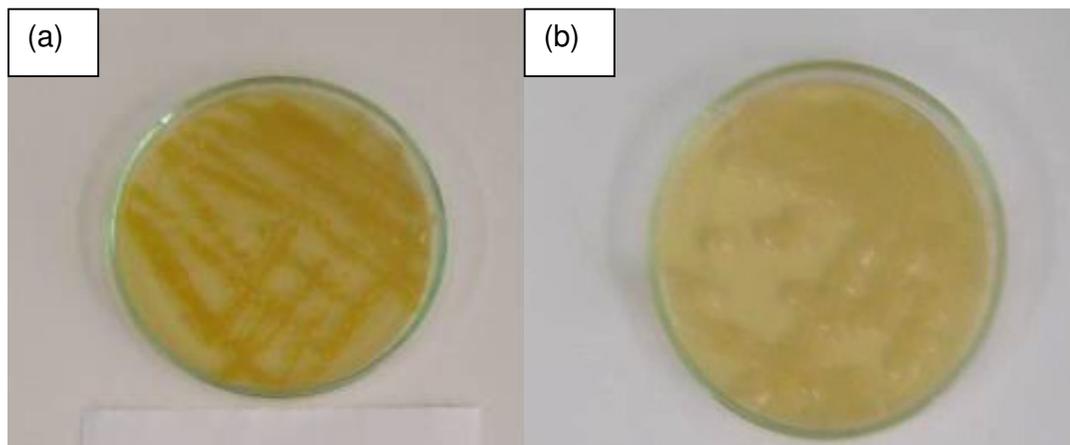


Figura 3 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *Xanthomonas campestris* (01 - 1537) (a) e de *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (02 - 1230) (b).

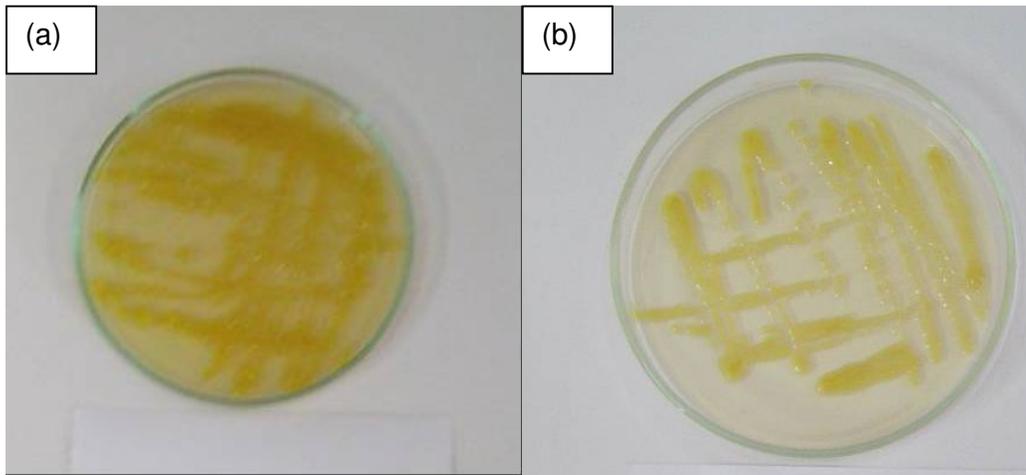


Figura 4 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (03 - 254) (a) e de *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae* (04 - 1198) (b).

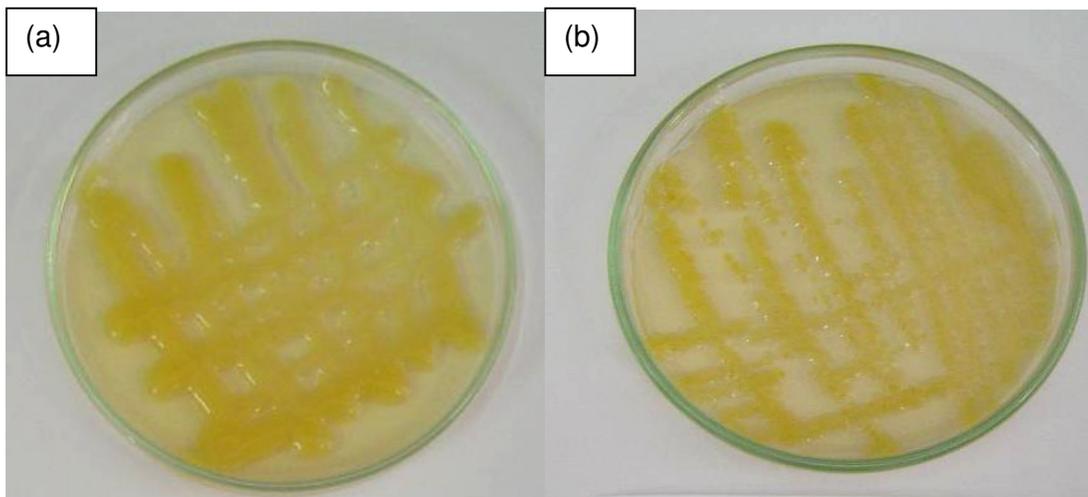


Figura 5 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (05 - 1182) (a) e de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (06 - 1078) (b).

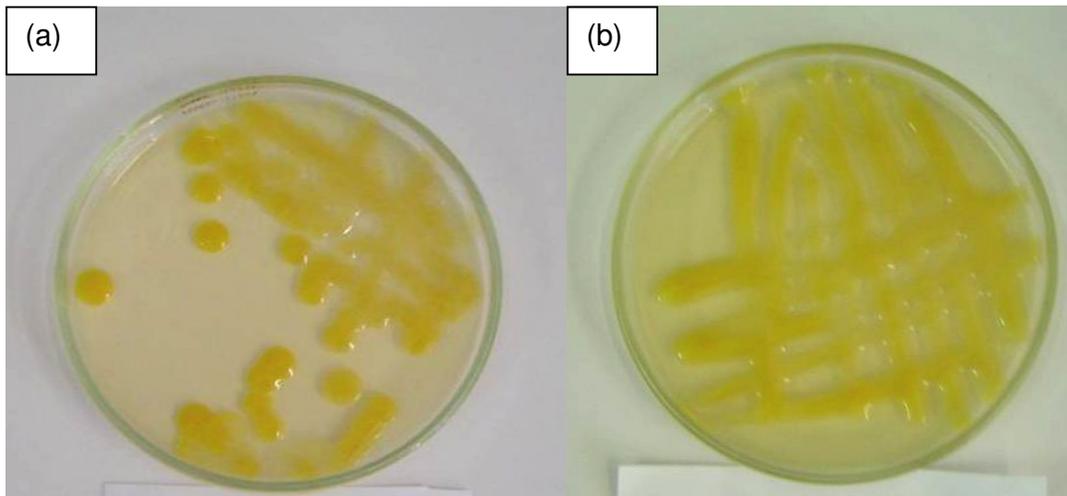


Figura 6 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *Xanthomonas melonis* (07 - 68) (a) e de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (08 - 729) (b).

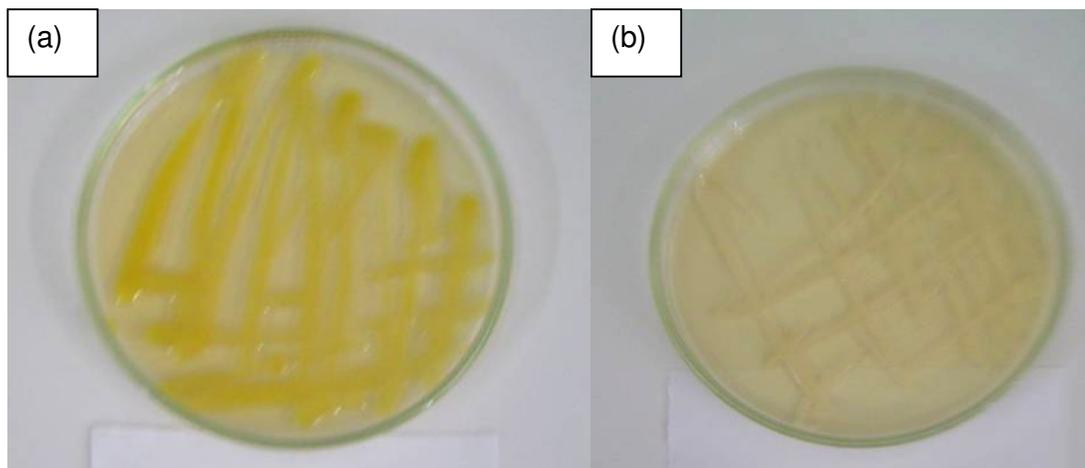


Figura 7 - Aspecto das colônias, crescidas em ágar YM, $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 horas, de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (09 - 607) (a) e de *Xanthomonas* sp (10 - 1167) (b).

Segundo BRADBURY (1984) e GARCÍA-OCHOA (2000), as colônias de *Xanthomonas* sp são normalmente amarelas, lisas e viscosas. Entretanto, pode-se observar que as linhagens 1230 e 1167 possuem pigmentação menos intensa ou ausência desta.

A pigmentação das colônias deve-se às xantomonadinas, que são pigmentos amarelos característicos do gênero *Xanthomonas*, este pode estar ausente quando ocorre alguma degradação ou mutação. Segundo POPLAWSKY *et al.* (1998) e POPLAWSKY, URBAN e CHUN (2000), este grupo de pigmento possui elevado interesse científico pois, aparentemente encontra-se relacionado a fatores de difusibilidade de baixo peso molecular (feromônio), bem como na regulação de diversos processos fisiológicos na bactéria. Dentre estes processos encontra-se a regulação da síntese de enzimas extracelulares e a produção do polissacarídeo extracelular sintetizado. No entanto, estes autores relatam que a literatura é incipiente quanto às pesquisas em relação a estes fatores. Até o momento vem-se pesquisando a relação destes ao processo de patogenicidade entre planta-hospedeiro.

A partir dos resultados obtidos na caracterização morfológica verificou-se a análise genética das linhagens, para observar a ocorrência de mutações e a possibilidade de agrupar as linhagens por similaridade genética avaliando-se os fragmentos randômicos.

4.2 Caracterização genética do microrganismo por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

É de elevada importância a caracterização genética do DNA de bactérias especialmente para comprovar a não ocorrência de mutações durante os repiques sucessivos aos quais os microrganismos são submetidos ao longo das pesquisas.

Inicialmente foi realizada a seleção de *primers* para posterior análise de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), onde foram testados 60 *primers* pertencentes aos kits de *primers* randômicos OPA, OPB, OPF, OPH, OPW e OPY da OPERON Technologies, escolhidos aleatoriamente, juntamente com o DNA da *Xanthomonas campestris* CA110 e das linhagens estudadas.

WILLIAMS *et al.* (1990) utilizaram a técnica do RAPD para analisar o DNA de bactérias, com o objetivo de determinar se *primers* curtos podem ser usados para amplificar segmentos de DNA de genomas pequenos. Eles observaram que genomas tão pequenos como o da *E. coli* (4×10^3 kbp) suportam amplificação e que a bactéria pode ser distinguida de acordo com os modelos de bandas de seu DNA sobre um gel de agarose.

Na Tabela 2 encontram-se relacionados os dez *primers* que melhor amplificaram o DNA destas bactérias. A seleção dos *primers* foi baseada no número de regiões amplificadas, observando-se as que apresentaram maior número de bandas, com alta reprodutibilidade e intensidade.

Os *primers* selecionados foram utilizados para análise de RAPD das *Xanthomonas* estudadas, comparando-se os repiques inicial e final entre si e entre as linhagens, com a finalidade de verificar a ocorrência de variabilidade genética entre estas e durante o armazenamento.

Levando em consideração as 10 linhagens estudadas foi identificado um total de 93 fragmentos, sendo que destes, 70 (75,27%) mostraram-se polimórficos (Tabela 2). Os fragmentos amplificados apresentavam entre 50 e 2200 bp. O número médio de fragmentos por *primer* foi de 9,3. A Figura 8 mostra a variabilidade observada dentro das diferentes espécies avaliadas utilizando o *primer* OPH 18.

SILVA-MANN *et al.* (2002) investigaram a utilização de marcadores moleculares de isoenzimas e proteínas e de DNA, do tipo RAPD, para verificar a variabilidade genética em alguns isolados de *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. Foram usados dez isolados, sendo três classificados como causadores de antracnose e sete de ramulose, pelo teste de patogenicidade. Os marcadores bioquímicos não se mostraram eficientes para a distinção dos isolados causadores de ramulose e da antracnose. A análise de RAPD mostrou similaridade mínima de 35% e máxima de 85%, confirmando a potencialidade da técnica para diferenciar tais fungos.

Tabela 2: Número total e número de fragmentos polimórficos obtidos em cada *primer* utilizado com os 10 microrganismos.

