



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO**

**ANDREA LOBO MIRANDA**

**INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E DA  
COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DE *Xanthomonas* spp. PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE PRODUÇÃO E QUALIDADE  
DAS XANTANAS**

**SALVADOR**

**2019**

**ANDREA LOBO MIRANDA**

**INVESTIGAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E DA  
COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DE *Xanthomonas* spp. PARA  
IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES DE PRODUÇÃO E QUALIDADE  
DAS XANTANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Janice Izabel Druzian

Co-orientadora: Profa. Dra. Alaise Gil Guimarães

**SALVADOR**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Miranda, Andrea Lobo

Investigação das condições de cultivo e da composição  
dos ácidos graxos de *Xanthomonas* spp. para  
identificação de marcadores de produção e qualidade das  
xantanas / Andrea Lobo Miranda. -- Salvador, 2019.

96 f. : il

Orientador: Janice Izabel Druzian.

Coorientador: Aláise Gill Guimarães.

Tese (Doutorado - Doutorado em Biotecnologia -  
RENORBIO) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto  
de Ciências da Saúde, 2019.

1. Viscosidade. 2. Massa molecular. 3. FAME. 4.  
Ácidos graxos insaturados. 5. *X. campestris*. I.  
Druzian, Janice Izabel. II. Guimarães, Aláise Gill .  
III. Título.

## TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

**“Investigação das condições de cultivo e da composição dos ácidos graxos de *xanthomonas* para identificação de marcadores de produtividade e qualidade das xantanas”**

Elaborada por:

**ANDRÉA LÔBO MIRANDA**

Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de

**DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA**

Salvador - Bahia, 18 de junho de 2019

BANCA EXAMINADORA:



---

**Prof.ª Dr.ª Janice Izabel Druzian**  
(Orientadora)

Universidade Federal da Bahia



---

**Prof.ª Dr.ª Karina Teixeira Magalhães Guedes**

Universidade Federal da Bahia



---

**Prof. Dr. Marcelo Andres Umsza Guez**

Universidade Federal da Bahia



---

**Prof. Dr. Denilson de Jesus Assis**

Universidade Salvador - UNIFACS



---

**Prof. Dr. Carolina Oliveira de Souza**

Universidade Federal da Bahia

*Dedico esse trabalho à minha mãe, Vera Lobo, por todo amor e por sempre me incentivar e acreditar que chegaria sempre mais distante.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus pela vida e por tudo que conquistei, mostrando-me sempre qual caminho deveria seguir.

À minha mãe, Vera, pelo amor incondicional, pela base e por ser meu porto seguro nos momentos mais difíceis e felizes também. Por sempre ter a expectativa de que eu conquistaria esse título, isso também me incentivou muito.

À minha amiga Samantha pela paciência durante as análises, por me acompanhar nos laboratórios em qualquer horário, dia ou feriado, pelas caronas que acabavam se tornando viagens de volta para casa, além de me incentivar nos momentos de tristeza, angústias, indecisões, resultados, alegrias e conquistas.

À minha família adquirida, meus grandes amigos, por todos os momentos de incentivo e apoio.

À professora Dra. Janice Izabel Druzian pela orientação, oportunidade, pelos ensinamentos e comprometimento com a pesquisa.

À professora Dra. Alaíse Gil Guimarães pela co-orientação, por me ajudar sempre, com os ensinamentos, disponibilização do laboratório e por sempre acreditar em mim.

Aos meus queridos amigos, adquiridos na rotina diária do LAPESCA, Cris e Deni, que possibilitaram deixar as análises mais leves, os dias mais engraçados e me incentivaram muito nessa caminhada.

Aos amigos do LAPESCA que também me ajudaram na realização dos experimentos, dividiram momentos difíceis, divertidos e sempre estiveram presentes: Paulo Romano, Jamile, Carol, Paulo Leonardo, Johnson, Lucas, Paulo Lemos, Bianca, Arão e aqueles que me ajudaram muito com a metodologia de obtenção da xantana, Graciete, Juliana, Plínio, Luciana e Jéssica.

À minha turma do RENORBIO e agregados pela união, pelo compartilhamento dos conhecimentos adquiridos durante a realização das disciplinas e pelos momentos que nos apoiávamos e também nos descontraíamos, em especial, à Roger, Pedro, Sandra, Neandder e Patrícia.

Ao RENORBIO, a todos os docentes e à Cláudia por possibilitar a realização dessa etapa com máximo de aproveitamento possível.

À FAPESB pela bolsa concedida.

Ao IF Baiano pela compreensão e apoio durante esse último ano de doutorado.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para mais essa vitória.

Obrigada!

## RESUMO

A goma xantana é um exopolissacarídeo microbiano com várias funções nas *Xanthomonas* spp. e grande variedade de aplicações industriais devido a alta solubilidade em água, emulsibilidade, suspensibilidade e espessamento. Apesar da goma xantana ser um dos principais polissacarídeos de origem microbiana comercializados no mundo, apresenta ampla heterogeneidade na composição e massa molecular, e conseqüentemente nas propriedades resultantes. Dessa maneira, nesse estudo foi investigada a composição de ácidos graxos celulares e o efeito de diferentes cepas e tempo de cultivo de *Xanthomonas* spp. com a finalidade de identificar marcadores de produção, composição e qualidade das gomas xantanas obtidas. As cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290, *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 foram monitoradas durante 168 h de cultivo. A cada 24 horas, amostras de células e das gomas foram avaliadas por meio das análises de FTIR, DRX, viscosidade aparente, massa molecular, TGA, açúcares e ácidos, além da determinação do crescimento celular e consumo do substrato. As três cepas de *Xanthomonas* spp. apresentaram perfis qualitativos de ácidos graxos celulares semelhantes durante todo o cultivo, sendo os ácidos 16: 1n7 e 16: 0 os majoritários. Para todas as cepas estudadas, foram obtidas correlações significativas entre as razões desses ácidos graxos e as produções de goma xantana. Constatou-se também influência das características intrínsecas das cepas nas propriedades, produção e composição do polímero. A cepa *X. campestris* pv. *campestris* 1155 apresentou maior produtividade em 24 horas de cultivo ( $0,149 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), mas com propriedades limitadas para aplicação industrial, tais como viscosidade e massa molecular. Por outro lado, a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 apresentou comportamento inverso, porém, com maior produtividade apenas após 96h ( $0,039 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Não houve associação direta entre a composição de ácidos graxos e as propriedades das gomas sintetizadas. Com base na avaliação de alguns parâmetros cinéticos do cultivo, foi possível definir a cepa de *Xanthomonas* (290) e o tempo de cultivo (48h), associados a qualidade do exopolímero resultante. Pela primeira vez foi identificada uma relação direta entre ácidos graxos insaturados / saturados (I/S) celulares e a produção da goma xantana, o que permite a identificação de um possível marcador químico de produção desse biopolímero.

**Palavras-chave:** Viscosidade; Massa molecular; FAME; Ácidos graxos insaturados; *X. campestris*; *X. axonopodis*.

## ABSTRACT

Xanthan gum is a microbial exopolysaccharide with various functions in *Xanthomonas* spp. and a wide variety of industrial applications due to its high water solubility, emulsifiability, suspensibility and thickening. Although xanthan gum is one of the main polysaccharides of microbial origin marketed worldwide, it presents wide heterogeneity in composition and molecular mass, and consequently in the resulting properties. In this way, this study investigated the composition of cell fatty acids and the effect of different strains of *Xanthomonas* spp. and time culture with the purpose of identifying production markers, composition and quality of xanthan gums obtained. *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290, *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 strains were monitored for 168h of culture. At 24h, cell and gum samples were analyzed by FTIR, XRD, apparent viscosity, molecular mass, TGA, sugars and acids, as well as determination of cell growth and substrate consumption. The three *Xanthomonas* spp. strains presented qualitative profiles of cellular fatty acids similar throughout the culture, with the acids 16: 1n7 and 16: 0 being the major ones. For all strains studied, significant correlations were obtained between the ratios of these fatty acids and xanthan gum production. It was also verified the influence of the intrinsic characteristics of the strains on the properties, production and composition of the polymer. The strain *X. campestris* pv. *campestris* 1155 showed higher productivity in 24 hours of cultivation ( $0.149 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) but with limited properties for industrial application such as viscosity and molecular mass. On the other hand, the strain *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 presented an inverse behavior, however, with higher productivity only after 96h ( $0.039 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). There was not direct association between the composition of fatty acids and the synthesized gums properties. Based on the evaluation of some kinetic parameters of the culture, it was possible to define the *Xanthomonas* strain (290) and the culture time (48h), associated with the quality of the resulting exopolymer. For the first time, a direct relationship between unsaturated / saturated cellular fatty acids (U / S) and the xanthan gum production was identified, which allows the identification of a possible chemical marker of production of this biopolymer.

**Keywords:** Viscosity; Molecular mass; FAME; Unsaturated fatty acids; *X. campestris*; *X. axonopodis*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- Figura 1.1. Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 (A), *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 (B) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 (C) em placa com ágar nutriente. .... 20
- Figura 1.2. Estrutura primária da goma xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). .... 25
- Figura 1.3. Rotas bioquímicas para síntese de goma xantana (ROSALAM e ENGLAND, 2006 adaptado; ASSIS, 2013). .... 27
- Figura 1.4. Etapas gerais de produção da goma xantana. .... 29

### CAPÍTULO II

- Figura 2.1. Dendrograma (A) e resultados da análise de agrupamento de cepas de *Xanthomonas* (B). As pontuações no plano são definidas pelos dois primeiros componentes principais PC1 e PC2, utilizando as percentagens de ácidos graxos das células de *Xanthomonas* durante a produção de goma. .... 58
- Figura 2.2. Produção de goma xantana e crescimento celular de cepas de *Xanthomonas* durante 168h de cultivo. .... 60
- Figura 2.3. Viscosidade aparente de soluções aquosas de goma xantana a 0,5% derivada da glicose produzida por cepas de *Xanthomonas* a 25 °C em função da taxa de cisalhamento. .. 62
- Figura 2.4. Viscosidade aparente de solução aquosa de goma xantana a 0,5% derivada da glicose produzida por *Xanthomonas* a 25 °C / 25 s<sup>-1</sup>, expressa em função do tempo. .... 63
- Figura 2.5. Correlação entre a produção de xantana (g L<sup>-1</sup>) e a razão de ácidos graxos majoritários insaturados / saturados (I/S) (C16: 1n7 / C16: 0) na membrana celular das cepas de *Xanthomonas* durante o cultivo. .... 66

### CAPÍTULO III

- Figura 3.1. Produção de goma xantana, crescimento celular e consumo de substrato durante o cultivo com as três cepas de *Xanthomonas* spp. por 168h. .... 79
- Figura 3.2. Comportamento de velocidades específicas ( $\mu$ ) ao longo de 168h de cultivo para diferentes cepas de *Xanthomonas*. .... 82
- Figura 3.3. Viscosidade aparente de soluções de xantana a 0,5% (m v<sup>-1</sup>) obtidas pelas diferentes cepas a 25 °C / 50 s<sup>-1</sup> em função do tempo. .... 84
- Figura 3.4. Espectros FTIR das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas nos tempos de cultivo de produção máxima de goma xantana. .... 85
- Figura 3.5. Difrátogramas de raios-X das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas nos tempos de cultivo de produção máxima de goma xantana. .... 86

Figura 3.6. Derivadas termogravimétricas (DTG) das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas no tempo mínimo de cultivo, no tempo de cultivo com produção máxima de goma xantana e no tempo máximo de cultivo.. ..... 90

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1.1. Características bioquímicas de diferentes espécies de <i>Xanthomonas</i> (SHAMAR <i>et al.</i> , 2014). .....	21
Tabela 1.2. Aplicações de goma xantana e respectivas funções. ....	40

### CAPÍTULO II

Tabela 2.1. Composição de metil ésteres de ácidos graxos de células de <i>Xanthomonas</i> durante cultivo.....	56
Tabela 2.2. Massa molecular da goma xantana produzida por diferentes cepas de <i>Xanthomonas</i> . .....	64

### CAPÍTULO III

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos determinados para o período de cultivo de 168h. ....	75
Tabela 3.2. Curvas padrões e $R^2$ usados para a obtenção das concentrações de açúcares e ácidos das amostras de xantana. ....	77
Tabela 3.3. Parâmetros cinéticos obtidos ao longo de 168h de cultivo com diferentes cepas de <i>Xanthomonas</i> spp.....	81
Tabela 3.4. Índice de cristalinidade (IC) e massa molecular (MM) das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas no tempo mínimo de cultivo, no tempo de cultivo com produção máxima de goma xantana e no tempo máximo de cultivo. ....	87
Tabela 3.5. Composição química das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas no tempo mínimo de cultivo, no tempo de cultivo com produção máxima de goma xantana e no tempo máximo de cultivo. ....	88
Tabela 3.6. Valores de $T_{onset}$ , $T_{pico}$ e perda de massa das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas no tempo mínimo de cultivo, no tempo de cultivo com produção máxima de goma xantana e no tempo máximo de cultivo. ....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análise de componentes principais
ATR	Acessório de reflectância total atenuada
BAME	Ésteres metílicos ácidos bacterianos
CG-EM	Cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DIC	Detecção por ionização em chama
DRX	Difração de raio-x
EPS	Exopolissacarídeo
FAME	Ésteres metílicos ácidos graxos
FTIR	Infra-vermelho com transformada de Fourier
IC	Índice de cristalinidade
IR	Índice de refração
I/S	Razão entre ácidos graxos insaturados e saturados
MM	Massa molecular
PC	Componentes principais
Pr	Produtividade
rp	Velocidade instantânea de formação de produto
rs	Velocidade instantânea de consumo de substrato
rx	Velocidade instantânea de crescimento celular
TGA	Análise termogravimétrica
TR	Tempo de retenção
T <sub>onset</sub>	Temperatura inicial de decomposição
T <sub>pico</sub>	Temperatura máxima de decomposição
UV	Ultravioleta
YM	Extrato de levedura
Yp/s	Fator de conversão substrato-produto
Yx/p	Fator de conversão produto-biomassa
Yx/s	Fator de conversão substrato-biomassa
μp	Velocidade específica de formação de produto
μs	Velocidade específica de consumo de substrato
μx	Velocidade específica de crescimento celular