Primer	Seqüência (5' para 3')	Total de fragmentos	Fragmentos polimórficos
OPA-03	AGTCAGCCAC	08	8
OPA-12	TCGGCGATAG	11	7
OPA-13	CAGCACCCAC	8	7
OPA-20	GTTGCGATCC	9	5
OPF-05	CCGAATTCCC	7	2
OPF-09	CCAAGCTTCC	8	6
OPH-18	GAATCGGCCA	14	13
OPW-19	CAAAGCGCTC	9	7
OPY-03	ACAGCCTGCT	8	5
OPY-17	GACGTGGTGA	11	10
	Total	93	70
% de Polimorfismo			75,27%

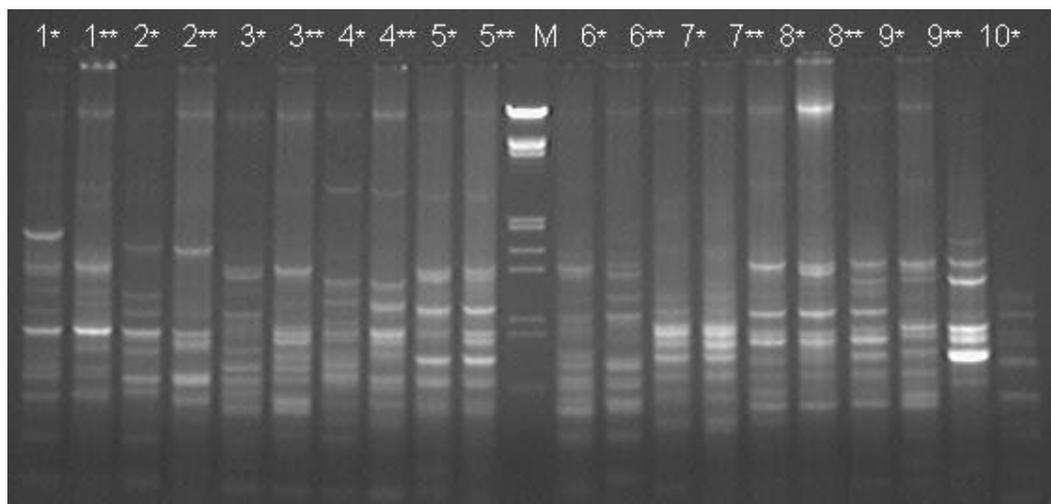


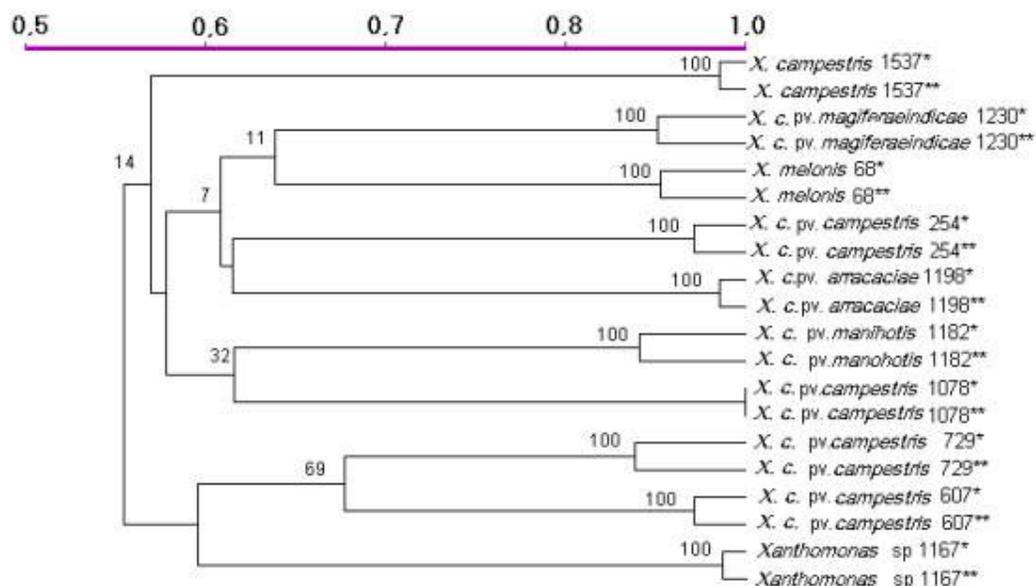
Figura 8 - Gel de agarose demonstrativo obtido com o *primer* OPH 18.

A similaridade de 0,47 a 0,71 entre as linhagens analisadas pode ser considerada baixa (Tabela 3). Estes resultados indicam a existência de uma alta variabilidade entre as cepas. Poderia ser esperado que existisse uma baixa similaridade entre *Xanthomonas* de espécies diferentes, mas não era esperado que mesmo entre as de mesma espécie e apenas de patovares diferentes houvessem perfis genotípicos mais variados (Figura 9).

Tabela 3 - Similaridades entre os linhagens analisadas.

População	S _J	S _J	S _J	Variância	Desvio Padrão	*C V %
	Média	Mínimo	Máximo			
<i>Xanthomonas</i> sp	0,59	0,47	0,71	0,003	0,054	9,15

*Coeficiente de Variação



* Repique inicial

** Repique final

Figura 9 - Dendrograma baseado em análise de agrupamento (UPGMA) de estimativa de similaridade genética (coeficiente de Jaccard) por RAPD entre os repiques inicial e final das diferentes linhagens de *Xanthomonas* sp. Os números dentro do dendrograma referem-se aos limites de confiança dos agrupamentos, calculados pelo programa Winboot.

A análise de RAPD entre as linhagens não permitiu um total agrupamento das linhagens por patovar ou por espécie. Porém, como a análise dos limites de confiança dos agrupamentos entre as diferentes linhagens foi baixa (7 a 69% de confiança), é possível que a inclusão de mais *primers* nesta avaliação permitisse um melhor agrupamento destas linhagens, embora sem alterar significativamente os índices de similaridade.

Mesmo entre as diferentes procedências de um mesmo patovar as diferenças genéticas foram tão elevadas quanto entre espécies diferentes de *Xanthomonas*. Este resultado indica que as características utilizadas na classificação deste microrganismo (morfológicas, fisiológicas e de patogenicidade) não refletem a variabilidade genética existente, ainda que sejam as características de maior interesse. Assim, as diferenças genéticas encontradas entre os microrganismos analisados sugere que não se pode descartar nenhum isolado quando se deseja realizar um *screening* deste microrganismo, buscando-se uma característica específica. Além disso, a quantidade de genes envolvidos nas rotas metabólicas de características específicas, principalmente fermentativas, é geralmente pequeno, o que permite que mesmo microrganismos muito diferentes geneticamente entre si, mantenham os genes associados a esta determinada rota, e isso não é detectado pela análise de RAPD.

TEIXEIRA *et al.* (2004) utilizaram marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. Este fungo e *Fusarium verticillioides* normalmente apresentam algumas similaridades morfológicas, o que dificulta sua diferenciação em sementes de milho (*Zea mays*), particularmente quando ocorrem simultaneamente. Técnicas moleculares de análise do DNA têm possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos no diagnóstico de fitopatógenos, em complemento à análise morfológica. O trabalho destes autores objetivou caracterizar e dimensionar a diversidade genética de dez isolados de *A. strictum* obtidos de sementes de milho, provenientes de diferentes regiões produtoras brasileiras, por meio da análise do DNA genômico (RAPD). Objetivou-se ainda, diferenciar os isolados de *A. strictum* de *F. verticillioides* por meio da técnica citada. Pela análise do DNA, 25 *primers* OPERON Technologies geraram polimorfismos, os quais tornaram possível e seguro o agrupamento de

isolados de *A. strictum* e sua diferenciação de *F. verticillioides*. Os isolados de *A. strictum* apresentaram variabilidade intraespecífica entre 3,4% e 44,4%. Assim sendo, a similaridade de 55,6 a 96,6% entre os isolados de *A. strictum* pode ser considerada elevada. Estes resultados indicam que é pouco provável a existência de alta variabilidade intraespecífica em *A. strictum*, ainda que tenham sido analisados poucos indivíduos. Foi possível constatar também 75,8% a 87% de polimorfismo (dissimilaridade) entre *A. strictum* e *F. verticillioides*. Para a maioria dos casos não foi possível correlacionar a similaridade genotípica e a origem geográfica dos isolados de *A. strictum*.

Através da análise de RAPD verificou-se que a similaridade entre as amostras de DNA dos diferentes repiques de *Xanthomonas* (inicial e final), analisadas pelo método de agrupamento UPGMA (SOKAL & MICHENER, 1958), com coeficiente de similaridade de Jaccard, ficou acima de 90%, com um limite de confiança de 100%, fornecido através da análise destes agrupamentos pelo programa Winboot (YAP & NELSON, 1996) comprovando que, segundo a análise de RAPD, não houve mutações detectáveis destas bactérias durante a pesquisa.

As similaridades entre os repiques inicial e final, embora altas (0,92 a 1,00) mostram pequenas diferenças entre o DNA inicial e o final (Tabela 4). Isso pode ser atribuído ao fato de que as culturas iniciais não serem puras, e sim axênicas, ou seja, originárias de várias células iniciais que já podiam conter pequenas diferenças genéticas. Como, para a extração dos DNAs foram utilizadas alíquotas destas células, é provável que entre a primeira extração de DNA (repique inicial) e a segunda extração de DNA (repique final), não se tenha amostrado as mesmas células. Outro fator a ser ressaltado é que a própria análise de RAPD mostra similaridades entre as diferentes procedências das mesmas linhagens abaixo de 0,7 (Tabela 3), podendo-se considerar as similaridades entre os repiques elevadas, atribuindo-se as pequenas diferenças às próprias limitações da técnica de RAPD.

Também pode se verificar a ausência de mutações detectáveis observando as características morfológicas das colônias e teste de Gram (4.1), onde não foram detectadas diferenças, demonstrando que as bactérias conservaram suas características.

Tabela 4 - Similaridades entre repiques inicial e final dos microrganismos analisados.

CONTROLE	NÚMERO LINHAGEM	DENOMINAÇÃO LINHAGEM	SIMILARIDADE ENTRE REPIQUE INICIAL/FINAL
01	1537	<i>Xanthomonas campestris</i>	0,98
02	1230	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>magiferaeindicae</i>	0,94
03	254	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0,96
04	1198	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>arracaciae</i>	0,98
05	1182	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	0,93
06	1078	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	1,00
07	68	<i>Xanthomonas melonis</i>	0,94
08	729	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0,92
09	607	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	0,96
10	1167	<i>Xanthomonas</i> sp	0,98

4.3 Curva de crescimento microbiano

Para alcançar o objetivo proposto neste estudo, de se obter produções de goma xantana reprodutíveis, foram inicialmente obtidas as curvas de crescimento celular de cada microrganismo estudado.

Desta forma, inicialmente, as curvas nos propiciam informações tais como, a faixa de absorvância (560 nm) correspondente ao ótimo da fase log e a concentração celular que esta faixa corresponde.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, que podem ser visualizados nas Figuras 10 a 19, pode-se observar que o ótimo da fase log ocorre entre 36 e 48 horas de incubação a temperatura de 28°C, com agitação de 120 rpm, variando conforme a linhagem estudada. Esta faixa de tempo de incubação corresponde a

uma concentração celular média de 10^{11} UFC/mL, sendo portanto esta concentração celular utilizada como inóculo.

A partir dos valores obtidos para a construção das curvas de crescimento foi realizada a regressão linear referente a fase log, plotando-se a média das absorbâncias x log da média das contagens, obtendo-se as equações e respectivos R^2 .

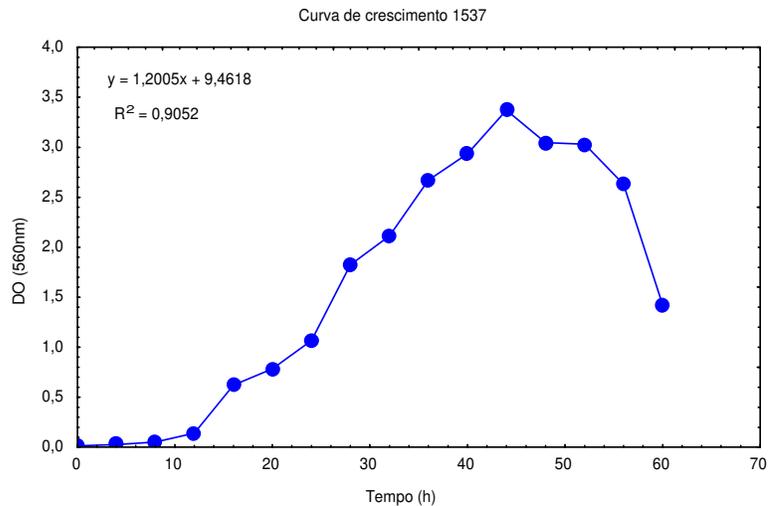


Figura 10 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas campestris* (01 - 1537).

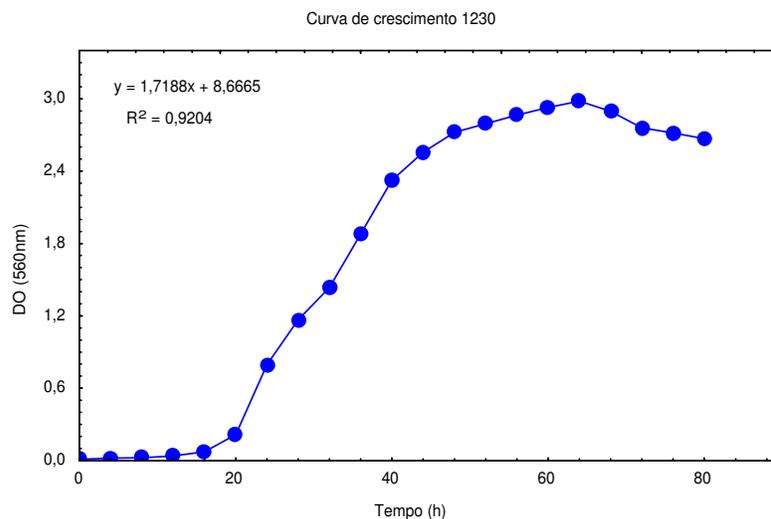


Figura 11 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (02 - 1230).

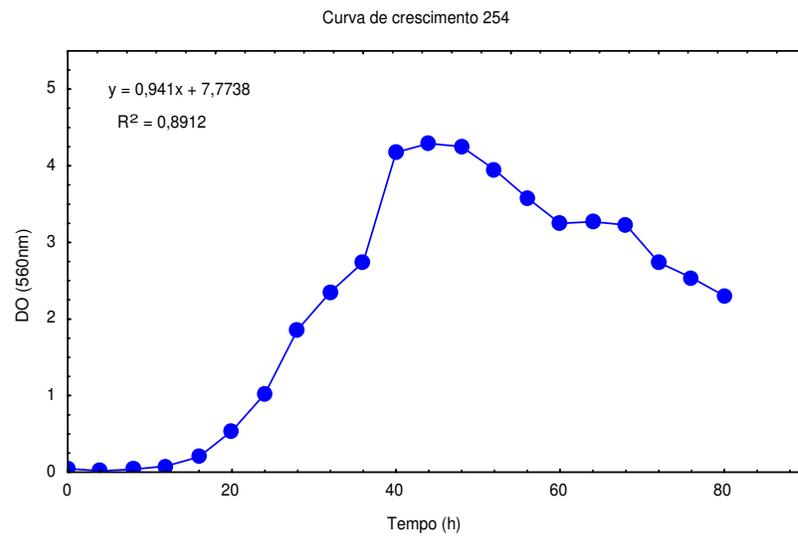


Figura 12 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (03 - 254).

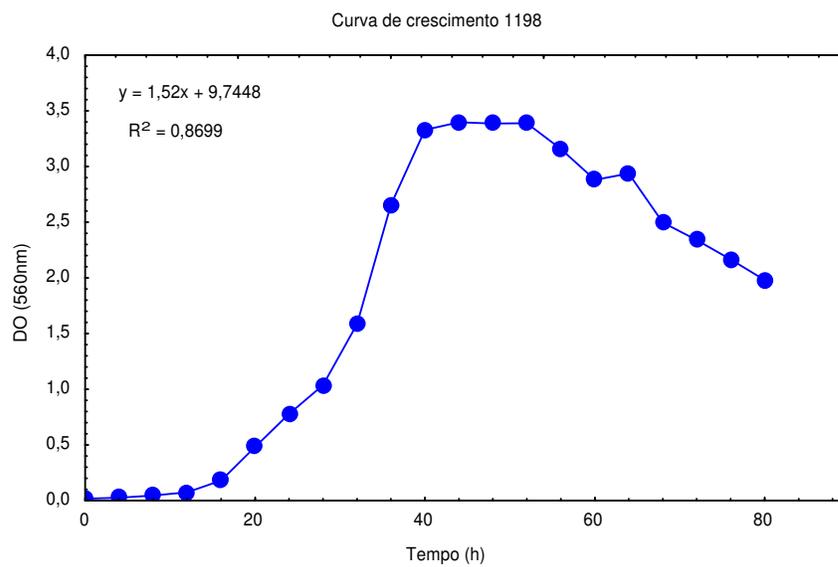


Figura 13 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae* (04 - 1198).

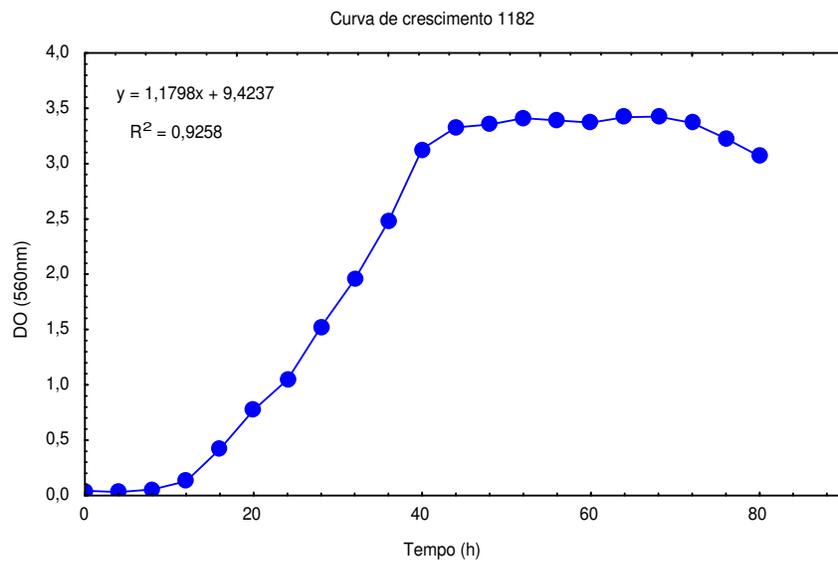


Figura 14 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (05 - 1182).

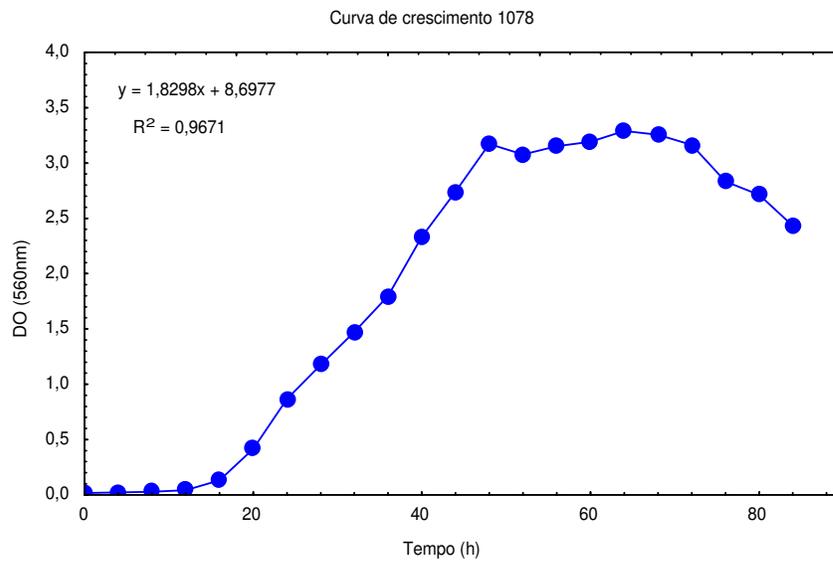


Figura 15 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (06 - 1078).

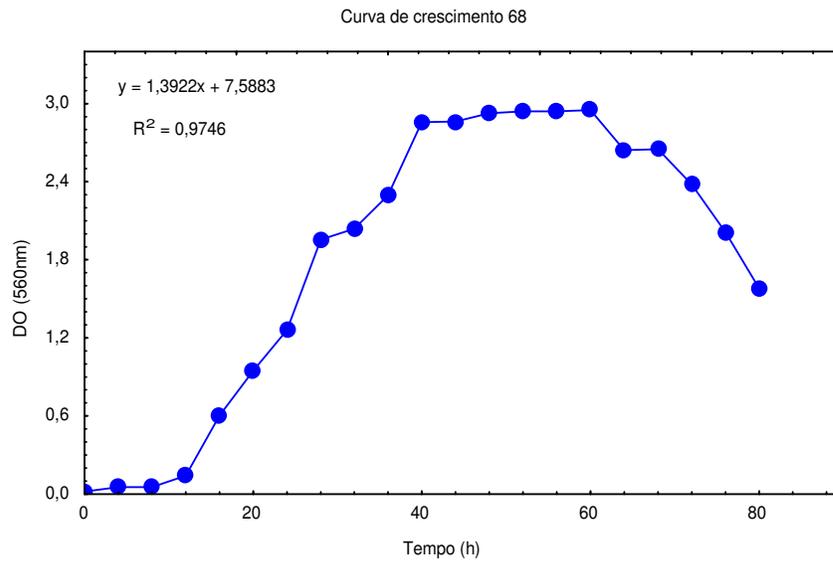


Figura 16 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas melonis* (07 - 68).

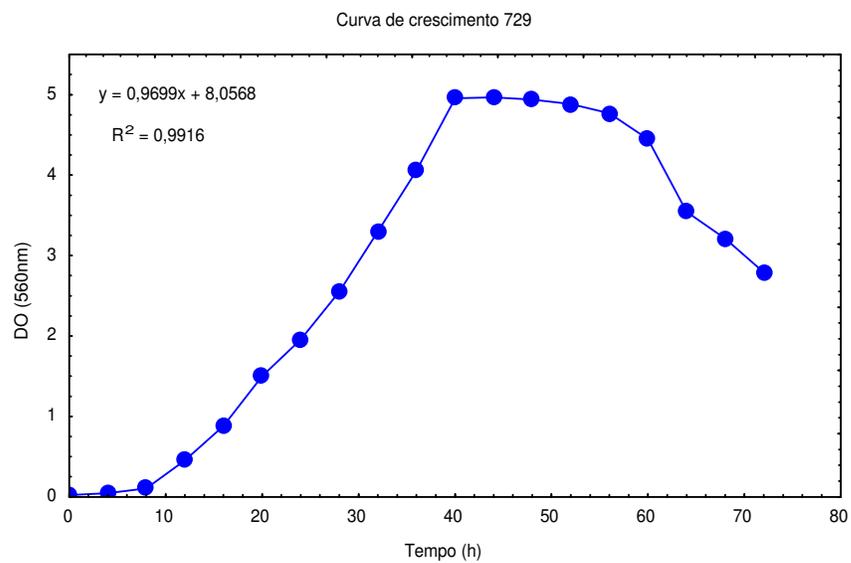


Figura 17 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (08 - 729).

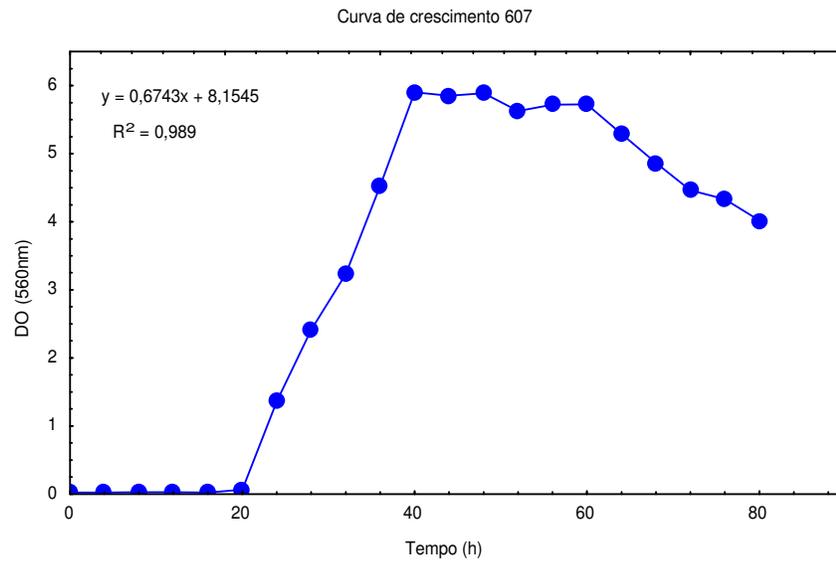


Figura 18 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (09 - 607).

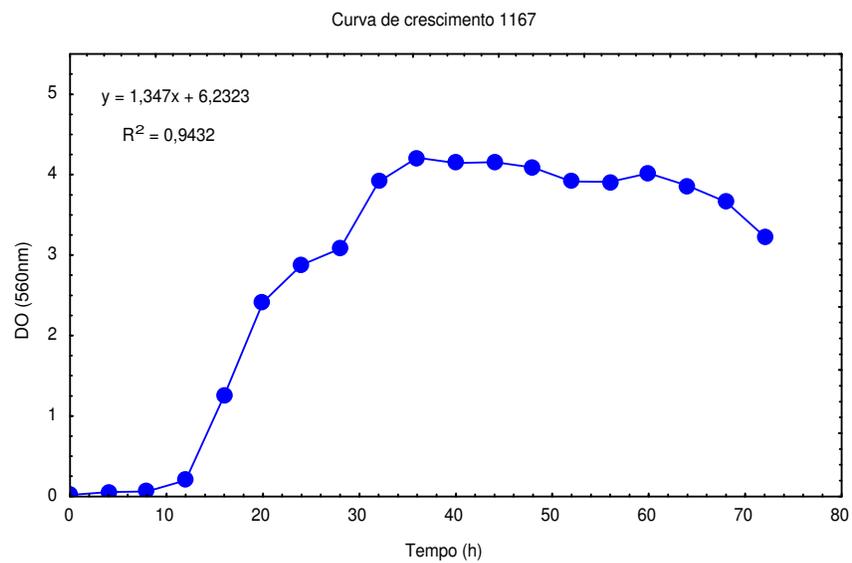


Figura 19 - Curva de crescimento microbiano da *Xanthomonas* sp (10 - 1167).

As equações obtidas e o conhecimento da absorvância utilizada para as leituras (560 nm), permitem estabelecer os valores médios de concentração celular (UFC/mL), dentro da fase log que ocorreu entre 16 e 40 horas do crescimento celular das linhagens estudadas de *Xanthomonas* sp.

Com base nos resultados obtidos na curva de crescimento pode-se proceder aos estudos referentes à produção de goma xantana, visto que se obteve uma padronização do inóculo a ser utilizado no processo fermentativo.

4.4 Produção da goma xantana

Na presente etapa foi realizado *screening* de dez linhagens do gênero *Xanthomonas* sp em estudo, para verificar a produção de goma xantana com o intuito de correlacionar e selecionar as duas melhores linhagens em relação à produtividade e viscosidade aparente.

Os experimentos foram realizados utilizando-se meio YM líquido para o inóculo e meio para a produção de biopolímero, conforme descrito no item 3.2.6. As fermentações foram conduzidas em agitador orbital a temperatura de 28°C, com agitação de 120rpm, por um tempo de 40 horas para produção do inóculo e, para a produção da goma, agitação de 180rpm, durante 96 horas. Foram avaliadas nos experimentos a produtividade de goma xantana e a concentração de massa celular durante 96 horas de fermentação.