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Referências .....	17
2 OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 CAPÍTULO I .....	20
Revisão de Literatura .....	20
3.1 <i>Xanthomonas</i> spp. ....	20
3.1.1 Características bioquímicas .....	20
3.1.2 Patogenicidade .....	21
3.1.3 Composição de ácidos graxos da membrana celular.....	22
3.2 Goma xantana .....	24
3.2.1 Biossíntese .....	26
3.2.2 Cultivo e produção de goma xantana .....	28
3.2.3 Propriedades da goma xantana.....	32
3.2.4 Efeito das condições de cultivo sobre a qualidade da xantana .....	34
3.2.4.1 Efeito da fonte de carbono e de nitrogênio .....	34
3.2.4.2 Efeito da temperatura .....	35
3.2.4.3 Efeito do pH.....	36
3.2.4.4 Efeito dos sais .....	36
3.2.4.5 Efeito do tipo de cepa de <i>Xanthomonas</i> e do tempo de cultivo .....	37
3.2.5 Cinética da produção de goma xantana .....	38
3.2.6 Aplicações.....	39
3.3 Referências .....	42
4 CAPÍTULO II .....	50
Investigação da composição de ácidos graxos de <i>Xanthomonas</i> spp. como marcador químico de produção e qualidade da goma xantana.....	50
4.1 Resumo .....	50
4.2 Introdução.....	50
4.3 Material e Métodos .....	52
4.3.1 Micro-organismos e preparação do inóculo .....	52
4.3.2 Concentração celular e produção de goma xantana .....	52

4.3.3 Purificação da goma xantana .....	53
4.3.4 Composição de ácidos graxos das cepas de <i>Xanthomonas</i> .....	53
4.3.5 Viscosidade aparente da goma xantana.....	54
4.3.6 Massa molecular da goma xantana .....	54
4.3.7 Análise dos dados.....	55
4.4 Resultados e Discussão .....	55
4.4.1 Composição de ácidos graxos das cepas de <i>Xanthomonas</i> .....	55
4.4.2 Concentração celular e produção da goma xantana .....	59
4.4.3 Viscosidade aparente da goma xantana.....	61
4.4.4 Massa molecular da goma xantana .....	63
4.4.5 Correlação entre a composição de ácidos graxos das <i>Xanthomonas</i> e a produção e qualidade da xantana.....	65
4.5 Conclusão .....	68
4.6 Referências .....	68
5 CAPÍTULO III.....	71
Influência do tempo de cultivo e de cepas de <i>Xanthomonas</i> spp. na produção, composição e propriedades da goma xantana .....	71
5.1 Resumo.....	71
5.2 Introdução.....	72
5.3 Material e Métodos .....	73
5.3.1 Micro-organismos e preparação do inóculo .....	73
5.3.2 Concentração celular e produção de goma xantana .....	73
5.3.3 Parâmetros cinéticos do cultivo .....	74
5.3.4 Caracterização da goma xantana.....	76
5.3.4.1 Viscosidade aparente .....	76
5.3.4.2 Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	76
5.3.4.3 Difração de raio-x (DRX).....	76
5.3.4.4 Massa molecular (MM) .....	76
5.3.4.5 Composição química .....	77
5.3.4.6 Análises termograviméticas (TGA).....	78
5.4 Resultados e discussão .....	78
5.4.1 Efeito das cepas de <i>Xanthomonas</i> spp. e do tempo de cultivo no crescimento celular, consumo de substrato e produção da xantana.....	78
5.4.2 Efeito das cepas de <i>Xanthomonas</i> spp. e do tempo de cultivo nas propriedades da xantana .....	83
5.4.2.1 Viscosidade aparente .....	83

5.4.2.2 FTIR .....	85
5.4.2.3 Difração de raio-x (DRX) e massa molecular.....	86
5.4.2.4 Composição química .....	87
5.4.2.5 Análise termogravimétrica.....	89
5.5 Conclusões.....	91
5.6 Referências .....	92
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	95

## 1 INTRODUÇÃO

A goma xantana é um exopolissacarídeo microbiano produzido industrialmente a partir de fontes de carbono por cultivo aeróbico, usando bactérias do gênero *Xanthomonas*. A xantana apresenta alta massa molecular e é ainda classificada como um hetero-polissacarídeo pois apresenta repetidas unidades pentassacarídeas com duas estruturas moleculares de glicose, manose e uma unidade de ácido glucurônico (SILVA *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2016; HABIBI e KHOSRAVI-DARANI, 2017).

A goma xantana está envolvida em várias funções nas *Xanthomonas* spp., incluindo adesão, interações célula-a-célula em relações específicas, simbióticas ou patogênicas; proteção contra condições ambientais extremas, como níveis de umidade reduzidos; servem de barreira, impedindo ataque de vírus e anticorpos que se ligam a sítios específicos da membrana celular; neutralizam toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuam como fonte de carbono e energia; além de converterem o excesso de substrato em uma massa espumosa, que é difícil de ser metabolizada por outros micro-organismos (KUMAR *et al.*, 2007).

Com relação a utilização da xantana a nível industrial, esta apresenta propriedades desejáveis, tais como solubilidade em água, emulsibilidade, suspensibilidade e espessamento. As soluções aquosas de goma xantana são altamente viscosas, mesmo com baixa concentração de goma, estável em sal, temperatura e pH, é biodegradável e não apresenta toxicidade. Com isso, é amplamente utilizada como aditivo em muitas indústrias, como alimentos, recuperação de petróleo, produtos farmacêuticos, cosméticos e têxteis (ROSALAM e ENGLAND, 2006; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011; WANG *et al.*, 2016; DEMIRCI *et al.*, 2017).

Atualmente, a goma xantana é considerada, comercialmente, como o polissacarídeo microbiano mais importante (DEMIRCI *et al.*, 2017). No mundo todo, o consumo de xantana em 2014 foi estimado entre 150.000 e 160.000 toneladas (DEMIRCI *et al.*, 2017). Porém, as principais limitações da produção de xantana estão relacionadas com a reprodutibilidade dos rendimentos e de suas propriedades, tais como a composição, viscosidade e massa molecular, que dependem da fonte de carbono, concentração inicial de nitrogênio, temperatura, tempo de cultivo e cepa de *Xanthomonas* utilizada (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

Um problema relacionado com a produção de goma xantana deve-se à instabilidade das linhagens da bactéria, o que resulta em variação de massa molecular do polissacarídeo, assim como no grau de piruvatação e acetilação e consequentemente na viscosidade da xantana produzida. Dessa maneira, a caracterização das linhagens utilizadas no cultivo seria necessária

para a identificação da ocorrência de mutações durante os sucessivos repiques ao qual o microrganismo é submetido (RAMOS, 2011).

Em bactérias Gram-negativas, os exopolissacarídeos são sintetizados de forma intracelular, onde os açúcares nucleotídeos fornecem a célula os monossacarídeos, e posteriormente, as unidades formadoras do polissacarídeo são então excretadas e este é polimerizado fora da célula. A fluidez da membrana celular das *Xanthomonas* spp. está associada a composição de ácidos graxos celulares, em particular a proporção de ácidos graxos insaturados presentes, devido ao menor enrijecimento da membrana, e aumento da permeabilidade celular. Essa composição pode ser alterada de forma a controlar a fluidez da membrana e conseqüentemente, formação do polissacarídeo, em resposta a várias condições de estresse a qual a bactéria foi exposta (KANEDA, 1991).

Com isso, acredita-se que a composição de ácidos graxos celulares pode estar associada com a produção e propriedades da goma xantana e poderia servir como marcador de produção e qualidade do biopolímero, e assim, reduzir as limitações de produção e custos a nível industrial.

## 1.1 REFERÊNCIAS

DEMIRCI, A.S.; PALABIYIK, I.; ALTAN, D.D.; APAYDIN, D.; GUMUS, T. Yield and rheological properties of exopolysaccharide from a local isolate: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 18-23, 2017.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GOMEZ, E. Xanthan gum: Production, Recovery, and Properties. **Biotechnology Advanced**, v. 18, p. 549-579, 2000.

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

KANEDA, T. Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance. **Microbiological Reviews**, v. 6, p. 288-302, 1991.

KUMAR, A.S.; MODDY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – A perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 103-117, 2007.

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

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

RAMOS, B. F. M. **Produção de goma xantana em água produzida da indústria de petróleo**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) - Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

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

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

WANG, Z.; WU, J.; ZHU, L.; ZHAN, X. Activation of glycerol metabolism in *Xanthomonas campestris* by adaptive evolution to produce a high-transparency and low-viscosity xanthan gum from glycerol. **Bioresource Technology**, v. 211, p. 390-397, 2016.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos de diferentes cepas e do tempo de cultivo, associados as alterações na composição de ácidos graxos celulares de *Xanthomonas*, visando identificar marcadores de produção, composição e qualidade das gomas xantanas resultantes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a composição de ácidos graxos celulares de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290, *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 e sua relação com a produção de goma xantana;
- Investigar a composição de ácidos graxos celulares das três cepas de *Xanthomonas* spp. e sua relação com a viscosidade e massa molecular de goma xantana;
- Estudar os efeitos das três cepas de *Xanthomonas* spp. e do tempo de cultivo sobre a produção, crescimento celular e consumo de substrato durante a produção de goma xantana;
- Avaliar parâmetros cinéticos de produção de goma xantana por 168 horas de cultivo com as três cepas de *Xanthomonas* spp.;
- Avaliar o efeito das três cepas de *Xanthomonas* e do tempo de cultivo nas propriedades e composição das gomas xantana;
- Identificar uma relação direta entre a composição de ácidos graxos celulares e a produção, viscosidade e massa molecular da xantana, para usar como possível marcador químico de produção e qualidade desse biopolímero.

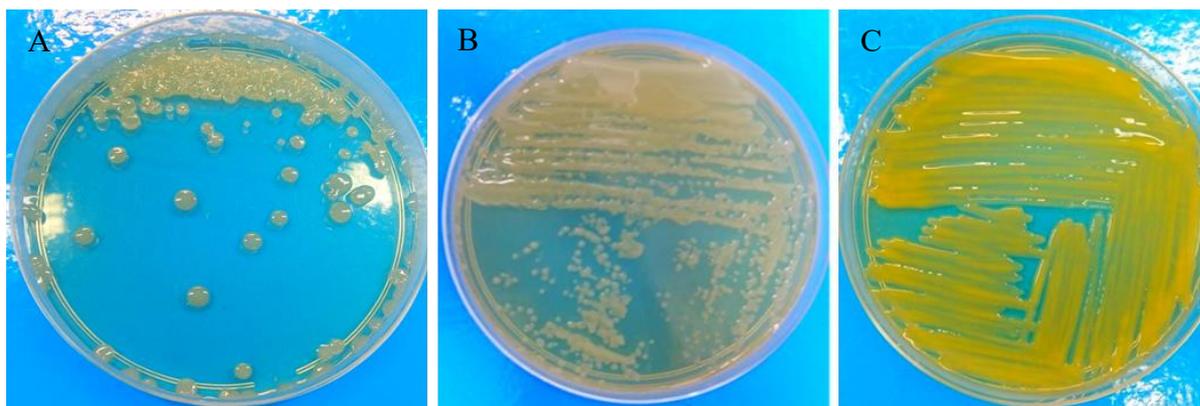
## 3 CAPÍTULO I

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Xanthomonas* spp.

*Xanthomonas* spp. são bactérias gram-negativas, aeróbias estritas, curtas, geralmente vistas como colônias pigmentadas de amarelo em ágar nutriente (Figura 1.1), que em sua maioria são patógenos para cerca de 400 plantas. *Xanthomonas* é um dos gêneros mais importantes da família *Pseudomonadaceae*, composta por 27 espécies, que podem incluir muitos patovares (VAUTERIN *et al.*, 1991). A classificação geral de *Xanthomonas* quanto às espécies é baseada na capacidade do organismo em hidrolisar gelatina e amido, produzir nitritos e amoníaco a partir de nitratos, formar o pigmento amarelo não solúvel em água em ágar nutriente, e formar pigmento marrom em ágar extrato bovino. Outra chave para a classificação de *Xanthomonas* é baseada na planta que sofre os ataques de bactéria (SHARMA *et al.*, 2014). A *Xanthomonas campestris* é a espécie que causa o maior número de doenças em muitas espécies de plantas (He e Zhang, 2008).

Figura 1.1. Colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 (A), *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 (B) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 (C) em placa com ágar nutriente.