A Tabela 5 apresenta a produtividade média de três fermentações realizadas em triplicada, e a média da concentração celular das mesmas. Nesta tabela observa-se que o microrganismo 6 (1078) apresentou a maior produtividade, entretanto os microrganismos 2 (1230), 3 (254), 5 (1182), 6 (1078) e 8 (729) apresentaram produtividades maiores que os demais estudados e, pelo teste de Tukey, estes não possuem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação à produtividade. Quando analisado o comportamento entre a produtividade e a massa celular, pode-se observar que estatisticamente estes resultados não apresentam correlação entre massa celular e produtividade para as linhagens de *Xanthomonas* sp avaliadas neste estudo.

Tabela 5 - Concentração celular e produtividade de goma xantana sintetizada em meio de produção com dez linhagens de *Xanthomonas* sp.

Microrganismo	*Média da produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	*Média da produção (g.L ⁻¹)	*Média da Massa Celular (b.s., g.L ⁻¹)
1 (1537)	0,075 ± 0,003	7,20	1.3867 ± 0,2490
2 (1230)	0,092 ± 0,002	8,83	2.4700 ± 0,2151
3 (254)	0,098 ± 0,004	9,41	0.9100 ± 0,0006
4 (1198)	0,064 ± 0,004	6,14	2.7400 ± 0,1868
5 (1182)	0,083 ± 0,009	7,97	1.3267 ± 0,1747
6 (1078)	0,100 ± 0,009	9,60	1.7600 ± 0,2022
7 (68)	0,073 ± 0,009	7,01	1.6733 ± 0,1002
8 (729)	0,085 ± 0,006	8,16	1.3533 ± 0,0961
9 (607)	0,078 ± 0,007	7,49	1.9333 ± 0,1159
10 (1167)	0,061 ± 0,002	5,86	0.9467 ± 0,1940

*Média do experimento em triplicata.

Com base nos resultados obtidos nesta etapa, pode-se afirmar que os melhores microrganismos para a produção da goma são o 2 (1230), 3 (254), 5 (1182), 6 (1078) e 8 (729), em termos de produtividade. Porém, é necessário avaliar a viscosidade aparente das soluções aquosas da goma obtida a partir dos dez microrganismos, para verificar se as cinco linhagens que apresentaram maior produtividade, também geraram as gomas de melhor qualidade.

Entretanto, sabe-se que a produtividade é influenciada pela linhagem do microrganismo, tempo e meio de fermentação (TORRES *et al.*, 1993; SOUZA & VENDRUSCOLO, 2000; ANTUNES *et al.*, 2000). Neste estudo, as fermentações foram realizadas com o meio de produção elaborado a partir do meio MPI+II (CADMUS *et al.*, 1978), que é um meio amplamente utilizado na literatura, não sendo estudados outros meios alternativos, que poderiam até mesmo incrementar a produtividade das linhagens testadas. Neste caso, a fonte de carbono utilizada como substrato é a sacarose que é bastante utilizada em experimentos de fermentação, no entanto vêm sendo realizados inúmeros estudos com outras fontes de carbono como alternativa. Até o momento, nenhum meio alternativo substituiu a utilização de sacarose com efeito significativo na qualidade e produtividade da goma xantana (PADILHA, 2003).

O tempo de fermentação, que também é outro fator limitante, neste estudo foi fixado em 96 horas, pois em estudos prévios foi observado que este tempo é o melhor a ser adotado para produção de goma xantana.

Estudos realizados por PADILHA (2003) demonstraram a possibilidade de uma produção superior de goma xantana por outras linhagens de *Xanthomonas*, dentre as quais a linhagem *X. axonopodis* pv. *manihotis* 289. Neste estudo foram utilizadas duas linhagens, a *X. campestris* pv *campestris* CA110, que corresponde à linhagem NRRL B-1459, utilizada inicialmente para estabelecer protocolos de produção de goma xantana e comumente estudada por diferentes autores para experimentos com modificação de meios de produção e caracterização da goma; e a *X. axonopodis* pv. *manihotis* 289.

PADILHA (2003) também verificou que os resultados de fermentação obtidos para as duas linhagens utilizadas demonstraram a influência do tempo de incubação na produção do biopolímero, onde a linhagem *X. a.* pv. *manihotis* 289 apresentou maior concentração em ambas as condições testadas, 72 e 96 horas, 6,9 g.L⁻¹ e 7,9 g.L⁻¹, respectivamente, em relação à linhagem de *X. c.* pv. *campestris* CA110 que produziu 6,3 g.L⁻¹ e 6,8 g.L⁻¹, respectivamente. Com estes resultados verifica-se um aumento na produção de aproximadamente 16%, quando comparada a linhagem CA110 em 96 horas de fermentação. Este resultado salienta a importância da pesquisa com novas linhagens, principalmente as de ocorrência no país onde se encontram linhagens com produtividade superior a CA110 que é atualmente utilizada na produção comercial de goma xantana. No item 4.5 de cinética do processo fermentativo serão abordados outros tópicos relacionados ao processo de produção de goma xantana.

Após a fermentação, os biopolímeros foram recuperados e avaliados visualmente, para verificar as diferenças quanto à coloração e estrutura após a precipitação com etanol. As Figuras 20 a 24 apresentam o aspecto dos biopolímeros precipitados, a partir da produção pelas diferentes linhagens de *Xanthomonas* estudadas.

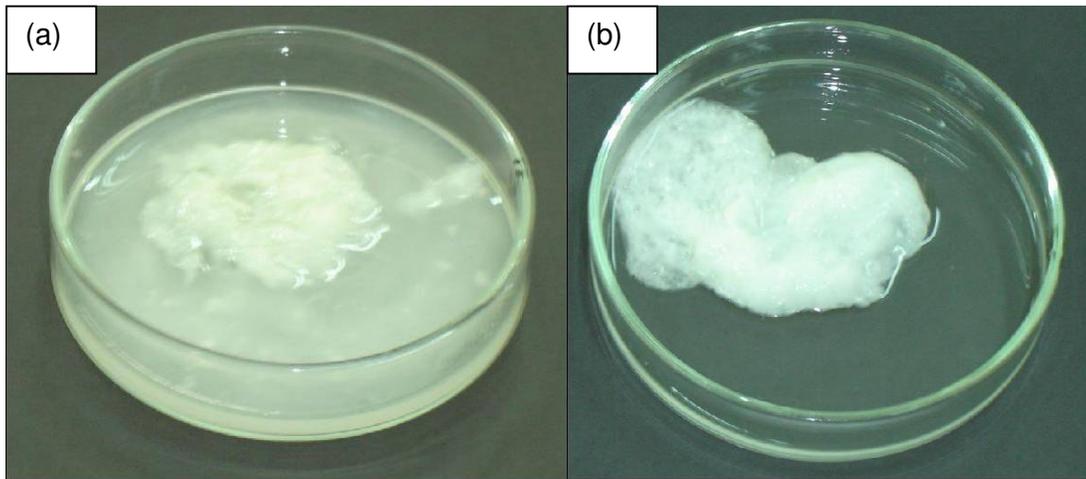


Figura 20 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da *Xanthomonas campestris* (01 - 1537) (a) e da *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (02 - 1230) (b).

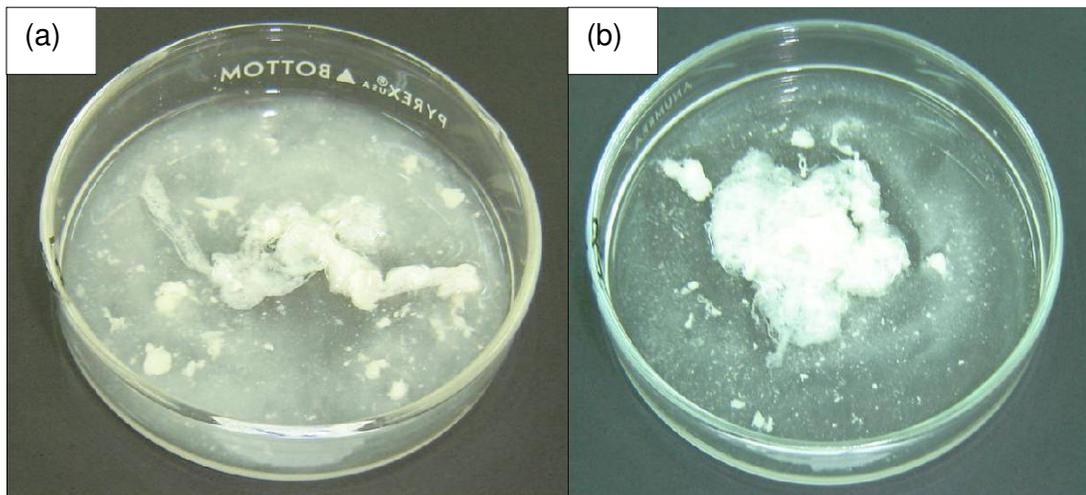


Figura 21 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (03 - 254) (a) e da *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae* (04 - 1198) (b).

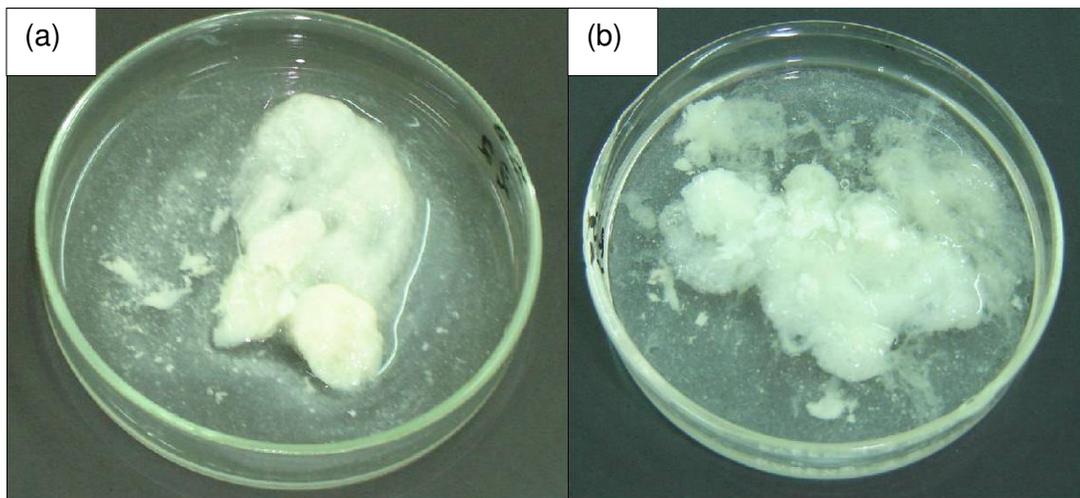


Figura 22 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (05 - 1182) (a) e da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (06 - 1078) (b).

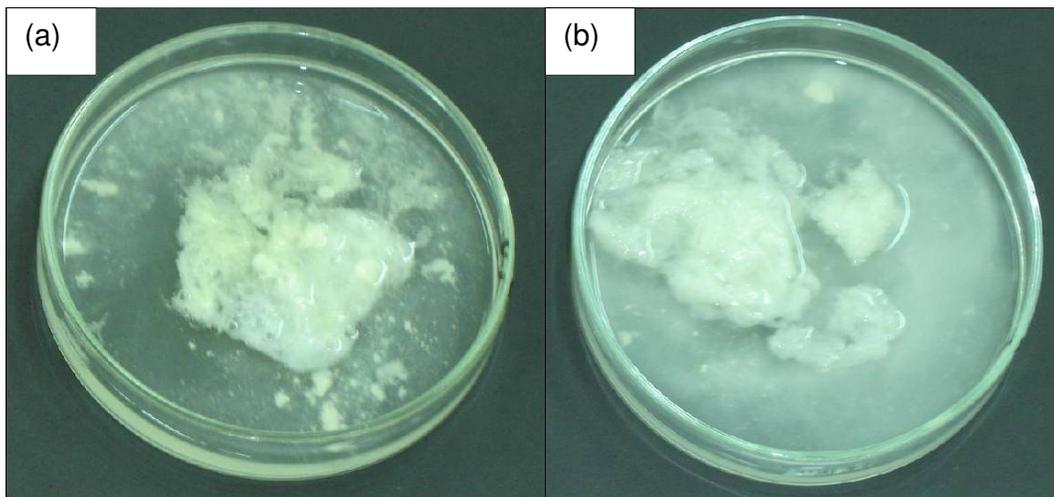


Figura 23 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da *Xanthomonas melonis* (07 - 68) (a) e da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (08 - 729) (b).

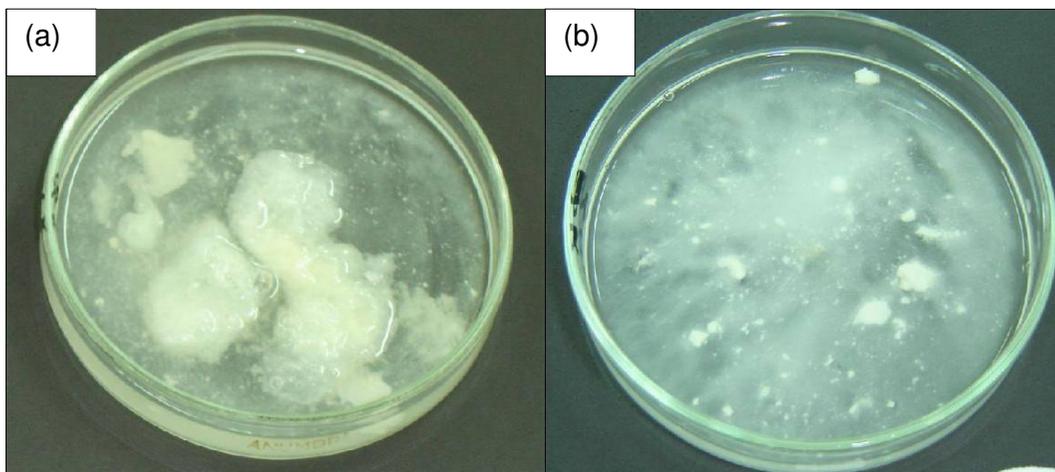


Figura 24 - Aspecto do biopolímero precipitado, sintetizado a partir da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (09 -607) (a) e da *Xanthomonas* sp (10 - 1167) (b).

Nas figuras acima pode-se observar diferenças quanto ao aspecto da goma precipitada. Observa-se que os polímeros sintetizados pelas linhagens 01, 02, 05, 06, 08, 09 apresentaram uma característica mais filamentosa, enquanto as linhagens 03, 04, 07, 10 uma característica com maior quantidade de grumos.

Entretanto, esta característica pode ser devida ao arranjo entre as cadeias do polímero, sendo necessário estudos mais aprofundados nesta área, principalmente para correlacionar com a viscosidade destas gomas. Quanto à coloração, não foi detectada pigmentação na goma xantana obtida, mesmo quando as linhagens utilizadas possuíam coloração amarelada.

4.5 Cinética do processo fermentativo

O conhecimento da cinética do processo fermentativo é de extrema importância quando da transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial, além de possibilitar uma comparação quantitativa entre diferentes condições de cultivo, por intermédio de variáveis, obtidas também a partir das curvas de ajuste $X=X(t)$, $P=P(t)$ e $S=S(t)$ (HISS, 2001).

Para verificar a cinética do consumo de substrato, da produção de biomassa e da produção de polímero para as diferentes linhagens estudadas, foram conduzidas fermentações a temperatura de 28°C, agitação de 180rpm, durante 96 horas, retirando-se amostras a partir do tempo 0 hora e a cada 24 horas.

As Figuras 25 a 34 apresentam os resultados obtidos, onde foram plotados gráficos para evidenciar a cinética dos processos fermentativos utilizando as diversas linhagens estudadas para a produção de goma xantana.

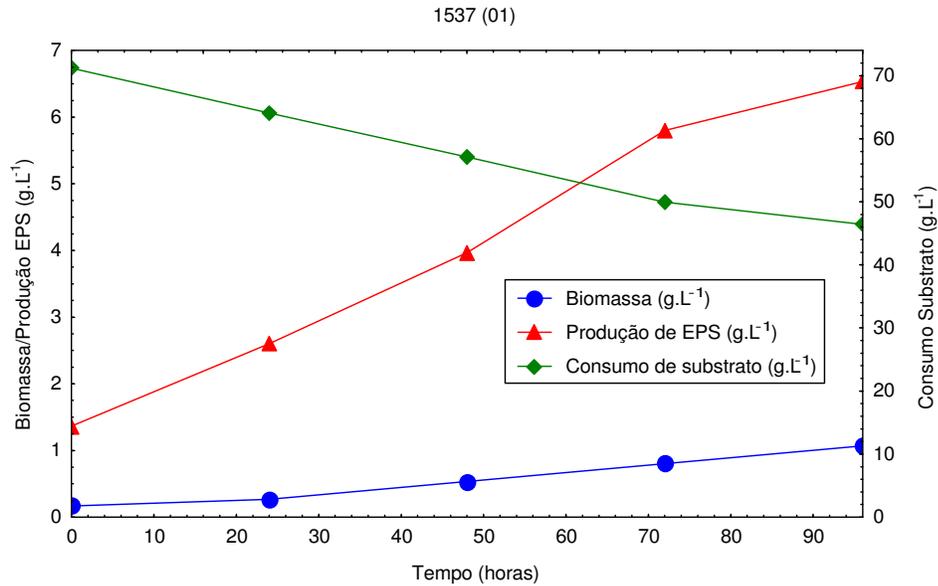


Figura 25 – Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas campestris* (01 - 1537).

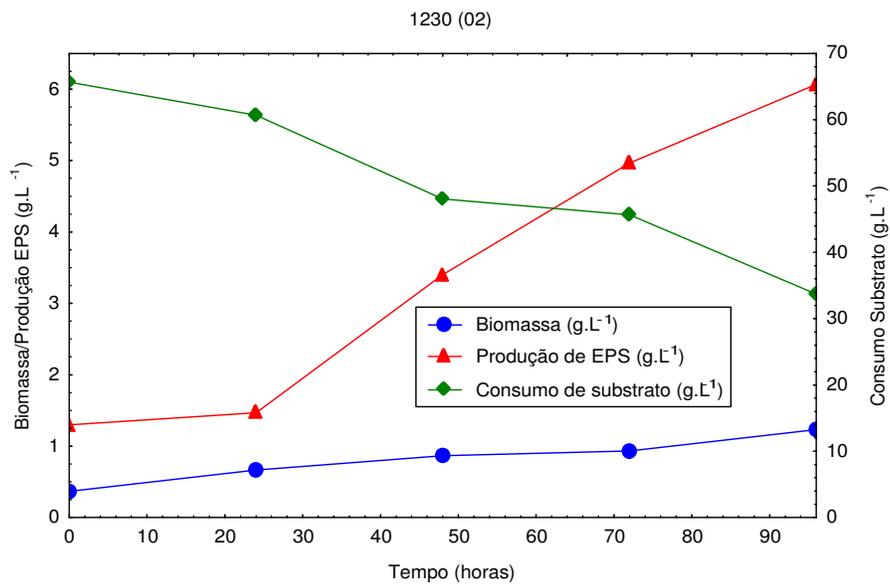


Figura 26 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (02 - 1230).

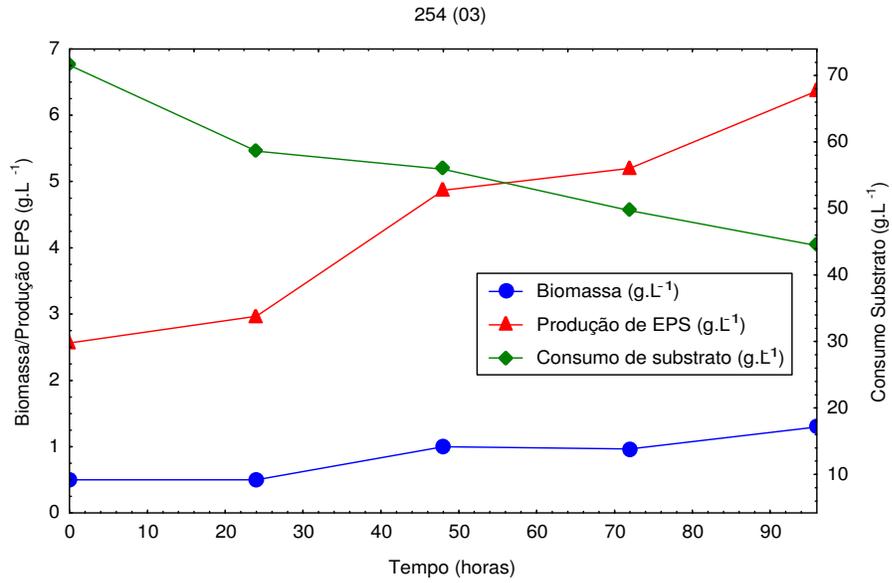


Figura 27 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas campestris pv. campestris* (03 - 254).

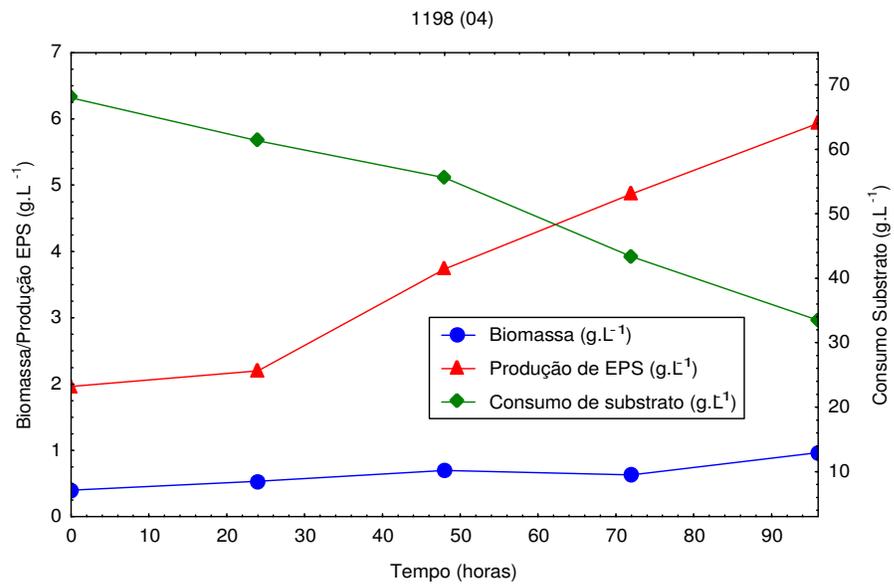


Figura 28 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas campestris pv. arracaciae* (04 - 1198).

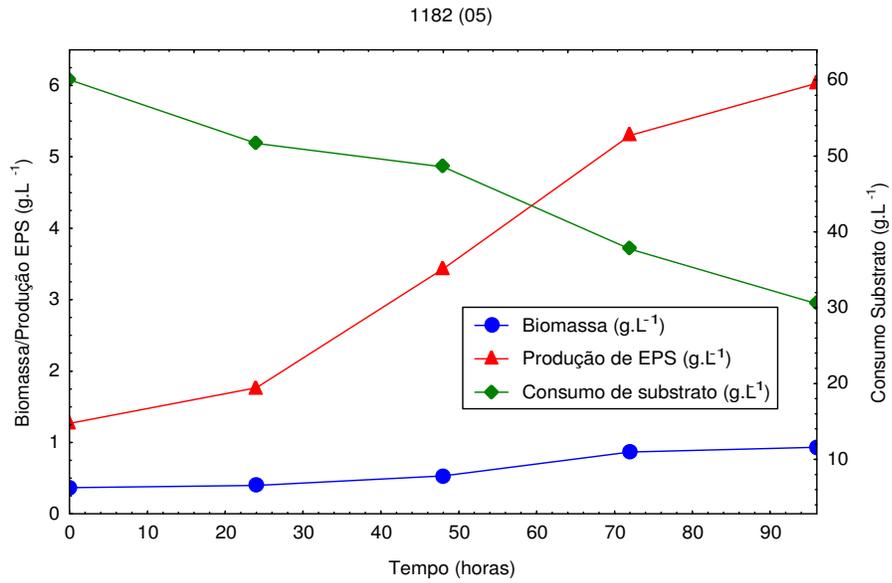


Figura 29 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (05 - 1182).

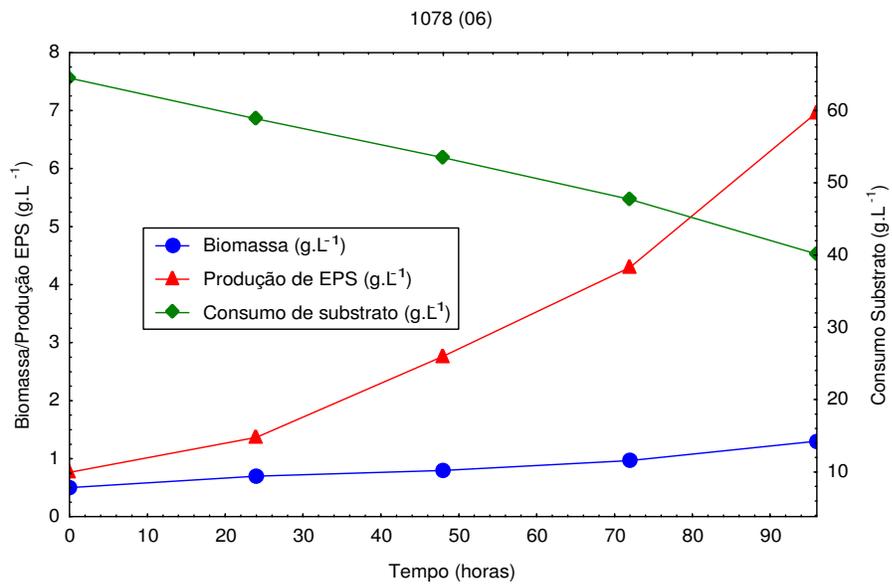


Figura 30 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (06 - 1078).

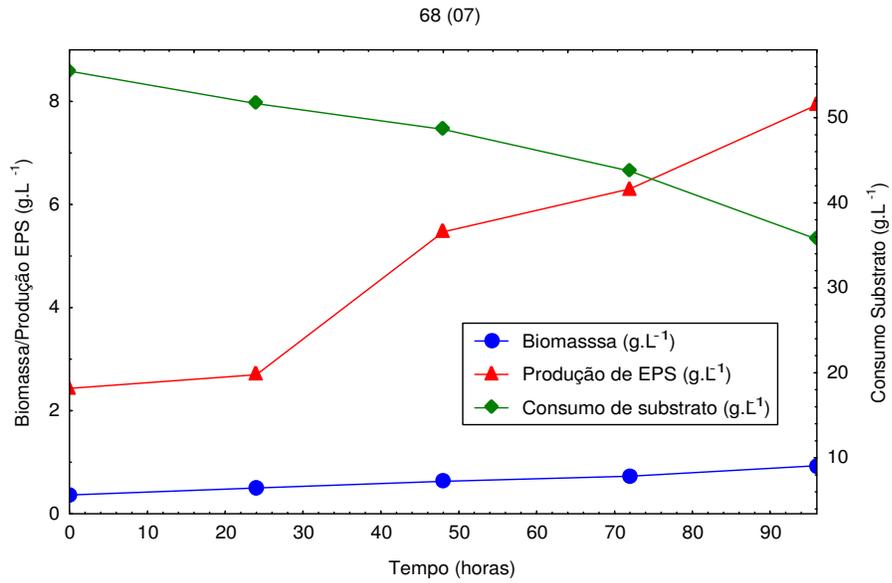


Figura 31 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas melonis* (07 -68).