##### 3.1.1 Características bioquímicas

*Xanthomonas* spp. são bactérias quimiorganotróficas e que usam compostos de baixa massa molecular, sendo que algumas são capazes de despolimerizar polissacarídeos e proteínas

naturais. As células realizam metabolismo respiratório aeróbico. As bactérias desse gênero são oxidase-negativo (ou fracamente positivas) e reações catalase-positivas. Os testes para a produção de indol a partir do triptofano e produção de acetoina (Teste de Voges-Proskauer) são negativos (Tabela 1.1). O crescimento em ágar nutriente é inibido por 0,1% de cloreto de trifeniltetrazólio. A maioria das espécies hidrolisam amido rapidamente e não são nitrato redutase. Algumas espécies são capazes de hidrolisar a celulose e pectina (QIAN *et al.*, 2005). A temperatura ótima para o crescimento está na faixa de 25 a 27 °C, sendo que nenhum crescimento é observado acima de 40 °C e abaixo de 5 °C. A Tabela 1.1 apresenta características bioquímicas de diferentes espécies de *Xanthomonas*.

Tabela 1.1. Características bioquímicas de diferentes espécies de *Xanthomonas* (SHAMAR *et al.*, 2014).

Característica	<i>X. campestris</i>	<i>X. fragariae</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>X. axonopodis</i>	<i>X. ampelina</i>
Crescimento a 35 °C	+	+	+	+	-
Hidrólise esculina	+	+	+	+	-
Crescimento mucóide	+	+	-	-	-
Liquefação de gelatina	+	+	-	-	-
Proteólise do leite	+	-	-	-	-
H <sub>2</sub> S de peptona	+	-	-	+	-
Urease	-	-	-	-	+
Tolerância a NaCl (%)	2 – 5	0,5 – 1,0	< 0,5	1,0	1,0
<b>Produção de ácido</b>					
Arabinose	+	-	-	-	+
Glicose	+	+	+	+	-
Manose	+	+	+	-	-
Celobiose	+	-	-	-	-

### 3.1.2 Patogenicidade

*Xanthomonas* spp. são responsáveis por doenças pré e pós-colheita em frutas e legumes. Coletivamente, os membros do gênero causam doença em pelo menos 124 espécies de monocotiledôneas e 268 espécies de dicotiledôneas, incluindo árvores de frutos e nozes, solanáceas e brassicáceas, plantas e cereais. Eles causam pragas, manchas e apodrecimento de

diferentes frutas e vegetais por meio da ação de várias enzimas hidrolíticas associadas com o crescimento das *Xanthomonas* e com a grande quantidade de substrato que esses alimentos fornecem, o que contribui para o crescimento dessas bactérias. As *Xanthomonas* spp. são conhecidas por possuírem atividade proteolítica, amilolítica, celulolítica, pectolítica e lipolítica e também podem causar descoloração amarela de alimentos devido ao seu potencial de produção de pigmentos (KENNEDY *et al.*, 1982).

*Xanthomonas* spp. também produzem goma xantana, um exopolissacarídeo (EPS), que pode causar alterações indesejáveis nas plantas e em certos alimentos e sucos de frutas. Tem sido sugerido que o EPS é produzido para mascarar o reconhecimento dessas bactérias pelas plantas e com isso retardar as respostas de defesa da planta. O papel biológico do EPS provavelmente pode ser melhor definido por meio de suas três propriedades importantes: é altamente hidratado para que forneça proteção contra dessecação e moléculas hidrofóbicas, é altamente aniônico, o que permite que ele concentre nutrientes e imobilize elementos tóxicos, e tem uma boa qualidade de adesão permitindo que um organismo seja adsorvido a sua superfície (SHARMA *et al.*, 2014).

### **3.1.3 Composição de ácidos graxos da membrana celular**

Os ácidos graxos são considerados um dos blocos de construção mais importantes de materiais celulares. Nas células bacterianas, os ácidos graxos ocorrem principalmente nas membranas celulares como constituintes dos fosfolípidios. Os ácidos graxos da membrana podem ser divididos em duas grandes famílias com base em suas relações biossintéticas (KANEDA, 1991). Uma é a família de ácidos graxos de cadeia linear, que inclui palmítico, esteárico, hexadecenoico, octadecenoico, ciclopropânico, e 2- ou 3-hidroxi ácidos graxos. Esses ácidos graxos ocorrem mais comumente em bactérias. A outra é a família de ácidos graxos de cadeia ramificada, que inclui ácidos graxos iso-, anteiso- e  $\omega$ -alíclicos com ou sem uma substituição (insaturação e hidroxilação). A ocorrência desses ácidos graxos em bactérias não é tão comum como o da família de ácidos graxos de cadeia linear, mas é ainda bastante significativa (LECHEVALIER, 1977; O'LEARY e WILKINSON, 1988).

A clara diferença entre essas duas famílias na membrana celular consiste no mecanismo que controla a sua fluidez e influencia em diversos processos metabólicos na célula. Por exemplo, a fluidez das membranas composta por ácidos graxos de cadeia linear pode ser ajustada para o nível adequado pela inclusão de ácidos graxos monoinsaturados. Dessa forma, a fluidez apropriada da membrana celular depende da composição adequada de ácidos graxos

a uma dada temperatura de crescimento, sendo um pré-requisito para a existência de bactérias (KANEDA, 1991). De acordo com Legendre *et al.* (1980), a presença dos ácidos graxos insaturados na membrana celular aumentam a fluidez da membrana a um nível aceitável que facilita o crescimento microbiano. Na ausência desses ácidos graxos, os ácidos graxos saturados normalmente sintetizados em maiores concentrações, produzem uma membrana com nível de fluidez que pode limitar o crescimento.

Além de influenciar diretamente na fluidez da membrana celular, as variações nos ácidos graxos presentes nas células bacterianas são utilizadas para classificação e identificação bacteriana há mais de 30 anos (VAUTERIN *et al.*, 1996). Abel *et al.* (1963) e Yang *et al.* (2012) apresentaram evidências que sugerem que a composição de ácidos graxos da membrana celular de bactérias pode ser utilizada para identificação dessas. Atualmente, os ácidos graxos são utilizados como biomarcadores para diferentes grupos de micro-organismos, como fungos e bactérias. O perfil de ácidos graxos também pode ser utilizado para indicar as fases de crescimento em bactérias (GUCKERT *et al.*, 1986; PIOTROWSKA-SEGET e MROZIK, 2003). Além disso, os ácidos graxos são considerados moléculas-chave que podem indicar condições clínicas como resistência a drogas em parasitas infecciosos (MOHANTY *et al.*, 2012).

Desde a introdução de cromatografia gasosa, a análise de ácidos graxos celulares pode ser usada para a rápida caracterização de bactérias pela análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) e comparação numérica de perfis de ácidos graxos por programas de computador (MILLER, 1982). A análise dos FAME se estabeleceu em muitos laboratórios envolvidos em taxonomia e diagnósticos. O uso de perfis FAME para estudos taxonômicos do gênero *Xanthomonas* foi descrito por Yang *et al.* (1993). Esses autores mostraram que membros do gênero *Xanthomonas* contém pelo menos 65 ácidos graxos diferentes em quantidades e que 50 desses ácidos graxos estavam presentes em mais de 1% das cepas quando 975 cepas foram testadas.

A membrana celular das *Xanthomonas* é caracterizada pela a presença de ácidos graxos de cadeia linear, iso e cadeia anteiso-ramificada, hidroxila, monoinsaturada e presença de ciclopropano (SILVA *et al.*, 2017). A grande diversidade de ácidos graxos encontrados neste gênero, tornam a análise do FAME uma ferramenta para estudar as relações dentro do gênero *Xanthomonas* e, em particular, para identificar rapidamente novas e desconhecidas cepas (VAUTERIN *et al.*, 1996). De acordo com Yang *et al.* (1993), a composição de ácidos graxos distingue as cepas pertencentes a diferentes grupos genômicos dentro do gênero *Xanthomonas*,

sendo que alguns ácidos graxos podem ser informativos e servirem como marcadores taxonômicos, enquanto outros variam de acordo com as condições de crescimento das bactérias. Esses autores fizeram a diferenciação de 975 estirpes de *Xanthomonas* com base na composição de ácidos graxos, determinando o perfil médio de ácidos graxos para cada espécie e a variação de cada ácido graxo dentro das espécies, verificando a significância dos valores médios. Os dados de ácidos graxos foram usados para distinguir espécies em um determinado nível de significância, o que permitiu aos autores identificar espécies novas e outras desconhecidas com base em seus perfis de ácidos graxos.

A composição de ácidos graxos da membrana celular das bactérias tem sido extensivamente estudada para correlacionar com as espécies microbianas ou para monitorar mudanças em populações de micro-organismos (GUO *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2012; AZEVEDO *et al.*, 2014). No entanto, até agora, estudos correlacionando o perfil lipídico com a produção e qualidade da goma xantana sintetizada por essas bactérias ainda não foram descritos pela literatura.

### **3.2 GOMA XANTANA**

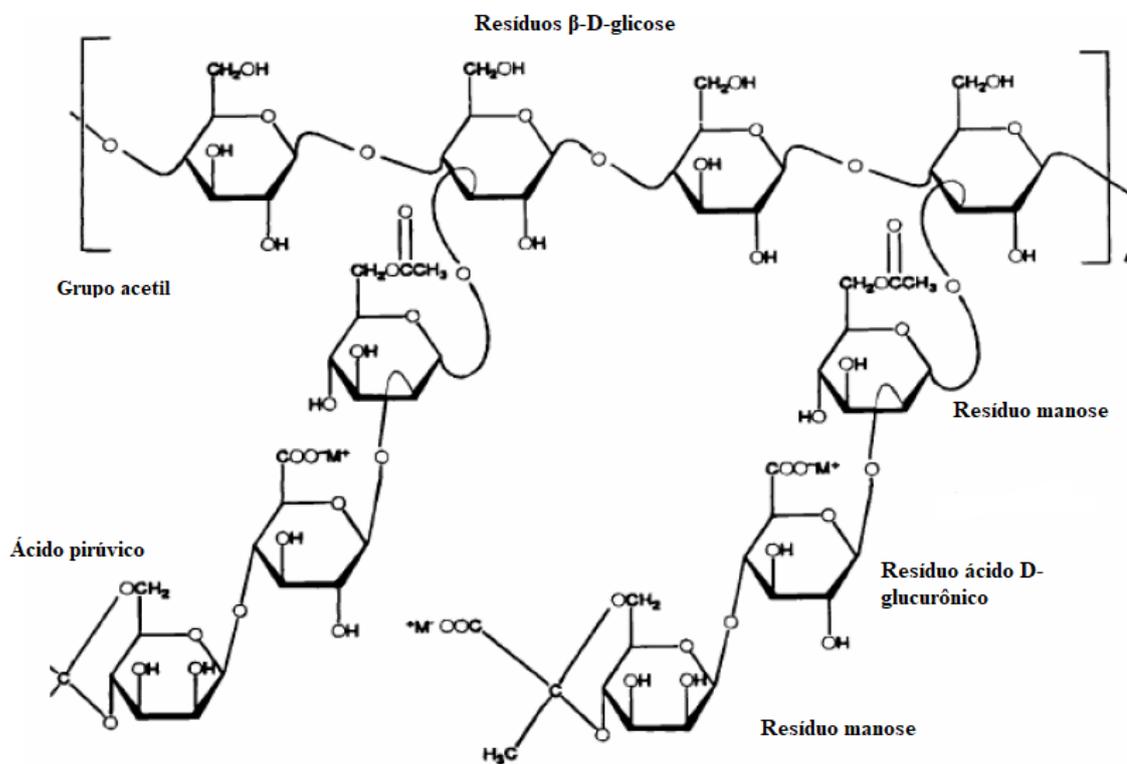
Goma é o termo comum para géis hidro-polissacarídeos coloidais que têm uma afinidade pela água e exibem propriedades de ligação com água e com outros materiais orgânicos / inorgânicos. Tradicionalmente, as gomas derivam de uma grande variedade de plantas. Quimicamente, as gomas são polímeros de carboidratos ou polissacarídeos que possuem propriedades químicas e físicas únicas. Eles servem como material estrutural para o reino vegetal, como reservas de energia, adesivos e também agentes de transferência (HABIBI e KHOSRAVI-DARANI, 2017; PALANIRAJ *et al.*, 2011).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo extracelular produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas* spp., sendo o primeiro biopolímero natural produzido em escala industrial. A goma xantana foi descoberta em 1950 no Centro Nacional do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos para a utilização agrícola. A primeira produção industrial de xantana foi realizada em 1960 seguida pela disponibilidade de produto comercial em 1964 (MARGARITIS e ZAJIC, 1978). A xantana não é tóxica, não sensibiliza e não causa irritação nos olhos ou na pele, sendo aprovado seu uso em alimentos desde 1960 (KUMAR *et al.*, 2018), quando foi aprovado sua aplicação como estabilizante, emulsificante e espessante em alimentos. Estima-se que 40000 toneladas desta goma é produzida por ano, movimentando um mercado de aproximadamente 408 milhões de dólares (LI *et al.*, 2016). Os principais produtores

de xantana nos EUA são Merck e Pfizer e na França são Rhone Poulenc, MeroRousselot-Santia e Sanofi-Elf. Na China, o maior produtor de goma xantana é Saily Chemical, e na Áustria é Jungbunzlauer (KUMAR *et al.*, 2018).

A estrutura primária da goma xantana é linear formada por duas unidades de glicose, duas de manose e uma unidade de ácido glucurônico, na razão molar 2,8:2,0:2,0 e possui uma distribuição da massa molecular entre 2 e 20 milhões de Da. Sua cadeia principal consiste de unidades de  $\beta$ -D-glicose com ligações nas posições 1 e 4, como na estrutura química da celulose. A cadeia lateral consiste de trissacarídeos com uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glicose da cadeia principal (SHARMA *et al.*, 2014). Aproximadamente 50% dos resíduos terminais de manose são piruvatados. A unidade D-manose ligada à cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6 (Figura 1.2). A presença dos ácidos acético e pirúvico produz um tipo de polissacarídeo aniônico. O conteúdo de nitrogênio varia no intervalo de 0,3 - 1,0%, o teor de acetato encontra-se na faixa de 1,9 a 6,0%, e o conteúdo de piruvato fica entre 1,0 e 5,7%.

Figura 1.2. Estrutura primária da goma xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).



A estrutura secundária da goma xantana depende das condições sob as quais a molécula é caracterizada, podendo estar na conformação ordenada ou desordenada. A conformação

ordenada pode ser nativa ou renaturada; não há consenso sobre a existência de relação entre a atividade da conformação e o tipo de estrutura verificada. A forma nativa está presente em temperaturas abaixo do ponto de transição conformacional da molécula, que depende da força iônica do meio em que a xantana está dissolvida. A transição conformacional “ordem-desordem” é direcionada pela ocorrência de temperaturas acima do ponto de transição e/ou redução da força iônica. Ambas as disposições das moléculas, nativa ou renaturada dependem dos mesmos fatores (ASSIS, 2013).

Quando a goma está seca, a cadeia lateral do trissacarídeo fica alinhada com a cadeia principal e estabiliza a conformação geral por interações não covalentes, principalmente ligação de hidrogênio. Em solução, as cadeias laterais envolvem a cadeia principal protegendo as ligações do ataque, e com isso, tem-se uma grande estabilidade da goma sob condições adversas (HABIBI e KHOSRAVI-DARANI, 2017). Dessa forma, pode-se dizer que quanto maior o teor de ácido pirúvico na estrutura da goma xantana, maior será a sua viscosidade e estabilidade térmica. As cadeias do trissacarídeo estão estreitamente alinhadas com a cadeia principal do polímero. A cadeia rígida resultante pode ser formada com uma, dupla ou tripla hélice (MILAS e RINAUDO, 1979), que interage com outras moléculas de polímero para formar um complexo. Os teores de piruvato e acetato nas gomas afetam a interação entre moléculas de xantana, e entre xantana e outros polímeros. A distribuição da massa molecular e as características da goma, dependem da associação entre cadeias, formando agregados de várias cadeias individuais. As variações das condições de cultivo, bem como das cepas de *Xanthomonas* utilizadas influenciam na estrutura do polímero e, conseqüentemente, definem suas características (KUPPUSWAMI, 2014)

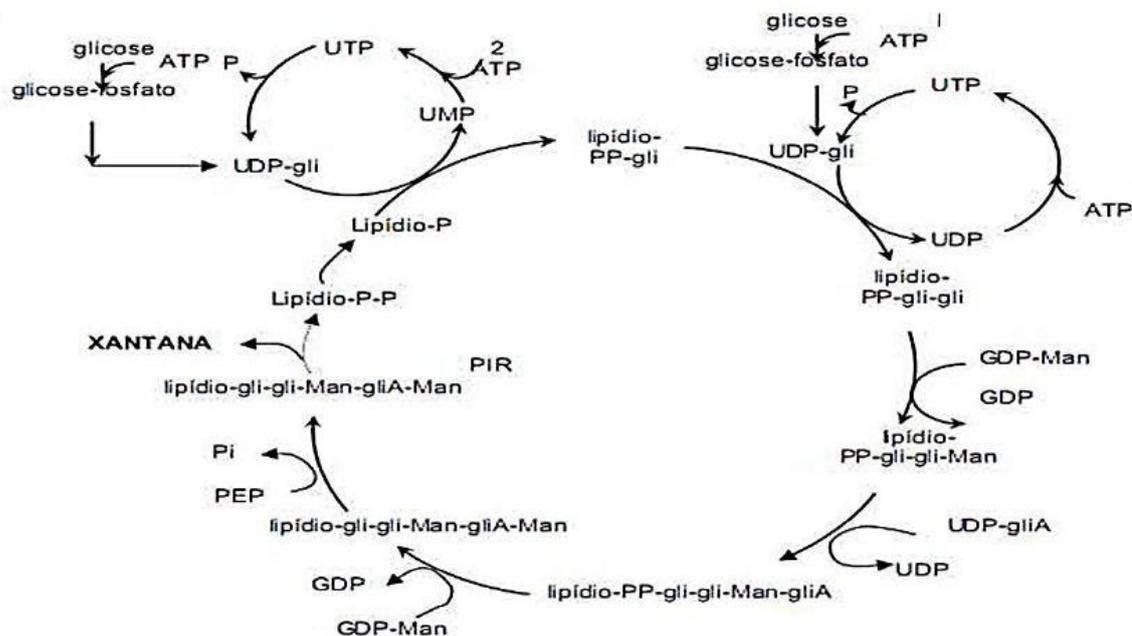
### 3.2.1 Biossíntese

A síntese da goma xantana é semelhante a de exopolissacarídeo por outras bactérias gram-negativas. A via biossintética pode ser dividida em três partes principais: (i) absorção de açúcares simples e conversão para derivados nucleotídais, (ii) montagem de subunidades pentassacarídicas ligadas a um isopentil portador de pirofosfato, e (iii) polimerização de unidades repetidas de pentassacáridos e sua secreção (PALANIRAJ *et al.*, 2011). O esqueleto de xantana é formado por adições sucessivas de D-glicose-1-fosfato e D-glicose a partir de 2 moles de UDP D-glicose. Depois disso, D-manose e ácido D-glucurônico são adicionados de GDP manose e ácido UDP-glucurônico, respectivamente. Grupos O-acetil são transferidos de acetil-CoA para o resíduo interno de manose, e o piruvato de fosfoenol piruvato é adicionado

ao terminal da manose. Cada uma dessas etapas requer enzimas e substratos específicos para conclusão. Se o substrato ou a enzima está ausente, o passo é bloqueado, e a produção da goma é interrompida (SHARMA *et al.*, 2014).

A Figura 1.3 apresenta, de forma geral, as principais rotas bioquímicas para produção da goma xantana. Pode-se dizer que a biossíntese deste polímero é complexa e se inicia com a produção de precursores UDP-glicose, UDP-ácido glucurônico e GDP-manose a partir da conversão de açúcares simples para precursores derivados de açúcares nucleotídeos (ASSIS, 2013). As subunidades de pentassacarídeos são fixadas no interior da membrana portadora de fosfato poliprenol e a adição de grupos acetil e piruvato ocorrem durante a polimerização de unidades repetidoras e secreção do polímero. A etapa final da biossíntese ocorre quando a goma é excretada para o meio extracelular (PALANIRAJ *et al.*, 2011).

Figura 1.3. Rotas bioquímicas para síntese de goma xantana (ROSALAM e ENGLAND, 2006 adaptado; ASSIS, 2013).



A biossíntese de xantana, como na maioria das bactérias produtoras de polissacarídeos, utiliza vários doadores de carboidratos para formar o polímero. As melhores fontes de carbono para biossíntese de xantana são os açúcares (glicose e sacarose). O nitrogênio, um nutriente essencial, pode ser fornecido como um composto orgânico ou como uma molécula inorgânica. Pequenas quantidades de ácidos orgânicos (por exemplo, succínico e cítrico) podem ser adicionados ao meio para aumentar sua produção (MILAS e RINAUDO, 1979). A concentração da fonte de carbono afeta diretamente na produção de xantana. A relação C/N normalmente

usada em meios de produção de xantana é menor do que a utilizado durante o crescimento da *Xanthomona*, pois a goma xantana constitui a cápsula bacteriana e sua produção é associada ao crescimento. Durante a produção do inóculo, a concentração celular é aumentada, mas a produção de xantana é minimizada porque a goma ao redor das células impede o transporte de nutrientes e prolonga a fase estacionária do crescimento (KUMAR *et al.*, 2018).

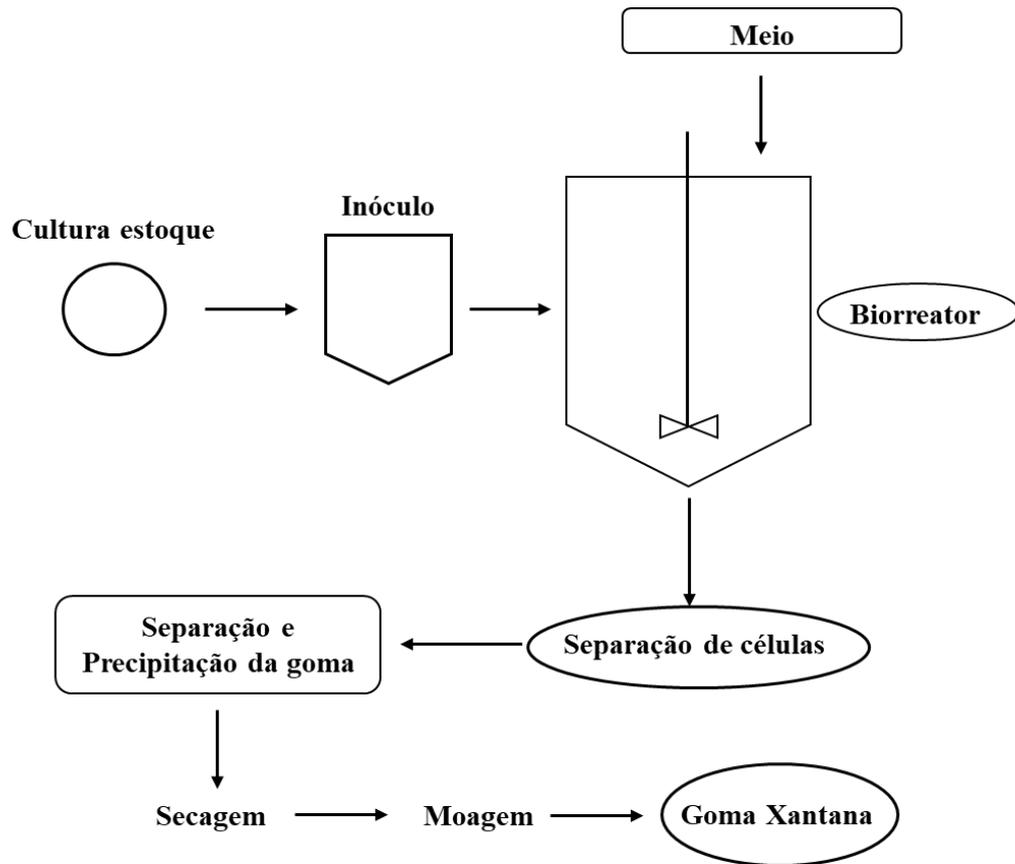
A síntese do biopolímero não é um processo simplesmente associado ao crescimento da célula, mas é interdependente do balanço energético e da formação de metabólitos celulares. Assim, a conversão da glicose via ciclo tricarbóxico compete com a conversão da glicose para síntese da goma xantana (ASSIS, 2013). As etapas de polimerização e o estágio final da secreção do polímero a partir da membrana plasmática, assim como a excreção extracelular, ainda não foram completamente elucidados. De acordo com Sutherland (2001), primeiro ocorre a polimerização no interior da célula e depois, a secreção no exterior. Já Köplin *et al.* (1992) acreditam que as unidades pentassacarídicas são secretadas no exterior da célula e então polimerizadas.

O conhecimento da composição química da xantana é fundamental para sua funcionalidade e aplicação, pois interfere diretamente nas propriedades do biopolímero. As gomas de interesse comercial devem ser capazes de formar estruturas secundárias, terciárias e, às vezes quaternárias em meio aquoso. Portanto, a estrutura primária deve ter configuração que favoreça estes arranjos. Além disso, é possível, através de manipulações genéticas, identificar o gene, alterar a grau de acetilação e aumentar o grau de piruvatação para obter melhores rendimentos de polímero (LIMA *et al.*, 2001).

### **3.2.2 Cultivo e produção de goma xantana**

A produção de goma xantana em escala industrial é realizada principalmente em um sistema de cultivo submerso, monitorando várias variáveis de processo, como a cepa de *Xanthomonas* spp., fontes e percentuais de carbono e nitrogênio, processo contínuo ou em batelada, pH, temperatura, quantidade do inóculo, taxa de fluxo de ar, agitação e tempo de cultivo (LI *et al.*, 2016; GHASHGHAEI *et al.*, 2016). A Figura 1.4 apresenta um esquema geral com as etapas básicas da produção da goma xantana. Primeiro, ocorre a seleção e manutenção da cepa de *Xanthomonas* spp., que deve ser preservada para possível armazenamento a longo prazo (LETISSE *et al.*, 2001).

Figura 1.4. Etapas gerais de produção da goma xantana.



A manutenção adequada da cultura estoque de *Xanthomonas* é importante para consistência e reprodutibilidade na produção de xantana, já que existe uma grande variação entre as espécies de *Xanthomonas*. Uma pequena quantidade da cultura da cepa preservada é expandida por crescimento em superfícies sólidas ou em meios líquidos para obtenção do inóculo que deve ser adicionado aos biorreatores (CASAS *et al.*, 2000). Na obtenção de goma xantana, a etapa do inóculo visa aumentar a concentração de células, limitando a produção de goma xantana, pois o polímero liberado no meio envolve as células dificultando a transferência de nutrientes e oxigênio para os micro-organismos (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; LEELA e SHARMA, 2000).