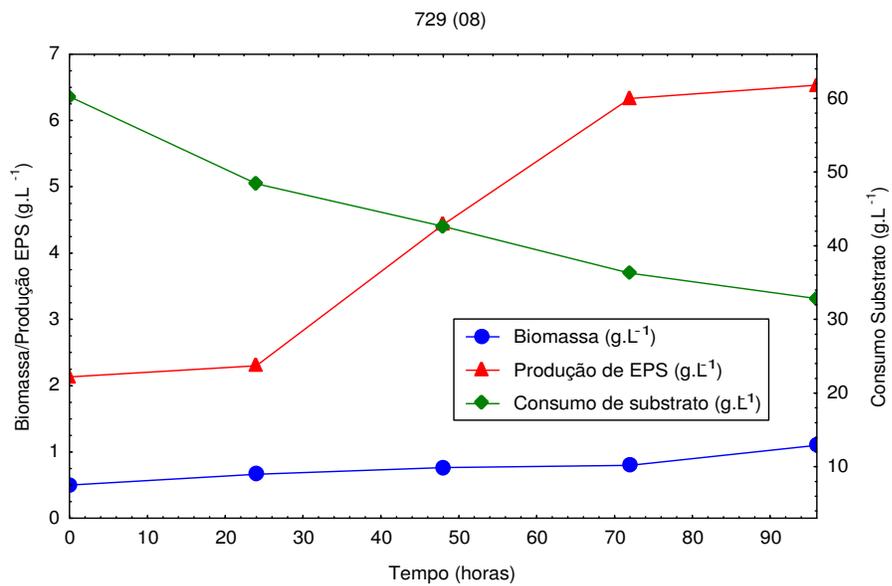


Figura 32 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas campestris pv. campestris* (08 - 729).

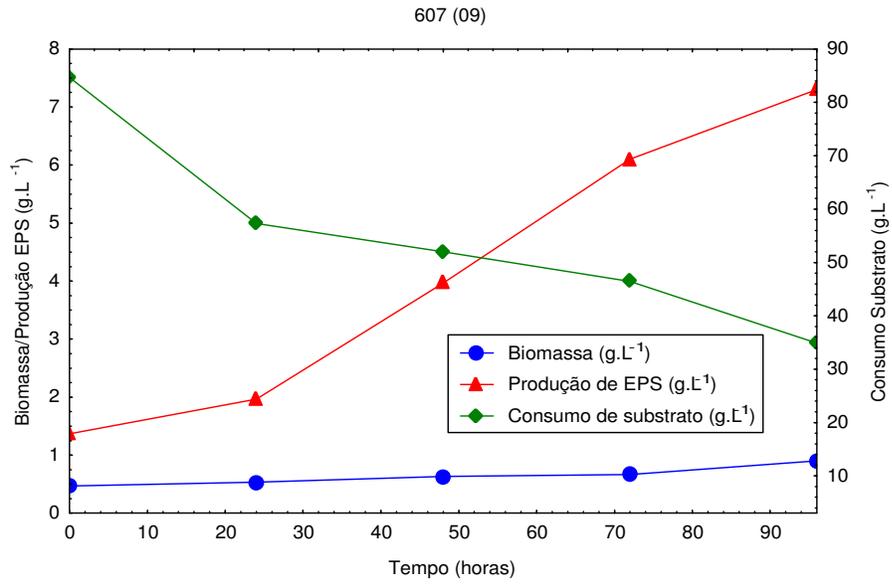


Figura 33 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas campestris pv. campestris* (09 -607).

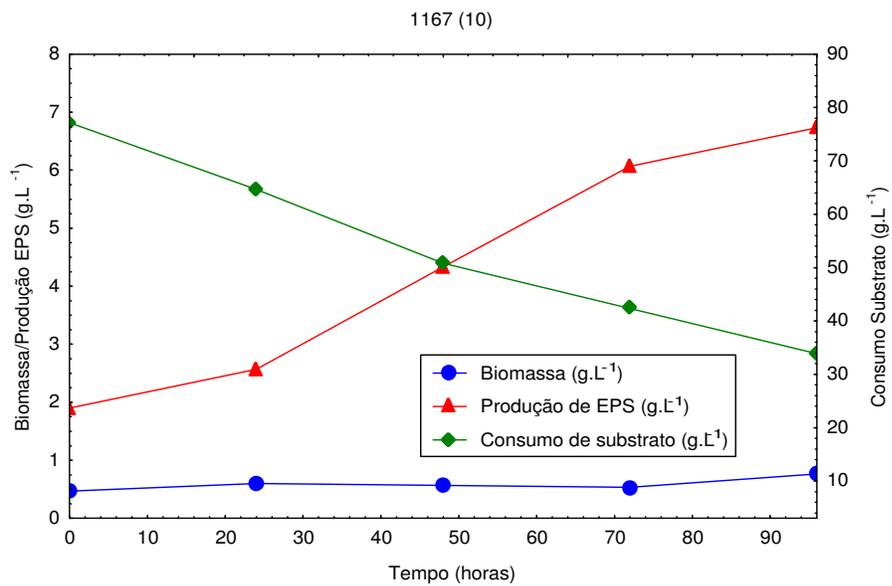


Figura 34 - Gráfico da cinética do processo fermentativo a partir da *Xanthomonas sp* (10 - 1167).

Para avaliar os processos fermentativos das diferentes linhagens, a partir dos dados levantados na cinética de fermentação, foram calculados os parâmetros cinéticos: velocidade volumétrica de consumo de substrato (r_s), velocidade volumétrica de formação de biomassa (r_x), velocidade volumétrica de formação de produto (r_p), eficiência de conversão substrato – biomassa ($Y_{X/S}$) e eficiência de conversão substrato – produto ($Y_{P/S}$). Estes valores podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos das fermentações para um tempo final de 96 horas.

Parâmetro/ linhagem	1537 01	1230 02	254 03	1198 04	1182 05	1078 06	68 07	729 08	607 09	1167 10
ART inicial (g.L ⁻¹)	71,21	65,64	71,54	67,97	60,06	64,45	55,49	60,23	84,66	77,17
ART final (g.L ⁻¹)	46,41	33,72	44,44	33,48	30,50	40,14	35,71	32,84	34,86	33,86
Subst cons (g.L ⁻¹)	24,80	31,92	27,10	34,49	29,56	24,31	18,78	27,39	49,80	43,31
r_s (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,26	0,33	0,28	0,36	0,31	0,25	0,20	0,28	0,52	0,45
Biomassa (g.L ⁻¹)	1,067	1,233	1,3	0,967	0,933	1,3	0,933	1,1	0,9	0,767
r_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,009	0,009	0,008	0,006	0,006	0,008	0,006	0,006	0,004	0,003
$Y_{X/S}$	0,04	0,04	0,05	0,03	0,03	0,05	0,05	0,04	0,02	0,02
Goma (g.L ⁻¹)	6,533	6,067	6,367	5,933	6,033	6,967	7,933	6,533	7,3	6,733
r_p (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,054	0,050	0,040	0,041	0,050	0,095	0,057	0,046	0,062	0,050
$Y_{P/S}$	0,263	0,190	0,235	0,172	0,204	0,287	0,422	0,238	0,147	0,155
ConversãoS/P(%)	26,34	19,00	23,49	17,20	20,41	28,66	42,24	23,85	14,66	15,55

Onde: ART= açúcar redutor (g.L⁻¹)

r_s = velocidade volumétrica de consumo de substrato (g.L⁻¹.h⁻¹)

r_p = velocidade volumétrica de formação de produto (g.L⁻¹.h⁻¹)

r_x = velocidade volumétrica de formação de biomassa (g.L⁻¹.h⁻¹)

$Y_{X/S}$ = eficiência de conversão substrato - biomassa

$Y_{P/S}$ = eficiência de conversão substrato - produto

Conversão S/P = % conversão substrato – produto

Analisando os resultados apresentados na Tabela 6, verifica-se a dificuldade do microrganismo em utilizar as fontes de carbono disponíveis, uma vez que o percentual de açúcar redutor final em relação ao inicial foi elevado para todas as fermentações, sendo em média de 59%.

Os valores de açúcares redutores no final da fermentação mostram em que condições ocorrem os processos fermentativos. Assim, açúcar redutor final alto indica que a fermentação ocorre em condições difíceis e instáveis, onde o microrganismo não consegue utilizar toda a fonte de carbono disponível (WOICIECHOWSKI, 2001).

A análise dos fatores de conversão mostra que quanto menor for a eficiência de conversão substrato – biomassa ($Y_{X/S}$), melhor para o processo, pois $Y_{X/S}$ baixos indicam que mais substrato está disponível para ser convertido em produto (WOICIECHOWSKI, 2001).

O fator médio de conversão substrato – biomassa ($Y_{X/S}$) foi de 0,04, considerado baixo se associado a valores experimentais obtidos por outros autores, 0,33 (SERRANO-CARREON *et al.*, 1998), 0,81 (PINCHES & PALLENT, 1986), 0,5 (WEISS & OLLIS, 1980) e 0,07 (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 1990).

Na Tabela 6 pode-se observar que a linhagem 607 teve o maior consumo de substrato (59%), entretanto não apresentou a maior conversão deste em produto, tendo-se uma conversão de 14,66% e uma concentração de goma de 7,3 g.L⁻¹. As demais fermentações apresentaram consumo de substrato entre 35 a 56%, sendo a conversão deste em produto de 15,55 a 42,24%. Quanto à eficiência de conversão de substrato em produto nas fermentações com as diferentes linhagens, os valores variaram de 0,147 a 0,422.

Avaliando-se a cinética de fermentação de diferentes biopolímeros, observou-se comportamentos variados e fatores diversos que afetam sua produção. Os resultados da literatura para as cinéticas de diferentes biopolímeros foram comparados com os obtidos neste estudo.

ASHTAPUTRE e SHAH (1995b), estudando a produção de um EPS a partir de *Sphingomonas paucimobilis* GS1, observaram que quase 75% do produto formou-se durante a fase de crescimento exponencial, sendo o restante acumulado

durante a fase estacionária, mostrando que a produção de biopolímero está relacionada ao crescimento.

CASAS *et al.* (2000) observaram que para a goma xantana há comportamento parcialmente associado, sendo que a concentração de xantana diminui quando o crescimento e a concentração de biomassa diminuem. Também foi observado que o crescimento de biomassa e a produção de goma aumentam com a temperatura, atingindo um rendimento máximo à 28°C, bem como a concentração de nitrogênio influencia o crescimento de biomassa com algum efeito sobre a produção de xantana.

Neste estudo, a eficiência de conversão substrato – produto obtida para as fermentações das diversas linhagens foi em média de 23%, enquanto KANG *et al.* (1982) obtiveram uma conversão de aproximadamente 50% na produção de gelana utilizando meio convencional. Esses valores indicam que, possivelmente exista deficiência de fonte de nitrogênio no meio, tornando a relação C:N inadequada, dificultando assim, a conversão de substrato em produto.

NITSCHKE *et al.* (2001) obtiveram um rendimento geral do processo de 55%, quando trabalharam com soro de leite na produção de xantana, enquanto WOICIECHOWSKI (2001) obteve uma conversão de substrato em produto da ordem de 75%, na produção de xantana, usando nitrato de potássio como fonte de nitrogênio e hidrolisado de bagaço de mandioca como fonte de carbono. BAE E SHODA (2004) obtiveram um incremento de 76% quando produziram celulose bacteriana a partir de melão pré-tratado e CHI E ZHAO (2003) conseguiram o maior rendimento de pululana (5,9%) produzida por levedura, utilizando o meio hidrolisado de torta de soja.

4.6 Reologia da goma xantana

As propriedades reológicas das soluções aquosas influenciam diretamente nos parâmetros de projetos de equipamentos, processamento e aplicação das gomas. Devido a estes parâmetros, foram realizados estudos quanto à viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% do biopolímero sintetizado pelas linhagens de

Xanthomonas sp estudadas. Os resultados obtidos permitiram avaliar a qualidade da goma sintetizada.

Os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 35 e 36, onde evidenciam um comportamento pseudoplástico nas soluções analisadas, isto é, a viscosidade aparente decresce com o aumento da taxa de cisalhamento. Esse comportamento é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (CACIK *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 2003; PADILHA, 2003). Nestes sistemas de fluidos não-newtonianos existem modelos que prevêm e ajustam os dados produzidos experimentalmente, entre eles temos como predizer o efeito da taxa de cisalhamento sobre a viscosidade aparente aplicando o modelo de *power-law*:

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1}$$

onde K é o índice de consistência e o η é o índice de comportamento (XUEWU *et al.*, 1996; KIOSSEOGLU *et al.*, 2003).