Após a obtenção do inóculo, ocorre o preparo do meio que deve conter os substratos e todos os nutrientes necessários para o crescimento da cepa. Glicose e sacarose são as fontes de carbono mais empregadas na produção comercial de goma xantana, com concentrações de 1 a 5%, pois concentrações fora desse intervalo inibem o crescimento das bactérias. O nitrogênio é um nutriente essencial que pode ser fornecido como um composto orgânico ou como uma molécula inorgânica. Fontes de nitrogênio inorgânico como sais de amônio ou nitrato são muito

utilizados, e uma grande variedade de fontes complexas de nitrogênio como extrato de levedura e peptona de soja também podem ser empregados para a produção de xantana. A conversão eficiente da fonte de carbono para a produção da goma xantana requer uma alta taxa da relação carbono/nitrogênio do meio de cultivo (PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

No biorreator deve ser controlado o pH, aeração, agitação, temperatura e tempo de cultivo (KUMAR *et al.*, 2018). Durante o cultivo, o pH do meio diminui devido a formação de ácidos orgânicos. Se o pH cair abaixo de 5,0, a formação de xantana reduz drasticamente. Assim, é necessário monitorar e controlar o pH do meio de cultivo, mantendo-o próximo a 7,0 usando um tampão ou adição de base durante o processo (GUMUS *et al.*, 2010; KERDSUP *et al.*, 2009).

A cultura deve ser mantida aerada e a agitação deve ser projetada para dispersar o ar introduzido uniformemente por todo o meio, sendo extremamente importante para aumentar a taxa de transporte de nutrientes através da membrana da célula, que por sua vez suporta a taxa de crescimento do micro-organismo. A aeração e a agitação são parâmetros indispensáveis para garantir condições de aerobiose necessária para o desenvolvimento das *Xanthomonas* spp.. A formação de goma xantana está associada ao aumento da viscosidade do meio de cultivo, gerando assim condições de anaerobiose. Logo, a combinação adequada destes parâmetros, deve ser analisada para evitar condições de estresse hidrodinâmico, assim como limitação de oxigênio (PSOMAS *et al.*, 2007). As temperaturas empregadas para a produção de goma xantana variam de 25 a 34 °C. A temperatura ótima para a produção de xantana depende do meio de produção utilizado, sendo que a temperatura de 28 °C é a mais empregada (PSOMAS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2009).

No fim do cultivo, o meio contém xantana, células bacterianas e muitos outros produtos químicos. Para recuperar a xantana, normalmente, as células são removidas por filtração ou centrifugação. A alta viscosidade do meio com xantana é um grande problema durante remoção das células bacterianas do meio. Nesse caso, pode-se aumentar a temperatura para reduzir a viscosidade do caldo e facilitar a remoção das células por centrifugação ou filtração. Entretanto, a centrifugação nem sempre é eficaz em meios com elevada viscosidade, e o tratamento térmico pode levar à degradação da xantana durante a separação da goma das células (SURESH e PRASAD, 2005). Numerosos métodos já foram desenvolvidos para desativar, lisar ou remover células do meio, como o tratamento com produtos químicos (por exemplo, álcali, hipoclorito, enzimas) e o tratamento por meios mecânicos. Entretanto, o tratamento químico em pH elevado pode causar despiruvilação da goma e afetar suas propriedades, e quando as enzimas são usadas,

elas devem ser removidas do meio e isso eleva os custos de obtenção da goma (PALANIRAJ *et al.*, 2011).

Após a remoção das células, a goma xantana deve ser separada e purificada. A precipitação do polímero é conseguida diminuindo a solubilidade do meio usando métodos como a adição de sais, solventes não miscíveis em água e concentração por evaporação. Os álcoois (metanol, etanol, isopropanol) e a acetona, que são não-solventes para o polissacarídeo, podem ser adicionados ao meio não só para diminuir a solubilidade até a separação, mas também para eliminar impurezas como sais e células. Opções de recuperação que foram estudadas incluem precipitação com solvente orgânico como etanol (ZHANG e CHEN, 2010; NASR *et al.*, 2007), álcool isopropílico (GALINDO e ALBITER, 1996) e misturas de sais e álcool (TORRESTIANA-SANCHEZ *et al.*, 2007; PSOMAS *et al.*, 2007).

A quantidade necessária de cada solvente depende de sua natureza. A precipitação total da goma só é possível quando 3 volumes de álcoois ou acetona (ZHANG e CHEN, 2010; ROTTAVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009) são adicionados por volume do caldo. A adição de um reagente não solvente ao caldo promove a precipitação da goma, não só diminuindo a afinidade da água pelo polímero, mas também aumentando a ligação dos cátions que estão presentes. A adição de sais em concentração suficiente também causa precipitação da goma devido a ligação do íon dos cátions dos sais adicionados, aos grupos ionizados da xantana. Assim, a xantana precipita com quantidades menores de reagentes quando o solvente e o sal são usados de forma combinada (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 1993).

Após a precipitação, o produto é purificado, mecanicamente desidratado e triturado, para obtenção da goma em pó (FLORES-CANDIA e DECKWER, 1999). O método específico de purificação a ser utilizado é determinado pelo uso final do polissacarídeo (ASSIS, 2013). A purificação dos biopolímeros pode ser feita por sucessivas diálises com água deionizada, por reprecipitação fracionada com solventes ou com detergentes catiônicos, pelo uso de métodos cromatográficos ou ainda com agentes químicos ou enzimas que interagem de forma específica com certos grupos (CHI e ZHAO, 2003).

Em escala industrial, a etapa de recuperação da goma pode ser iniciada com a pasteurização do meio visando desativar as enzimas. Em seguida, utiliza-se grande quantidade de álcool para precipitar a goma xantana. O precipitado é então pulverizado em spray-drier. Para melhor separação das células, a centrifugação é facilitada por diluição do caldo. O solvente residual pode ser reciclado após reconcentração e purificação em coluna de destilação (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

### 3.2.3 Propriedades da goma xantana

A goma xantana é um pó com cor que varia de branco a creme. É solúvel em água fria e quente, mas é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos. Sua importância industrial é baseada nas suas propriedades reológicas em solução. As soluções de goma xantana se comportam como fluidos não newtonianos, e são caracterizadas por altos níveis de pseudoplasticidade, isto é, a viscosidade aparente diminui com o aumento da força de cisalhamento, mas é recuperada quase instantaneamente com uma diminuição do cisalhamento (SHARMA *et al.*, 2014). Essa propriedade é atribuída à formação de agregados complexos na goma, envolvendo ligações de hidrogênio e entrelaçamento do polímero. A alta viscosidade com baixas forças de cisalhamento é devido às moléculas imóveis sendo enredado em uma rede altamente ordenada. A desagregação da rede e o alinhamento de moléculas poliméricas individuais na direção de uma força de cisalhamento leva à perda de viscosidade. Quando a força de cisalhamento diminui, os agregados se reformam rapidamente, isso faz com que a viscosidade mude de forma instantânea. Esta propriedade faz da goma xantana um espessante, estabilizador e emulsionante extremamente eficaz (MILAS *et al.*, 1985).

A conformação rígida helicoidal da goma xantana que resulta em sua viscosidade, é relativamente insensível a diferenças na força iônica e pH do meio, sendo estável entre o pH 2 e 12. A proteção da cadeia principal da molécula pelas cadeias laterais resulta na maior estabilidade da goma xantana, em comparação com outros polissacarídeos, quando expostos a ácidos, álcalis e enzimas. A concentração de sal também influencia na viscosidade da goma xantana (SOHNA *et al.*, 2001). Quando uma pequena quantidade de sal é adicionada à solução de goma, ocorre redução da viscosidade, devido à diminuição das forças eletrostáticas intermoleculares. Já quando se adiciona uma grande quantidade de sal, a viscosidade da solução aumenta devido ao aumento da interação entre as moléculas de polímero (ZHANG e CHEN, 2010).

A viscosidade das soluções de goma é somente minimamente afetada por etapas de tratamento térmico (por exemplo, esterilização). A viscosidade da goma xantana diminui quando ocorre um aumento da temperatura até 40 °C. Entre 40 e 60 °C, a viscosidade aumenta com o aumento da temperatura. Enquanto que para temperaturas maiores que 60 °C, a viscosidade diminui à medida que a temperatura é elevada (PALANIRAJ *et al.*, 2011). Este comportamento está associado a alterações nas conformações da molécula de xantana. A conformação muda de uma ordem (baixa temperatura de dissolução) para uma desordem (temperatura de alta dissolução). Na conformação ordenada a cadeia lateral é dobrada em

associação com a cadeia principal, enquanto na desordenada a cadeia lateral não está associada e sim distante da cadeia principal. A estabilidade térmica da xantana contra a hidrólise é muito maior do que a estabilidade de outros polissacarídios ou polímeros solúveis em água (STOKKE e CHRISTENSEN, 1996), possivelmente por causa da estrutura helicoidal ordenada da xantana que protege as moléculas da despolimerização (PSOMAS *et al.*, 2007).

A goma xantana é degradada na presença de agentes oxidantes fortes, como por exemplo, os persulfatos, peróxidos e hipocloritos. Agentes redutores geralmente não afetam sua estabilidade. Metanol, etanol, isopropanol, e acetona não têm efeito sobre soluções aquosas de goma xantana até uma certa concentração, após a qual ocorre precipitação da goma. A xantana é compatível com produtos não-iônicos tensoativos em concentrações até 20% (NASR *et al.*, 2007). A maioria das enzimas comerciais, incluindo  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase, celulasas, pectinases e proteases, não são capazes de degradar a goma xantana (ROTTAVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009).

Uma propriedade importante das soluções de xantana são as interações com plantas galactomananas, como goma de alfarroba e goma de guar. A adição de qualquer um destes galactomananos a uma solução de xantana à temperatura ambiente causa um aumento sinérgico na sua viscosidade, sendo maior que a soma das viscosidades individuais das gomas (SHARMA *et al.*, 2014). Goma xantana exibe grande compatibilidade com a maioria dos espessantes comercialmente disponíveis, incluindo derivados de celulose, amido, pectina, gelatina, dextrina, alginato e carragenina (KUMAR *et al.*, 2018).

Tipicamente as gomas xantana produzidas por diferentes cepas de *Xanthomonas* contêm glicose, manose e ácido glucurônico (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000), sendo que pequenas concentrações de raminose, arabinose, ribose e galactose foram relatadas em estudos feitos por Souza e Vendruscolo (1999) e Silva *et al.* (2001). A composição química da goma xantana é amplamente estudada por se tratar de uma estrutura passível de mudanças seja por diferentes condições operacionais, seja por influência do micro-organismo produtor, que influenciam nas características do biopolímero (ASSIS, 2013). É reconhecido que as concentrações do piruvato e a remoção dos grupos acetil da manose interna da cadeia lateral da molécula de xantana causa mudanças na viscosidade de soluções de xantana em água destilada ou soluções salinas (LECHNER *et al.*, 1996; TORRES *et al.*, 1993), entretanto não existe um consenso sobre o efeito que esses compostos causam nas propriedades reológicas da goma xantana (CASAS *et al.*, 2000; TAKO e NAKAMURA, 1986). Com relação a manose, acredita-se que o aumento da sua concentração na goma, mantêm ou aumenta sua viscosidade, o contrário do que ocorre

com o aumento da concentração de glicose, que é responsável por reduzir a viscosidade das soluções (MOREIRA *et al.*, 2001).

A massa molecular da goma xantana varia de  $2 \times 10^6$  a  $3,0 \times 10^7$  Da, dependendo da associação das cadeias formadas pela agregação de várias cadeias individuais, e da variação nas condições de cultivo. As condições operacionais do cultivo, a composição do meio de cultura e do substrato e as características e mutações genéticas da bactéria *Xanthomonas*, influenciam na massa molecular da goma xantana, sendo biosintetizadas moléculas com massas moleculares médias e com distribuições diferentes (ASSIS, 2013; ROSALAM e ENGLAND, 2006;).

Os teores de ácido pirúvico e acético na goma apresentam relação com a sua massa molecular (CALLET *et al.*, 1987). Variações da massa molecular foram observadas ao se comparar goma xantana livre de piruvato ( $2,3 \times 10^6$  Da) com a xantana livre de acetil e piruvato ( $2,3 \times 10^6$  Da) e a goma xantana nativa ( $5,2 \times 10^6$  Da). A desacetilação não afetou o teor de ácido pirúvico nem a massa molecular da xantana. Embora a influência das condições operacionais na relação estrutura molecular e massa molecular da xantana estejam descritas, não existe consenso entre os resultados obtidos (ASSIS, 2013; CASAS *et al.*, 2000).

As propriedades físicas, reológicas, mecânicas, térmicas e o comportamento da goma durante o processamento dependem também do tamanho médio e da distribuição de comprimentos das cadeias do polímero. Se a estrutura química da goma é a mesma, diferentes valores de massa molecular média e de distribuição de massa molecular vão resultar em diferentes comprimentos das cadeias, que podem alterar as suas propriedades (ASSIS, 2013).

### **3.2.4 Efeito das condições de cultivo sobre a qualidade da xantana**

#### **3.2.4.1 Efeito da fonte de carbono e de nitrogênio**

As cepas de *Xanthomonas* de diferentes espécies, apresentam comportamentos diferentes durante a produção da goma, que pode depender das concentrações e das fontes de carbono e nitrogênio empregadas para seu crescimento. Observa-se que a estrutura da cadeia principal da goma não é influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio empregadas, entretanto, as suas cadeias laterais são afetadas por essas variáveis, e conseqüentemente, formam xantanas com diferentes rendimentos e massas moleculares, que alteram suas propriedades (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011). Glicose e sacarose são as fontes de carbono mais empregadas para produção de xantana pois apresentam boa produtividade, regularidade no fornecimento e boa qualidade do produto. Entretanto, muitos estudos vêm

sendo realizados na tentativa de propor novas fontes de carbono, de menor custo, como os resíduos industriais (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 1992; LETISSE *et al.*, 2001). Muitos estudos foram feitos empregando-se soro de leite (CHARLES e RADJAI, 1977), soro de queijo (SILVA *et al.*, 2009), melão de cana-de-açúcar (KALOGIANNIS *et al.*, 2003), resíduos de polpas de frutas (ACHAYUTHAKAN *et al.*, 2006) e glicerina residual do biodiesel (ASSIS *et al.*, 2014).

De acordo com Souw e Demain (1980), além da fonte de carbono, a sua concentração no meio de cultivo também influencia na produção de xantana, sendo que concentrações muito elevadas inibem o crescimento das *Xanthomonas*. Segundo De Vuyst *et al.* (1987), o valor da relação C/N é o parâmetro que mais influencia na produção da goma, sendo que uma relação C/N relativamente alta, favorece a produção de xantana.

O nitrogênio é um nutriente essencial para produção de xantana, e pode ser fornecido como um composto orgânico ou como uma molécula inorgânica. As fontes de nitrogênio mais empregadas nos meios de cultura para produção de xantana são o nitrato e amônio. De acordo com Palaniraj e Jayaraman (2011), o amônio é um substrato melhor para aumentar o acúmulo da biomassa e favorecer o crescimento das *Xanthomonas*, enquanto que o nitrato favorece maior acúmulo de xantana. De acordo com Pinches e Pallent (1986), a fonte e a quantidade de nitrogênio do meio de cultura também interferem na quantidade e qualidade da goma xantana produzida, sendo um importante parâmetro a ser considerado no cultivo.

#### **3.2.4.2 Efeito da temperatura**

A influência da temperatura na produção de goma xantana tem sido amplamente estudada. A temperatura mais empregada para produção de xantana é 28 °C (BORGES *et al.*, 2008). Entretanto, Psomas *et al.* (2007) observaram que uma maior produção de goma xantana pode ser obtido com a diminuição da temperatura de cultivo de 30 para 25 °C ou aumentando de 30 para 35 °C. Cadmus *et al.* (1978) concluíram que uma temperatura mais alta do cultivo aumenta a produção de xantana, mas reduz seu conteúdo de piruvato e com isso interfere diretamente na sua qualidade. Shu e Yang (1991) concluíram que a melhor temperatura para a produção de xantana depende do meio de produção empregado.

A viscosidade das soluções de goma xantana também diminui com um aumento temperatura devido a alterações de conformação molecular. Esse comportamento é totalmente reversível de 10 a 90 °C (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011). A goma xantana é a única

capaz de manter sua viscosidade durante as mudanças de temperatura em contraste com outros espessantes naturais (GARCÍA-OCHOA e CASAS, 1994).

#### **3.2.4.3 Efeito do pH**

A goma xantana é um polímero carregado, e mudanças no pH levam a mudanças na densidade de carga da goma xantana, o que afetará as associações moleculares entre as próprias moléculas de xantana e entre a xantana e outros ingredientes alimentares (RINAUDO e MORONI, 2009). Geralmente, o pH tem pouco efeito sobre a viscosidade das soluções de goma xantana na faixa de pH utilizada nos alimentos. Uma elevada viscosidade da solução de xantana é mantida na faixa de pH de 1 a 12 (HABIBI e KHOARAVI-DARANI, 2017). De acordo com Tako e Nakamura (1984), em pH igual a 9 ou superior, a goma xantana é gradualmente desacetilada, enquanto que, em pH inferior a 3, a goma xantana perde grupos ácido acetilpirúvico. A goma xantana é solúvel em ácido acético a 5%, ácido sulfúrico a 5%, ácido nítrico a 5% e ácido fosfórico a 25%, e irá hidratar em hidróxido de sódio até 5%. Na presença da maioria dos ácidos orgânicos, a estabilidade das soluções de goma xantana é excelente. No entanto, como todo polissacarídeo, a goma é propensa a sofrer hidrólise ácida com o aumento da temperatura, levando a uma redução da sua viscosidade (HABIBI e KHOARAVI-DARANI, 2017).

As pequenas mudanças na viscosidade da goma que podem ocorrer com as mudanças de pH são completamente reversíveis após a neutralização. Isso indica que as mudanças estão relacionadas à conformação molecular, e não à degradação (HABIBI e KHOARAVI-DARANI, 2017). Grupos carboxílicos de soluções de goma xantana são progressivamente convertidos da forma ionizada para a não ionizada, reduzindo o pH como resultado da repressão da repulsão eletrostática entre as cadeias laterais da goma xantana que reduzem a viscosidade da solução. A re-ionização dos grupos carboxílicos por neutralização permite que a goma xantana retorne à sua primeira forma com a recuperação da sua viscosidade original (AGOUB *et al.*, 2007; RINAUDO e MORONI, 2009).

#### **3.2.4.4 Efeito dos sais**

A presença de sais nas soluções de goma xantana influenciam nas propriedades do biopolímero, principalmente na sua viscosidade. Concentrações de sal superiores a 1-2% (m/v) na água podem diminuir a hidratação da goma xantana e, portanto, é necessário hidratar goma

xantana antes da adição de sal. Depois da hidratação, a goma hidratada tem boa tolerância ao sal e até 20–30% de sal pode ser adicionado sem afetar adversamente a viscosidade (MILAS *et al.*, 1985). O efeito do sal nas aplicações alimentares da goma xantana depende da concentração da goma nos alimentos. Sais monovalentes, como o cloreto de sódio, causam uma ligeira diminuição na viscosidade, devido à redução das interações moleculares resultantes da diminuição das forças eletrostática inter-moleculares (SMITH e PACE, 1982). Em maiores concentrações de goma, a viscosidade aumenta com o aumento da concentração de sal. Este efeito é provavelmente devido a maior interação entre as moléculas do polímero (SMITH e PACE, 1982; MILAS *et al.*, 1985).

Os sais devem ser adicionados à solução de xantana antes do tratamento térmico para maximização da estabilidade e minimização de quaisquer efeitos do tratamento térmico nas propriedades reológicas da goma. As mudanças conformacionais da goma xantana estão relacionadas com a quantidade de sais presentes. Para garantir uma viscosidade satisfatória das soluções de goma xantana, algum tipo de sal deve estar presente (HIGIRO *et al.*, 2007). Na grande maioria das aplicações alimentares, existem sais suficientes presentes, sob a forma de sódio, potássio e/ou cálcio, para aumentar a temperatura de transição da xantana acima das temperaturas usuais de processamento. Isso significa que a viscosidade das soluções de goma xantana é muito estável durante o processamento térmico e pode fornecer suspensão a altas temperaturas. Além disso, geralmente os sais encontrados naturalmente na água são suficientes para gerar esses efeitos positivos nas soluções de goma xantana (MILAS e RINAUDO, 1986; KANO e PETTIT, 1993).

#### **3.2.4.5 Efeito do tipo de cepa de *Xanthomonas* e do tempo de cultivo**

A triagem de microrganismos produtores de polissacarídeos com propriedades funcionais economicamente interessantes e estudos para otimizar os rendimentos e produtividade nos cultivos, representam um desafio constante (BOZA, 2002).

A cepa de *Xanthomonas* é determinante na produção industrial de goma xantana, uma vez que a composição da goma, assim como as suas propriedades e rendimento variam de acordo com a cepa utilizada na sua produção (LI *et al.*, 2016; DEMIRCI *et al.*, 2017).

A influência do patovar de *Xanthomonas* na produção da goma tem sido estudada ao longo dos anos (KAMAL *et al.*, 2003; ROTTAVA *et al.*, 2009; FARHADI *et al.*, 2012; ASSIS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018). Os patovares de *Xanthomonas campestris* são normalmente

mais utilizados para a produção de goma, porém outras espécies são capazes de produzir esse exopolissacarídeo (MIRANDA *et al.*, 2018).

A massa molecular e a concentração de ácido pirúvico da goma xantana, características que são diretamente associadas a principal propriedade desse polissacarídeo, a viscosidade, dependem da cepa de *Xanthomonas* utilizada e também das condições de cultivo e composição do meio (CADMUS *et al.*, 1978; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A produção e qualidade da goma xantana está associada com a grau de virulência da cepa, o que pode ser confirmado ao comparar o exopolissacarídeo produzido por diferentes cepas de *Xanthomonas* isoladas de plantas infectadas (RUDOLPH, 1993). Ao colonizar as plantas, as *Xanthomonas* penetram nos tecidos vegetais do hospedeiro através de aberturas naturais como estômatos, hidatódios e lenticelas ou por ferimentos e produzem o polissacarídeo extracelular nos espaços intercelulares (GOTTWALD e GRAHAM, 1992; GRAHAM *et al.*, 1992, ROTTAVA, 2005). Dessa maneira, a goma permite a sobrevivência dessas bactérias em ambientes hostis, as protegem contra o dessecamento, concentração de minerais e nutrientes, reduzem o contato com moléculas hidrofóbicas ou carregadas e ajudam a sua fixação na superfície do vegetal hospedeiro (BREWIN, 1991; DUNGER *et al.*, 2007; ROTTAVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2017). Assim, é possível afirmar que quanto maior o grau de virulência da cepa com seu hospedeiro, maior a probabilidade de produção de goma xantana com características industriais desejadas.

Com relação a influência do tempo de cultivo na produção de goma xantana, sabe-se que em média, a maior produção de goma xantana depende da estirpe de *Xanthomonas* utilizada e que este pode variar, de forma viável, de 24h-168h do início do processo produtivo (ASSIS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2018; MIRANDA *et al.*, 2018).

### **3.2.5 Cinética da produção de goma xantana**

O estudo cinético do cultivo permite analisar a concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de cultivo. Tais componentes, normalmente estão associados ao micro-organismos, aos produtos do metabolismo e os substratos que compõem o meio de cultivo (HISS, 2001). No caso da produção de goma xantana, normalmente, os estudos descrevem o tempo de crescimento das *Xanthomonas*, o consumo da fonte de carbono e produção de xantana (GARCÍA; OCHOA *et al.*, 2000; ROTTAVA, 2005; ASSIS, 2013).

Os parâmetros cinéticos permitem, então, o dimensionamento de uma instalação produtiva, ficando evidente que sem este conhecimento, torna-se inviável a transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial. A cinética possibilita uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo (pH, temperatura, etc.), por intermédio de variáveis, como: as velocidades de transformação e os fatores de conversão. Afirmar que uma determinada cepa de *Xanthomonas*, por exemplo, é melhor que uma outra, equivale a dizer que o fator de conversão (substrato em produto, por exemplo) é maior no primeiro que no segundo caso (HISS, 2001).

É ainda por meio da avaliação cinética do cultivo que é possível afirmar que a goma xantana é produzida como metabolito secundário e através da dissociação de duas fases distintas: a de crescimento, onde a maior concentração de nitrogênio do meio é requerida para o crescimento celular; e a fase de produção, na qual a concentração de carbono do meio é requerida para acúmulo de produto (NITSCHKE *et al.*, 2001).

Entretanto, é importante destacar que os métodos comumente utilizados para a medida da concentração celular (espectrometria, biomassa seca, unidades formadoras de colônias, volume do sedimento obtido por centrifugação, etc.) representam uma informação muito simples do que ocorre em um fenômeno biológico, uma vez que o micro-organismo promove a transformação dos componentes do meio em produtos, graças às atividades de milhares de enzimas que, por sua vez, são sintetizadas pelo próprio micro-organismo (HISS, 2001).

### 3.2.6 Aplicações

A goma xantana têm sido amplamente utilizada em diversas aplicações (Tabela 1.2), tais como alimentos e embalagens de alimentos, cosméticos, fabricação de tintas, tratamentos de água, indústria de petróleo, produtos de higiene pessoal, recuperação de petróleo, materiais de construção, medicamentos, entre outras, devido a suas propriedades reológicas superiores como a capacidade de formar uma solução altamente viscosa em baixas forças de cisalhamento e alta pseudo-plasticidade (ROSALAM e ENGLAND, 2006). A solução de goma xantana é estável em uma ampla faixa de temperaturas (até 90 °C), concentrações salinas e pH (2–11), são resistentes à degradação mecânica, biodegradáveis e um biomaterial favorável ao meio ambiente. Essas propriedades superiores da xantana resultaram na sua aplicação na área biomédica e demais aplicações industriais (FARIA *et al.*, 2011). A única limitação da goma xantana é a sua taxa de dissolução lenta que pode ser melhorada por alguns meios físicos (SANDFORD *et al.*, 1981).

Tabela 1.2. Aplicações de goma xantana e respectivas funções.