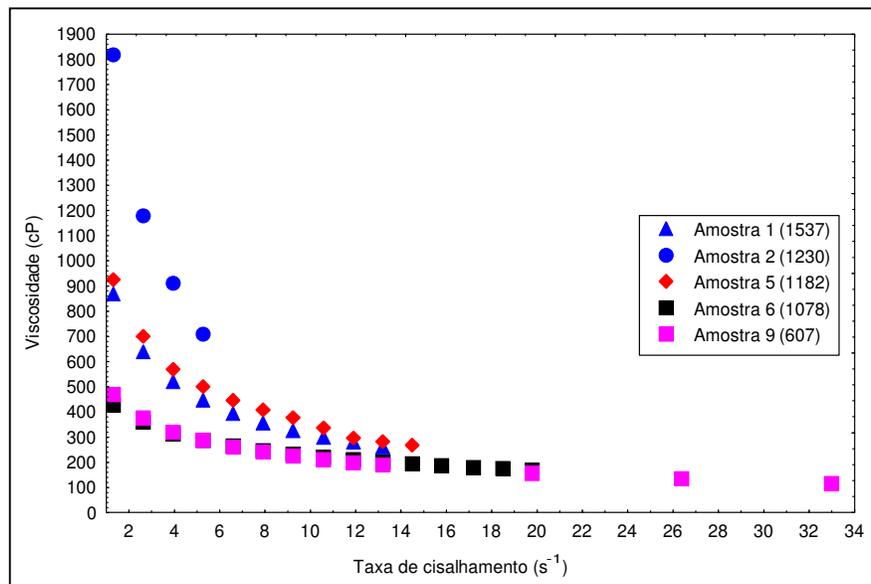


Figura 35 - Viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas pelas linhagens de *Xanthomonas campestris* (01 - 1537), *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (02 - 1230), *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (05 - 1182), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (06 - 1078), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (09 - 607), em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, *spindle* 18 a 25°C.

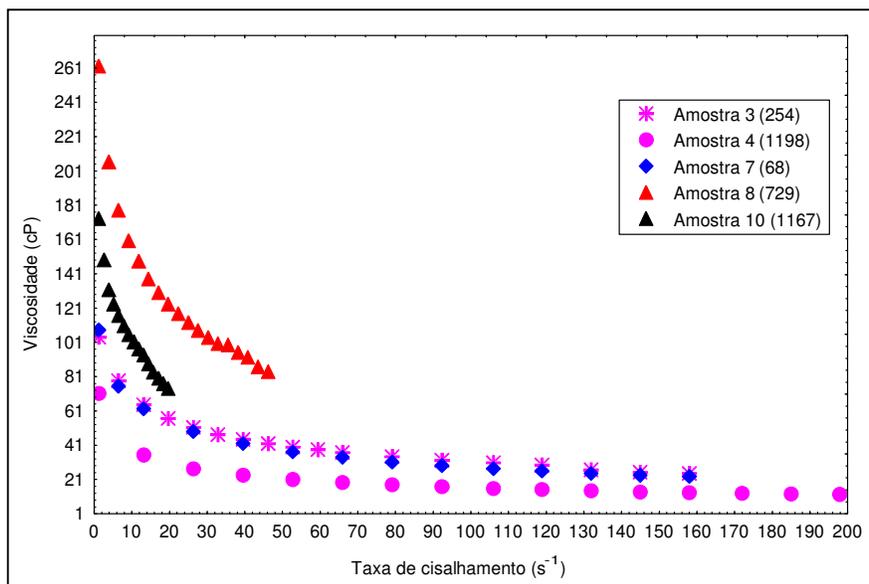


Figura 36 - Viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas pelas linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (03 - 254), *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae* (04 - 1198), *Xanthomonas melonis* (07 -68), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (08 - 729), *Xanthomonas* sp (10 - 1167), em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, *spindle* 18 a 25°C.

Através do gráfico comparativo entre as leituras de viscosidade aparente das soluções aquosas das diversas gomas produzidas, pode-se visualizar que as amostras 02 (1230) e 05 (1182) apresentaram os valores de viscosidade mais elevados (Figuras 35 e 36).

A fim de comprovar estatisticamente os comportamentos apresentados pelas soluções aquosas das diferentes gomas produzidas, foi realizado o Teste de Tukey, comparando as leituras das amostras na taxa de cisalhamento $1,32\text{s}^{-1}$, sendo esta a única possível de se realizar em todas as leituras, já que as gomas apresentaram valores de viscosidade aparente muito diferentes entre si. A Tabela 7 mostra os resultados desse teste.

Tabela 7 – Viscosidade aparente das soluções aquosas das diversas gomas xantana, representando a média de três leituras de cada solução analisada, realizadas em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, *spindle* 18 a 25°C.

Linagem estudada	Viscosidade aparente (cP)	Taxa de Cisalhamento (s ⁻¹)
1 (1537)	868	1,32
2 (1230)	1818	1,32
3 (254)	104	1,32
4 (1198)	71	1,32
5 (1182)	925	1,32
6 (1078)	426	1,32
7 (68)	108	1,32
8 (729)	262	1,32
9 (607)	468	1,32
10 (1167)	173	1,32

Analisando individualmente as leituras de viscosidade aparente das diversas soluções aquosas a 3%, das gomas sintetizadas pelos dez microrganismos estudados, realizadas com o *spindle* 18 e taxa de cisalhamento 1,32s⁻¹, observa-se que a solução aquosa da goma proveniente do microrganismo 2 (1230) apresentou a melhor viscosidade, sendo inclusive estatisticamente diferente dos demais pelo teste de Tukey. As soluções aquosas das gomas provenientes dos microrganismos 5 (1182) e 1 (1537) apresentaram altas viscosidades também, sendo estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey.

Sabe-se que a leitura realizada na taxa de cisalhamento analisada no estudo não é apropriada, pois se encontra na faixa que mede a tensão residual do fluido. A tensão residual também pode ser um indicativo de qualidade reológica do biopolímero.

Segundo SHRUZ (1992) citado por NAVARRO (2002), a existência de tensão residual tem sido objeto de controvérsia na publicação de trabalhos mostrando que esse valor desaparece em taxas de deformação próximas a zero. A existência de tensão residual é desejável em algumas situações, em outras não. Por isso torna-se importante avaliar sua existência e intensidade. As medidas em baixas taxas de

cisalhamento são de extrema importância, para verificar a possibilidade de aplicação em alguns sistemas onde esta se faz necessário.

Como as leituras de viscosidade aparente das soluções aquosas das gomas sintetizadas pelos microrganismos 02 (1230) e 05 (1182), não foram possíveis de serem realizadas em pelo menos dez taxas de cisalhamento diferentes com o *spindle* 18, fez-se as leituras destas também com o *spindle* 31, já que este é mais indicado para soluções com leituras de viscosidade aparente mais elevadas (Figura 37).

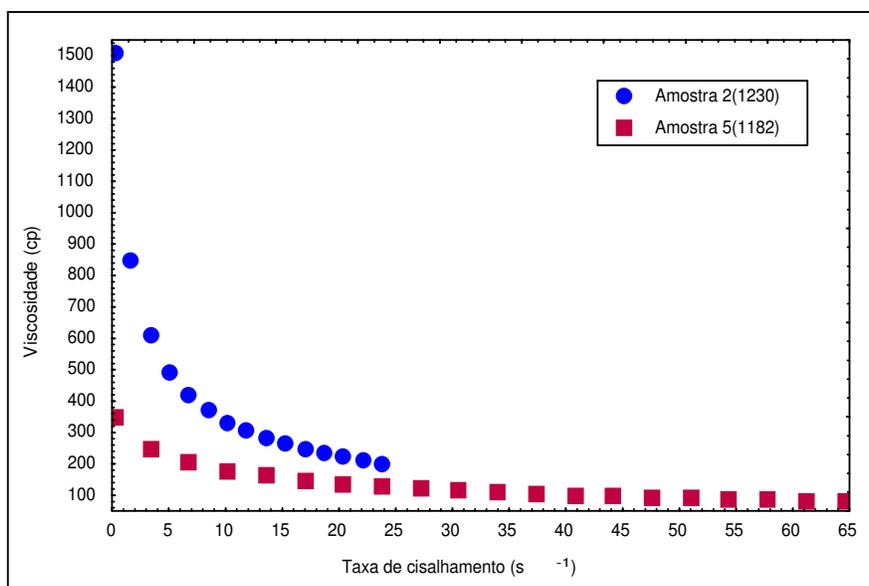


Figura 37 - Viscosidade aparente de soluções aquosas a 3% das gomas sintetizadas a partir da *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (02 - 1230) e da *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (05 - 1182), em viscosímetro Brookfield, modelo LVDV III+, *spindle* 31 a 25°C.

Comparando-se a viscosidade aparente de soluções aquosas de gomas obtida com outros trabalhos, é possível verificar valores inferiores de viscosidade para as soluções aquosas de goma xantana sintetizadas pelas linhagens *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (3 - 254), 104 cP; *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae* (4 - 1198), 71 cP; *Xanthomonas melonis* (7 - 68), 108 cP; *Xanthomonas* sp (10 - 1167), 173 cP. Visto que a concentração de biopolímero em solução

aquosa utilizada foi superior (3% - p/v) à utilizada em outros trabalhos, na taxa de cisalhamento, para efeito comparativo, de $1,32\text{s}^{-1}$. Por exemplo, para uma taxa de cisalhamento de aproximadamente 10 s^{-1} , NAVARRETE e SHAH (2001) obtiveram uma viscosidade aparente de aproximadamente 100 cP, para soluções $1,4 \times 10^{-4}\%$ de diutana, a 24°C e ASHTAPUTRE e SHAH (1995b) obtiveram uma viscosidade aparente de aproximadamente 200 cP, para soluções 0,5% de biopolímero, a 30°C .

Giavasis *et al.* (2000) avaliaram soluções de goma gelana e observaram que esta exibe comportamento fortemente pseudoplástico em solução aquosa 0,1% (p/v). As soluções aquosas de todos os *sphingans* são muito viscosas, mostrando alta estabilidade térmica. A gelana em solução aquosa forma soluções altamente viscosas ou géis fracos que podem tornar-se rígidos e quebradiços em presença de vários cátions, quando esta é desacetilada com álcali (BAIRD *et al.*, 1983 apud BANIK *et al.*, 2000; SUTHERLAND, 2002).

Welana, ramsana e diutana (S-657) não são gelificantes, mas suas soluções aquosas exibem alta viscosidade para baixas taxas de cisalhamento e boa termoestabilidade (CAMPANA *et al.*, 1992 apud BANIK *et al.*, 2000). Este comportamento altamente pseudoplástico da diutana e a boa estabilidade térmica, melhor que a xantana, é comprovado através de estudos da utilização destas gomas na recuperação terciária do petróleo (NAVARRETE *et al.*, 2000; NAVARRETE & SHAH, 2001; NAVARRETE *et al.*, 2001).

Sabe-se, entretanto, que as propriedades reológicas dos polissacarídeos em solução não dependem apenas da concentração da solução aquosa analisada, mas também de suas características físico-químicas intrínsecas, isto é, peso molecular, polidispersividade e grau de substituição. No caso dos polissacarídeos microbianos essas propriedades físico-químicas, bem como a eficiência da produção está relacionada ao processo fermentativo, linhagem bacteriana, composição do meio, pH, temperatura e outros parâmetros ambientais da fermentação (BANIK *et al.*, 2000).

Os resultados, portanto, mostram que se devem investigar outros sistemas de dispersão, podendo ser adicionados íons às soluções, o que poderá incrementar os

valores de viscosidade, bem como a interação com outros sistemas poliméricos, podendo alterar as propriedades reológicas obtidas até o momento.

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

5.1 CONCLUSÕES

O resultados obtidos no estudo permitem concluir que:

- Das dez linhagens estudadas, os melhores microrganismos para a produção da goma xantana são a *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (2 - 1230), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (3 - 254), *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (5 - 1182), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (6 - 1078) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (8 - 729), em termos de produtividade.
- Existe uma alta variabilidade entre as linhagens de *Xanthomonas* sp estudadas, segundo a análise de RAPD.
- A análise de RAPD entre as linhagens não permitiu um total agrupamento das linhagens por patovar ou por espécie.
- Segundo a análise de RAPD, não houve mutações detectáveis destas bactérias durante a pesquisa (repique inicial e final das diferentes linhagens de *Xanthomonas* sp).
- Através das leituras de viscosidade aparente das soluções aquosas das diversas gomas produzidas, as que apresentaram os valores mais elevados de viscosidade foram a *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (2 - 1230) e a *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (5 - 1182).
- As duas linhagens com melhor produtividade e viscosidade aparente foram a *Xanthomonas campestris* pv. *magiferaeindicae* (02 - 1230) e a *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* (05 - 1182).

5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Inclusão de outros *primers* ou outra técnica na avaliação dos agrupamentos entre as diferentes linhagens de *Xanthomonas* estudadas, visando permitir um melhor agrupamento destas linhagens.

Utilização de meios alternativos para a produção da goma xantana sintetizada pelas duas linhagens de *Xanthomonas* selecionadas quanto à produtividade e à viscosidade aparente, como por exemplo, resíduos industriais provenientes da indústria de alimentos.

Estudo de outros parâmetros reológicos como temperatura, adição de íons, pH, sinergismo, para análise da viscosidade aparente e viscoelasticidade das soluções aquosas das gomas obtidas com as linhagens em estudo;

Caracterização cromatográfica das gomas obtidas e do peso molecular das mesmas.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Ciência e Engenharia**, v. 9, n. 1, p. 83-87, 2000

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 386. **Diário Oficial da União**. Brasília, 05 ago. 1999. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm. Acesso em : 28 mar. 2002.