Aplicações	Quantidade (%)	Função	Referência
<i>Alimentos</i>			
Cárneos	0,2-0,5	Aumenta a capacidade de retenção de água e inibe sinérese	Rosalam e England (2006)
Bebidas	0,05–0,20	Melhora textura dos sucos de fruta	Sharma <i>et al.</i> (2006)
Lácteos	0,05–0,20	Inibe a sinérese e estabiliza as emulsões	Rosalam e England (2006)
Alimentos prontos	0,10-0,30	Estabiliza e evita a sinérese	Sharma <i>et al.</i> (2006)
Chocolates	0,30-2,00	Substituição de gorduras e aumenta a viscosidade	Syafiq <i>et al.</i> (2014)
Sopas e molhos	0,05-0,50	Dá boa estabilidade em temperatura elevada; evita a separação	Sharma <i>et al.</i> (2006)
<i>Produtos para higiene pessoal</i>			
Creme dental	0,70-1,00	Facilita o bombeamento e dá firmeza	Rosalam e England (2006)
Crems e loções	0,20-0,50	Estabiliza as emulsões e dá consistência	Rosalam e England (2006)
Shampoos	0,20-0,50	Controla a reologia	Rosalam e England (2006)
<i>Produtos farmacêuticos</i>			
Suspensões e emulsões	0,10-0,50	Fornece estabilidade	Byong (1996)
Comprimidos	1,00-3,00	Retarda a liberação das drogas	Byong (1996)
<i>Aplicações industriais</i>			
Adesivos	0,10-0,30	Controla a reologia e penetração	Flickinger e draw (1999)
Indústria de papel	0,10-0,20	Auxilia na suspensão e controla a reologia	Flickinger e draw (1999)
Produtos químicos agrícolas	0,10-0,30	Suspende ingredientes ativos; gruda na superfície	Flickinger e draw (1999)
Exploração de petróleo	0,10-0,40	Fornece boa estabilidade contra o sal e a temperatura e atua como agente de controle de mobilidade	Katzbauer (1998)
Cerâmica	0,30-0,50	Suspende sólidos de forma eficaz	Flickinger e draw (1999)

Na indústria de alimentos, a goma xantana é amplamente utilizada como agente espessante e estabilizante em alimentos. Nos produtos de panificação, a goma xantana é usada para aumentar ligação de água durante o cozimento, armazenamento e contribui para aumentar a vida de prateleira dos produtos. A goma xantana também pode ser utilizada como substituto do ovo, em particular da clara, sem afetar a aparência e o sabor dos produtos (SHARMA *et al.*, 2006). Em bebidas e em polpas de frutas, a xantana é utilizada como espessante, contribuindo para manutenção da suspensão, resultando em uma melhor aparência e textura. A xantana

contribui também para melhorar a solubilidade em pH baixo, com excelente suspensão de insolúveis e compatibilidade com a maioria dos componentes (PALANIRAJ *et al.*, 2011).

Misturas de goma xantana, carragenina, guar, e galactomananos são excelentes estabilizadores para sorvete, batidos de leite, gelados de água, pudins e outros. Estas misturas econômicas fornecem viscosidade ideal, estabilidade a longo prazo, maior liberação de sabor, proteção ao choque térmico e controle na formação de cristais de gelo (SHARMA *et al.*, 2006; ROSALAM e ENGLAND, 2006). Baixos níveis de goma xantana proporcionam alta viscosidade em molhos. A viscosidade também é extremamente estável a mudança de temperatura e é mantida sob uma variedade de condições de armazenamento a longo prazo (PALANIRAJ *et al.*, 2011).

Além da indústria de alimentos, xantana tem amplas aplicações na indústria química. Uma mistura de xantana e goma de alfarroba pode ser usado em géis desodorantes. A capacidade de xantana para transmitir a dispersão desejada, estabilidade em repouso, e baixa viscosidade sob aplicação é usada para obter uma consistência correta nos cremes dentais. Na indústria do petróleo, a goma xantana é utilizada na perfuração de petróleo e limpeza de oleodutos. Devido a sua excelente compatibilidade com sal e resistência à degradação térmica, também é útil como aditivo em fluidos de perfuração (KATZBAUER, 1998). Na indústria agrícola, a goma xantana tem sido usado para melhorar a capacidade de fluxo em formulações de fungicidas, herbicidas e inseticidas suspendendo uniformemente o componente sólido, além de ajudar no controle da pulverização e a aderência, que aumentam o tempo de contato entre o pesticida e a cultura (FLICKINGER e DRAW, 1999).

As propriedades pseudoplásticas da goma xantana fornecem excelente texturização em revestimentos de tetos e tintas com alto teor de sólidos, garantindo estabilidade, facilidade de aplicação na parede e retenção do acabamento da textura. A goma xantana também é utilizada como auxiliar de suspensão ou estabilizador na fabricação de papel e papelão, especialmente para contato com alimentos (PALANIRAJ *et al.*, 2011).

Recentemente, a goma xantana atraiu uma grande atenção como biomaterial para preparação de tecidos (matriz extracelular). É bem conhecido que, para uma regeneração adequada dos tecidos danificados, o suporte de tecido baseado em goma xantana deve ter microambiente 3D proporcionando boa interação célula-matriz com superfície química, nanotopologia e rigidez apropriada (MURPHY *et al.*, 2014).

### 3.3 REFERÊNCIAS

ABEL, K.; DESCHMERTZING, H.; PETERSON, J.I. Classification of Microorganisms by Analysis of Chemical Composition. I. Feasibility of Utilizing Gas Chromatography. **Journal of Bacteriology**, v. 85, p. 1039-44, 1963.

ACHAYUTHAKAN, P.; SUPHANTHARIKA, M.; RAO, M.A. Yield stress components of waxy corn starch-xanthan mixtures: effect of xanthan concentration and different starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 469-478, 2006.

AGOUB, A.; SMITH, A.M.; GIANNOULI, P.; RICHARDSON, R.; MORRIS, E. "Melt-in-the-mouth" gels from mixtures of xanthan and konjac glucomannan under acidic conditions: a rheological and calorimetric study of the mechanism of synergistic gelation. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, p. 713-724, 2007.

ASSIS, D.J. **Influência da aeração e agitação nas propriedades de gomas xantanas produzidas por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 com glicerina residual do biodiesel: otimização e cinética do bioprocesso.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, 2013.

ASSIS, D.J.; BRANDAO, L.V.; COSTA, L.A.S.; FIGUEIREDO, T.V.B; SOUSA, L.S.; PADILHA, F.F; DRUZIAN, J.I. A Study of the Effects of Aeration and Agitation on the Properties and Production of Xanthan Gum from Crude Glycerin Derived from Biodiesel Using the Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology (Online)**, v. 172, p. 2769-2785, 2014.

AZEVEDO, A.F.; DUTRA, J.L.L.; SANTOS, M.L.B.; SANTOS, D.A. Fatty acid profiles in *Leishmania* spp. isolates with natural resistance to nitric oxide and trivalent antimony. **Parasitology Research**, v. 113, p. 19-27, 2014.

BORGES, C.D.; MOREIRA, A.D.; VENDRUSCOLO, C.T.; AYUB, M.A.Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris pv pruni* strain 101. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 40, p. 81-85, 2008.

BOZA, Y.E.A.G. **Encapsulamento *Beijerinckia* sp utilizando spray-drier.** Tese de doutorado. Departamento de Ciência de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas-SP, 2002.

BREWING, N.J. Development of the legume root nodule. **Annual Review Cell Biology**. v.7. p.191-226, 1991.

BYONG, H.L. Fundamentals of Food Biotechnology. **VCH Publishers Inc.**, United States, 1996.

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

CALLET, F.; MILAS, M.; RINAUDO, M. Influence of acetyl and pyruvate contents on rheological properties of xanthan in dilute solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 9, n. 5, p. 291-293, 1987.

CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 282–291, 2000.

CHARLES, M.; RADJAI, M.K. Xanthan Gum from Acid Whey. **Dlm**, Sandford, 1977.

CHI, Z.; ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, 206-211, 2003.

DE VUYST, L.; VAN LOO, J.; VANFAMME, E.J. Two-step fermentation process for improved xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 263–273, 1987.

DEMIRCI, A.S.; PALABIYIK, I.; ALTAN, D.D.; APAYDIN, D.; GUMUS, T. Yield and rheological properties of exopolysaccharide from a local isolate: *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 18-23, 2017.

DUNGER, G.; RELING, V.M.; TONDO, M.L.; BARRERAS, M.; IELPI, L.; ORELLANO, E.G.; OTTADO, J. Xanthan is not essential for pathogenicity in citrus canker but contributes to *Xanthomonas* epiphytic survival. **Archives of Microbiology**. v.188, p.127–135. 2007.

FARHADI, G.B.; KHOSRAVI-DARANI, K.; NASERNEJAD, B. Enhancement of xanthan production on date extract using response surface methodology. **Asian Journal Chemistry**, v. 24, p. 129-133, 2012.

FARIA, S.; PETKOWICZ, C.L.O.; MORAIS, S.A.L.; TERRONES, M.G.H.; RESENDE, M.M.; FRANÇA, F.P. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 469–476, 2011.

FLICKINGER, F.C., DRAW, S.W. Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. **Wiley**, New York, p. 2706–2707, 1999.

FLORES-CANDIA, J.L.F.; DECKWER, W.D. Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 446-452, 1999.

GALINDO, E.; ALBITER, V. High-yield recovery of xanthan by precipitation with isopropyl alcohol in a stirred tank. **Biotechnology Progress**, v. 12, p. 540–547, 1996.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.; FRITSCH, A. Nutritional study of *Xanthomonas campestris* in xanthan gum production by factorial design of experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 991–996, 1992.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASAS, J.A.; MOHEDANO, A.F. Precipitation of xanthan gum. **Separation Science and Technology**, v. 28, p. 1303–1313, 1993.

GARCÍA-OCHOA, F., CASAS, J. Apparent yield stress in xanthan gum solutions at low concentrations. **The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering**, v. 53, p. 41–46, 1994.

- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GOMEZ, E. Xanthan gum: Production, Recovery, and Properties. **Biotechnology Advanced**, v. 18, p. 549-579, 2000.
- GHASHGHAEI, T.; SOUDI, M.R.; HOSEINKHANI, S. Optimization of xanthan gum production from grape juice concentrate using Plackett-Burman design and response surface methodology. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, p. 15–23, 2016.
- GOTTWALD, T.R.; GRAHAM, J.H. A device for precise and nondisruptive stomatal inoculation of leaf tissue with bacterial pathogens. **Phytopathology**, v. 82, p. 930-935, 1992.
- GRAHAM, L.A.; PHILLIUS, J.D.; TRUMUOWER, B.L. Deletion of subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bCl complex specifically impairs electron transfer at the ubiquinol oxidase site (center P) in the bCl complex. **FEBS Letter Chemistry**, v. 313, p. 251-254, 1992.
- GUCKERT, B.; HOOD, M.A.; WHITE, D.C. Phospholipid, ester-linked fatty acid profile changes in nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increase in the trans/cis ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, p. 794–801, 1986.
- GUMUS, T.; DEMIRCI, A.S.; MIRIK, M.; ARICI, M.; AYSAN, Y. Xanthan gum production of *Xanthomonas* spp. isolated from different plants. **Food Science Biotechnology**, v. 19, p. 201–206, 2010.
- GUO, A.; LIU, T.; XIE, J.; WANG, H. Tracing the food sources of isolated strains of *Listeria monocytogenes* through fatty acid profiles analysis. **Food Control**, v. 21, p. 1092–1098, 2010.
- HABIBI, H.; KHOSRAVI-DARANI, K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 130–140, 2017.
- HE Y. W.; ZHANG L. H. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, p. 842-857, 2008.
- HIGIRO, J.; HERALD, T.; ALAVI, S.; BEAN, S. Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution: effect of salt. **Food Research International**, v. 40, p. 435–447, 2007.
- 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 Blucher LTDA., 2001.
- KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A.; SKARACIS, G.N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 249-256, 2003.
- KAMAL, F.; MEHRGAN, H.; ASSADI, M.M.; MORTAZAVI, S.A. Mutagenesis of *Xanthomonas campestris* and selection of strains with enhanced xanthan production. **Iranian Biomedical Journal**, v. 3, p. 91-98, 2003.

KANEDA, T. Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance. **Microbiological Reviews**, v. 6, p. 288-302, 1991.

KANO, K.; PETTITT, D. Xanthan, gellan, welan, and rhamosan. In: Whistler, R.L., Bemiller, J.N. (Eds.), *Industrial Gums: Polysaccharides and Their Derivatives*. **Academic press**, San Diego, California, pp. 341–398, 1993.

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

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

KERDSUP, P.; TANTRATIAN, S.; SANGUANDEEKUL, R.; IMJONGJIRAK, C. Xanthan production by mutant strain of *Xanthomonas campestris* TISTR 840 in raw cassava starch medium. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 1459-1462, 2009.

KÖPLIN, R.; ARNOLD, W.; HÖTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G.E.; PÜHLER, A. Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 191-199, 1992.

KUMAR, A.; RAO, K.M.; HAN, S.S. Application of xanthan gum as polysaccharide in tissue engineering: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 180, p. 128–144, 2018.

KUPPUSWAMI, G.M. Production of Xanthan Gum. Central Leather Research Institute, **Adyar**, India, 2014.

LECHEVALIER, M.P. Lipids in bacterial taxonomy-a taxonomist's view. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 5, p. 109-210, 1977.

LECHNER, M. D.; GEHRKE, K.; NORDMEIER, E. Makromolekulare chemie. **Birkhäuser**, Berlin, p. 532, 1996.

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

LEGENDRE, S.; LETEILIER, L.; SHECTER, E. Influence of lipids with branched-chain fatty acids on the physical, morphological and functional properties of *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 602, p. 491-505, 1980.

LETISSE, F.; CHEVALLREAU, 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. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 417–422, 2001.