ASHTAPUTRE, A.A.; SHAH, A.K. Studies on the exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*-GS1: Nutritional requirements and precursor-forming enzymes. **Current Microbiology**, 31, 234-238. 1995a

ASHTAPUTRE, A.A.; SHAH, A.K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. **Applied and Environmental Microbiology**, 61:3, 1159-1162. 1995b

ASHTAPUTRE, A.A.; SHAH, A.K. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 11, 219-222. 1995c

BAE, S. & SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, 20, 1366-1371, 2004

BAEZA, L. C.; GIANNINI, M. J. S. M. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA polimórfico (RAPD). **Revista Instituto Medicina Tropical de S.Paulo**, v. 46, n. 6, Nov./Dec. 2004

BANIK, R. M.; KANARI, B. & UPADHYAY, S. N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 16, 407-414, 2000

BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures. **Process Biochemistry**, 39, 1201-1209, 2004

- BOZA, Yolanda E. A. G. **Encapsulamento *Beijerinckia* sp utilizando spray-drier**. Departamento de Ciência de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2002
- BRADBURY, J. F. *Xanthomonas dowson*. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, v. 1, 1984
- BROOKFIELD ENGINEERING LABS., INC. More solutions to sticky problems – a guide to getting more from your Brookfield viscometer, 2004
- CACIK, F.; DONDO, R.G.; MARQUÉS, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computers and Chemical Engineering** 25, 2001. 409-418
- CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITSLEY, J. E; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology Bioengineering**, v. 20, p. 1003-1014, 1978
- CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCIA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, 26, 282-291, 2000
- CHI, Z. & ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, 33, 206-211, 2003
- CIVEROLO, E. L.; HATTINGH, M. J. *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: Cause of prunus bacterial spot. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**, London: Chapman & Hall, 1993
- CHRISTENSEN, B. E.; KJOSBAKKEN, J.; SIMIDSRØD, P. Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. Strain NCMB 2021. **Appl. Environm. And Microbiol.**, v. 50, n. 4, p. 837-845. 1985
- CONGREGADO, F.; ESTAÑOL, I.; ESPUNY, M. J.; FUSTÉ, M. C.; MANRESA, M. A.; MARQUES, A. M.; GUINÉA, J.; SIMON-PUJOL, M. D. Preliminary studies on the production and composition of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp. EPS-5028. **Biotechnol, Letters**, v. 7, n. 12, p. 883-888. 1985

- DEMAIN, Arnold L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, n. 18, p. 499-514, 2000
- DILTZ, S.; ZELLER, S.G. Location of O-acetyl groups in S-657 using the reductive cleavage method. **Carbohydrate Research**, 331, 265-270, 2001
- DRUZIAN, J.I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.)**, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2000. 179p
- DUSSAP, C. G.; DE VITA, D.; PONS, A. Modeling growth and succinoglucon production by *Agrobacterium radiobacter* NCIB 9042 in batch cultures. **Biotech. And Bioeng.**, v. 38, p. 65-74. 1991
- FERREIRA E. M.; GRATTAPAGLIA D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998, 220p
- FIALHO, A.M.; MARTINS, L.O.; DONVAL, M.L.; LEITÃO, J.H.; RIDOUT, M.J.; JAY, A.J.; MORRIS, V.J.; SÁ-CORREIA, I. Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. **Applied and Environmental Microbiology**, 65:6, 2485-2491. 1999
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, 18, 549-579, 2000
- GARCÍA-OCHOA, F.; GRACIA-LEON, M. A.; ROMERO, R. Kinetic modelling of xanthan production from sucrose. **Chem. Biochem. Eng.** 1990, 4, 15-20
- GIAVASIS, I.; ROBERTSON, I.; McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Simultaneous and rapid monitoring of biomass and biopolymer production by *Sphingomonas paucimobilis* using Fourier transform-near infrared spectroscopy. **Biotechnology Letters**, 25: 975-979, 2003
- GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. Gellan gum. **Critical Reviews Biotechnology**, 20:3, 177-211, 2000
- HASSLER, R. A.; DOHERTY, D.H.. **Biotechnology Progress** 6, 1990, 182-187

- HSU, C.-H.; LO, Y.M. Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. **Process Biochemistry**, 2003. 1-9
- HAYWARD, A. C. The hosts of *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. ***Xanthomonas***. London: Chapman & Hall, 1993
- HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**, v.2, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 2001
- IELPI, L.; COUSO, R.O.; DANKERT, M.A. **Journal of Bacteriology** 175 (1993) 2490-2500
- JEANNES, A. R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. *Polysaccharide of Xanthomonas campestris NRRL B - 1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. ARS-NC-51*. Washington, D. C., **Agriculture Research Service**, U. S. Departmente of Agriculture, 1976
- KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKO, T. & COTTRELL, I. W. Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, 43:5, 1086-1091, 1982
- KENNEDY, J. F.; JONES, P.; BARKER, S. A. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 4, n. 1, p. 39-43, 1982
- LETISSE, F.; LINDLEY, N. D. & ROUX, G. Development of modeling approach for prediction of growth and xanthan gum production using *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Progress**, 19, 822-827, 2003
- LETISSE, F.; CHEVALLEREAU, P.; SIMON, J.-L.; LINDLEY, N. D. Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 2001, 55, 417-422.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., V.3, 125-154p. 2001

LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. *Xanthomonas campestris* strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Elsevier Science Ltd. Wat. Res.** Vol 35, n. 7, pp. 1828-1830, Great Britain, 2001

MANRESA, A.; ESPUNY, M. J.; GIUNEA, J.; COMELLES, F. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas* sp GSP-910. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 26, p. 347-351. 1987

MARGARITIS, A.; PACE, G. W. Microbial polysaccharides. In : Moo-Young, M. **Comprehensive Biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 1005-1041

MARTINS, L. O.; SÁ-COOREIA, I. Temperatura profiles of gellan gum synthesis and activities of biosynthetic enzymes. **Biotechnology Applied Biochemistry**, 20, 385-395, 1993

MASAKUNI, T.; MASAHIRO, K. Rheological properties of welan gum in aqueous media. **Agric. Biol. Chem.**, V. 54, p. 3079-3084. 1990

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

MAURY, Adelaide; ROQUE, Jean. Lês Polysaccharides. **Biofutur**, p. 17-31, Sep. 1986

MILLER, G. L. DNS. **Analytical Chemistry**, 31:3, 426-428, 1959

MORADI-ARAGHI, A. A review of thermally stable gels for fluid division in petroleum production. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, 26, 1-10, 2000

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

MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23 (2): 300-305, 2003

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

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

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

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C. & PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, 38, 1513-1519, 2003

NAVARRETE, R.C.; SHAH, S.N.. **New Biopolymer for coiled tubing applications**. Society of Petroleum Engineers 68487, Richardson, TX, USA, 1-10, 2001

NAVARRETE, R.C.; SEHEULT, J.M.; COFFEY, M.D. **New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer, and coil-tubing fluid, Part II**. International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 64982, Houston, TX, 1-15, 2001

NAVARRETE, R. C.; SEHEULT, J. M.; COFFEY, M. D. New Biopolymer for drilling, drill-in, completions, spacer fluids and coiled tubing applications. **Asia Pacific Drilling Technology, Kuala Lumpur, Malaysia SPE 62790**, 1-17, 2000

NAVARRO, R. F. Aplicação de um modelo reológico não-linear em sistemas poliméricos dilatantes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. V.12, n. 1, p. 41-47, 2002

NAVARRO, F. N. **Fundamentos de Reologia de Polímeros**, EDUCS: Caxias do Sul, 1997

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C7L. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, 21:1, 82-85, 2001

PACE, Garyw. Polímeros microbianos. In : BU'LOOCK, John ; KRISTIANSEN, Bjorn. **Biotecnología Básica**. Traducción : Paloma Liras Padín. Zaragoza : Acribia, 1991. p. 449-462

PACE, G. W. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 15, p. 41-70, 1980

PACE, Gary W. ; RIGHELATO, Renton C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 15, p. 41-70, 1980

PADILHA, F.F. **Produção de biopolímeros sintetizados por microorganismos**. Tese de Doutorado – Departamento de Ciência de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2003

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

PASQUEL, Antonio. Gomas: utilização e aspectos reológicos. **Bol. SBCTA**, 33(1): 86-97, jan/jun 1999

PINCHES, A.; PALLENT, L. J. Rate and yield relationship in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined media. *Biotechnol. Bioeng.* 1986, 28, 1484-1496

POPLAWSKI, A. R.; URBAN, S. C.; CHUN, W. Biological role of Xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Appl. Environm. Microbiol.** V. 66. n. 12, p. 5123-5127, 2000

PORTILHO, M. **Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de *Agrobacterium sp***, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, UNICAMP, 2002. 86p

PSZCSOLA, Donald E. Curdlan differs from other gelling agents. **Food Technology**, v. 51, n. 4, p. 30, 1997

QUEIRÓZ, J. H. **Contribuição ao estudo da produção de dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides***. Campinas: Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 1987. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)

RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIISKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, 38, 1301-1310, 2003

- RHOLF, F. J. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. **Exeter Software**: New York, 1992
- RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p. 193-245
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- SANDFORD, P. A. Exocellular microbial polysaccharides. **Adv. In Carb. Chem. Biochem.**, v. 36, p. 292-296. 1979
- SANDFORD, P. A. Potential important microbial gums in GLICKSMAN, M. **Food hydrocolloids**. Ed., Boca Raton: C.R.C. Press, v. 1, p. 168-199. 1982
- SERRANO-CARREON L.; CORONA R. M.; SANCHEZ A.; GALINDO E. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. **Process Biochem.** 1998, 33, 133-146
- SILVA-MANN, R.; SALGADO, K. C. C.; VIEIRA, M. G. G. C.; & MACHADO, J. C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27. Jan./Feb. 2002
- SILVA F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters** 203, 2001. 165-71
- SILVEIRA, I. A.; OLIVEIRA, R. M.; CARVALHO, E. P.; CARVALHO, D.; PILON, L. Aspectos gerais, positivos e negativos da utilização de marcadores PCR-RAPD na identificação de microrganismos. **Boletim SBCTA**, 34:2, 77-83, 2000
- SOKAL, R. R.; MICHENER, C. D. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Sci. Bull.* , 38, 1409-1438, 1958
- SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni* cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**. V. 8, n. 2, p. 115-123, 2000

- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**, 2. ed., Butterworth Heinemann, 2000
- SUTHERLAND, I. A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, 29, 70-71, 2002
- SUTHERLAND, Ian W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 12, p. 393-448, 1994
- SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall. p. 363-388, 1993
- SUTHERLAND, I. W. & TAIT, M.I. Biopolymers. **Encyclopedia of Microbiology**, v.1, 1992
- SUTHERLAND, I. W. Extracellular polysaccharide. In: Dellweg, H. **Biotechnology** Weinheim: Verlag Chemie. p. 531-574, v. 3, 1983
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**. v. 23, p. 80-142, 1982
- SZCESNIAK, A. S. Rheological basis for selecting hydrocolloids for specific applications. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. 3 ed. **Gums and stabilisers for the food industry**. London: Elsevier, . 311-323, 1985
- SZCESNIAK, A. S. Physical properties of foods: What they are. In: PELEG, M. E BAGLEY, E. B. **Physical properties of foods**. New York: AVI, p. 1-37. 1983
- TEIXEIRA, H.; VIEIRA, M. G. C.; MACHADO, J. C. Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, Nov./Dec. 2004
- TORRES, L. G.; BRITO, E.; GALINDO, E.; CHOPIN, L. Viscous behaviour of xanthan aqueous solutions from a variant of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. V. 75, p. 58-64, 1993
- UHLINGER, D. J.; WHITE. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. **Appl. Environm. Microb.**, v. 45, p. 64-70, 1983

VANDAMME, E. J.; BRUGGEMAN, G.; BAETS, S. De; VANHOOREN, P.T. Useful polymers of microbial origin. **Agro-Food-Industry Hi-Tech**, p. 21-25, Sep-Oct. 1996

VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização do Biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo cultivado com cana de açúcar da região de Ribeirão Preto-São Paulo-Brasil.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995.

VOJNOV, A.A.; ZORREGUIETA.A.; DOW, J.M.; DANIELS, M.J.; DANKERT, M.A. **Microbiology** 144, 1998. 1487-1493

WEISS, R. M.; OLLIS, D. F. Extracellular microbial polysaccharides (1). Substrate, biomass and product kinetics equation from xanthan gum fermentations. **Biotechnol. Bioeng.** 1980, 22, 859-873

WELSH, J. & MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomas using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Rs.* 18:7213-7218. 1990

WILLIAMS, J. G. K.; HANAFEY, M. K.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. **Methods in Enzimology**, 218, 704-740. 1993

WILLIAMS, M.N.V.; PANDE, N.; NAIR, S.; MOHAN, M. & BENNETT, J. Restriction fragment length polymorphism analysis of polymerase chain reaction products amplified from mapped loci of rice (*Oryza sativa* L.) genomic DNA. **Theor. Appl. Genet.** 82:489-498. 1991

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990

WILLIAMS, G. A.; WIMPENNY, T. W. J.; LAWSON, J. C. Preliminary studies on the composition and rheological properties of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* PB1 (NCIB 11264). **Biochim. Biophys. Acta**, n. 585, p. 611-619. 1979

WOICIECHOWSKY, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca,** Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001

YAP, L. & NELSON, R. J. Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA based dendograms. **International Rice Research Institute**. Manila, Philippines. Discussion Paper Series nº 14, 1996

ZHOU, X. & JIAO, X. Investigation of *Listeria monocytogenes* contamination pattern in local Chinese food market and the tracing of two clinical isolates by RAPD analysis. **Food Microbiology**, 21, 695-702, 2004