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

- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., V.3, p. 125-154, 2001.
- MARGARITIS, A.; ZAJIC, J.E. Mixing, mass transfer, and scale-up of polysaccharide fermentations. ***Biotechnology and Bioengineering***, v. 20, p. 939–1001, 1978.
- MILAS, M.; RINAUDO, M. Conformational investigation on the bacterial polysaccharide xanthan. ***Carbohydrate Research***, v. 76, p. 189–196, 1979.
- MILAS, M.; RINAUDO, M., TINLAND, B. The viscosity dependence on concentration, molecular weight and shear rate of xanthan solutions. ***Polymer Bulletin***, v. 14, p. 157–164, 1985.
- MILAS, M.; RINAUDO, M. Properties of xanthan gum in aqueous solutions: role of the conformational transition. ***Carbohydrate Research***, v. 158, p. 191–204, 1986.
- MILLER, L.T. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 23, p. 16584-586, 1982.
- MIRANDA, A.L.; COSTA, S.S.; ASSIS, D.J.; BOMFIM, B.A.; SOUZA, C.O.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; GUIMARÃES, A.G.; DRUZIAN, J.I. Investigation of cellular fatty acid composition of *Xanthomonas* spp. as chemical markers of productivity and quality of xanthan gum. ***Carbohydrate Polymers***, v. 192, p. 291-298, 2018.
- MOHANTY, B.P.; BHATTACHARJEE, S.; PARIA, P.; MAHANTY, A.; SHARMA, A.P. Lipids biomarkers of lens aging. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, v. 169, p. 192–200, 2012.
- MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. ***Food Hydrocolloids***, v. 15, p. 469-474, 2001.
- MURPHY, W.L.; MCDEVITT, T.C.; ENGLER, A.J. Materials as stem cell regulators. ***Nature Materials***, v. 13, p. 547–557, 2014.
- NASR, S.; SOUDI, M.R.; HAGHIGHI, M. Xanthan production by a native strain of *Xanthomonas campestris* and evaluation of application in EOR. ***Pakistan Journal of Biological Sciences***, v. 10, p. 3010–3013, 2007.
- 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***, v. 21, p. 82-85, 2001.
- O'LEARY, W.M.; WILKINSON, S.G. Gram-positive bacteria, p. 117-201. In C. Ratledge and S. G. Wilkinson (ed.), *Microbial lipids*, vol. 1. **Academic Press, Inc.**, New York, 1988.
- PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S.K.; BATSILAS, L.; PARAS, S.V.; KYRIAKIDIS, D.A.; LIAKOPOULOUKYRIAKIDES, M. Xanthan production by *X. campestris* in batch cultures. ***Process Biochemistry***, v. 37, p. 73-80, 2001.

- PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V.; HARIRAM, S.B. Influence of nitrogen sources and agitation in xanthan gum production by *Xanthomonas campestris*. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 2, p. 305–309, 2011.
- PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 1–12, 2011.
- PINCHES, A.; PALLENT, L.J. Rate and yield relationships in the production of xanthan gum by batch fermentations using complex and chemically defined growth media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 1484–1496, 1986.
- PIOTROWSKA-SEGET, Z.; MROSZIK, A. Signature lipid biomarker (slb) analysis in determining changes in community of soil microorganisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 12, p. 669–675, 2003.
- PSOMAS, S.K.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A. Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 273–280, 2007.
- QIAN, W.; JIA, Y.; REN, S.X.; HE, Y.Q.; FENG, J.X.; LU, L.F.; SUN, Q.; YING, G.; TANG, D.J.; TANG, H.; WU, W.; HAO, P.; WANG, L.; JIANG, B.L.; ZENG, S.; GU, W.Y.; LU, G.; RONG, L.; TIAN, Y.; YAO, Z.; FU, G.; CHEN, B.; FANG, R.; QIANG, B.; CHEN, Z.; ZHAO, G.P.; TANG, J.L.; HE, C. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome Research**, v. 15, p. 757–767, 2005.
- RINAUDO, M.; MORONI, A. Rheological behavior of binary and ternary mixtures of polysaccharides in aqueous medium. **Food Hydrocolloid**, v. 23, p. 1720–1728, 2009.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 197–207, 2006.
- ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp. para produção de goma xantana**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus Erechim, 2005.
- ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M.F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R.L.; LUCCIO, M.D.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp.. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 65–71, 2009.
- RUDOLPH, K. Infection of the plant by *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 193–245, 1993.
- SANDFORD, P.A.; BAIRD, J.; COTTRELL, I.W. Xanthan gum with improved dispersibility. **ACS Symposium Series**, v. 150, p. 31–41, 1981.
- SHARMA, B., NARESH, L., DHULDHOYA, N., MERCHANT, S., MERCHANT, U. Xanthan gum - A boon to food industry. *Food Promot Chronic*. v. 1, p. 27–30, 2006.

- SHARMA, A.; GAUTAM, S.; WADHAWAN, S. *Xanthomonas*. **Bhabha Atomic Research Centre**, Mumbai, India, 2014.
- SHU, C.H.; YANG, S.T. Kinetics and modeling of temperature effects on batch xanthan gum fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 567–574, 1991.
- SILVA F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidious gum: The *Xilella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 203, p. 165-171, 2001.
- SILVA, M.F.; FORNARI, R.C.G.; MAZUTTI, M.A.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; CICHOSKI, A.J.; CANSIAN, R.L.; LUCCIO, M.D.; TREICHEL, H. Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 90, p. 119–123, 2009.
- SILVA, G.S.; ASSIS, D.J.; DRUZIAN, J.I.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; RIBEIRO, O.L.L.; CORDEIRO, S.M. Impact of Preservation Conditions on Fatty Acids, Xanthan Gum Production and Other Characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, p. 351–358, 2017.
- SILVA, J.A.; CARDOSO, L.G.; ASSIS, D.J.; GOMES, G.V.P.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; SOUZA, C.O.; DRUZIAN, J.I. Xanthan Gum Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IBSBF 1866 and 1867 from Lignocellulosic Agroindustrial Wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, p. 750-763, 2018.
- SMITH, J.H.; PACE, G.W. Recovery of microbial polysaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 32, p. 119–129, 1982.
- SOHNA, J.I.; KIMB, C.A.; CHOI, H.J.; JHON, M.S. Drag-reduction effectiveness of xanthan gum in a rotating disk apparatus. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, p. 61–68, 2001.
- SOUW, P.; DEMAÏN, A.L. Role of citrate in xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation Technology**, v. 58, p. 411–416, 1980.
- SOUZA, A.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 115-123, 1999.
- STOKKE, B.T.; CHRISTENSEN, B.E. Release of disordered xanthan oligomers upon partial acid hydrolysis of double-stranded xanthan. **Food Hydrocolloids**, v. 10, p. 83–89, 1996.
- SURESH, S.; PRASAD, M.S. Technological application of an extracellular cell lytic enzyme in xanthan gum clarification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 57–62, 2005.
- SUTHERLAND, I.W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.
- SYAFIQ, A., AMIR, I., SHARON, W. Mixture experiment on rheological properties of dark chocolate as influenced by cocoa butter substitution with xanthan gum/corn starch/glycerin blends. **International Food Research Journal**. v. 21, p. 1887–1892, 2014.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. **Agricultural Biology Chemical**, v. 48, p. 2987-2993, 1984.

TAKO, M.; NAKAMURA, S. D-Mannose-specific interaction between xanthan and D-galacto-D-mannan. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 204, p. 33-36, 1986.

TORRES, L.G.; BRITO, E.; GALINDO, E.; CHOPLIN, L. Viscous behavior of xanthan solutions from a variant strain of *Xanthomonas campestris*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 1, p. 58-64, 1993.

TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; BALDERAS-LUNA, L.; BRITO, E.; LENCKI, R.W. The use of membrane-assisted precipitation for the concentration of xanthan gum. **Journal of Membrane Science**, v. 294, p. 84-92, 2007.

VAUTERIN, L.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 1677-1687, 1991.

VAUTERIN, L.; YANG, P.; SWINGS, J. Utilization of Fatty Acid Methyl Esters for the Differentiation of New *Xanthomonas* Species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 1, p. 298-304, 1996

YANG, P.; VAUTERIN, L.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; KERSTERS, K. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 80, p. 1647-71, 1993.

YANG, C.; GUO, Z.B.; DU, Z.M.; YANG, H.Y. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter calcoaceticus*. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 25, p. 711-717, 2012.

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

## 4 CAPÍTULO II

### INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE *Xanthomonas* spp. COMO MARCADOR QUÍMICO DE PRODUÇÃO E QUALIDADE DA GOMA XANTANA

Artigo publicado em 2018

Revista: Carbohydrate Polymers

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.03.078>

#### 4.1 RESUMO

Neste estudo, investigamos os perfis de ácidos graxos celulares de diferentes patovares de *Xanthomonas* que produzem goma xantana e exploramos a composição de ácidos graxos para identificar marcadores químicos de produção e qualidade de xantana. Três patovares de *Xanthomonas* foram estudados. O cultivo foi conduzido por 168h. Amostras do meio foram coletadas para extração, quantificação e caracterização da xantana. A relação de ácidos graxos insaturados / saturados (I/S) nas células de *Xanthomonas* durante o cultivo foi correlacionada com a produção, viscosidade e massa molecular da goma obtida a cada 24h. A cepa *Xanthomonas axonopodis* pv *manihotis* 290 apresentou maior relação I/S para os ácidos graxos celulares majoritários (C16: 1n7 / C16: 0) em relação às outras duas cepas e esta alta proporção estava diretamente associada à produção de xantana. Não foi observada correlação entre a composição do ácido graxo celular e as características da xantana sintetizada. Assim, foi possível determinar um marcador químico de produção de goma xantana em cepas de *Xanthomonas*.

**Palavras-chave:** Viscosidade; FAME; Ácidos graxos insaturados; *X. campestris*; *X. axonopodis*.

#### 4.2 INTRODUÇÃO

A goma xantana é um polissacarídeo natural produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*, considerado um importante biopolímero industrial (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). É utilizado em alimentos, na indústria farmacêutica, em produtos para cuidados pessoais, produtos agrícolas e na indústria do petróleo como agente espessante, estabilizante e

emulsificante, bem como aditivo em fluidos de perfuração (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011; ROSALAM e ENGLAND, 2006).

A goma xantana está envolvida em várias funções nas *Xanthomonas*, incluindo adesão, interações célula-célula e proteção contra condições ambientais extremas (KUMAR *et al.*, 2007). *Xanthomonas* é um gênero da família *Pseudomonaceae* e todos os organismos deste gênero são patógenos de plantas. Células de *Xanthomonas* são bastões retos simples, móveis, gram-negativos e possuem um único flagelo polar (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Diferentes patovares de *Xanthomonas* são responsáveis pela produção de várias gomas xantana, que podem diferir nas propriedades, como viscosidade e estabilidade. Atualmente, o conhecimento sobre o comportamento das cepas ainda precisa ser determinado. É importante avaliar se o material polimérico sintetizado apresenta valor agregado e se pode ser usado para aplicações específicas (CAI *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2017).

Ácidos graxos e triglicérides celulares podem ser usados como biomarcadores para vários grupos taxonômicos. Além disso, alguns ácidos graxos exibem funções típicas com certos grupos funcionais adicionais, que podem ser explorados para o monitoramento de populações microbianas específicas (FERNANDES e CHAER, 2010).

A análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular pode revelar informações relevantes sobre as propriedades celulares dos micro-organismos, uma vez que a composição dos ácidos graxos das membranas citoplasmáticas de todos os micro-organismos é única para cada espécie (CAMPBELL e CRONAN, 2001). Além disso, a membrana celular é importante para os micro-organismos resistirem as condições ambientais adversas. Quando o ambiente extracelular sofre alterações, vários mecanismos de defesa e respostas metabólicas adaptativas acontecem. Um exemplo é o controle da fluidez via alteração da composição de ácidos graxos, especialmente da proporção de ácidos graxos insaturados (DENICH *et al.*, 2003; HARTIG *et al.*, 2005). Algumas bactérias ainda têm a capacidade de modular os lipídios de membrana para manter a fluidez e as funções de transporte em resposta a várias condições de estresse, como durante a produção e a secreção de exopolissacarídeos a partir da membrana (KANEDA, 1991).

Para examinar a produção e as propriedades diferenciadas da goma xantana sob as mesmas condições de cultivo, estudamos as mudanças no perfil de ácidos graxos da membrana celular de *Xanthomonas* durante o cultivo. Isso nos permitirá identificar marcadores químicos eficientes e, conseqüentemente, reduzir o tempo e o custo da produção de xantana (CAI *et al.*, 2017).

O objetivo desta pesquisa foi produzir goma xantana de diferentes patovares para determinar o perfil de ácidos graxos da membrana celular de *Xanthomonas* e correlacioná-lo com a produção e propriedades do biopolímero visando definir possíveis marcadores químicos de produção e qualidade das gomas xantanas.

## 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.3.1 Micro-organismos e preparação do inóculo

A selecção das cepas foi baseada na escolha de três patovares distintos que fornecerão uma generalização dos dados obtidos para seleccionar marcadores químicos que possam ser aplicados a qualquer cepa de *Xanthomonas*. Consequentemente, as cepas *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290, *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 foram estudadas para determinar o perfil de ácidos graxos da membrana celular durante o cultivo. As cepas foram obtidas da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto de Biologia, Campinas, SP, Brasil, na forma liofilizada. As culturas liofilizadas foram cultivadas em caldo de extrato de levedura (YM) (Acumedia<sup>®</sup>), contendo gelatina de digestão enzimática (5,0 g L<sup>-1</sup>), extrato de malte (3,0 g L<sup>-1</sup>), dextrose (10,0 g L<sup>-1</sup>) e extrato de levedura (3,0 g L<sup>-1</sup>), por 48h a 28 °C, e foram conservadas em glicerol (20,0 % v v<sup>-1</sup>) a -80 °C.

Cada experimento foi iniciado reativando primeiro a linhagem congelada em ágar YM (Acumedia<sup>®</sup>) contendo gelatina de digestão enzimática (5,0 g L<sup>-1</sup>), extrato de malte (3,0 g L<sup>-1</sup>), dextrose (10,0 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (3,0 g L<sup>-1</sup>) e ágar (20,0 g L<sup>-1</sup>); a cepa foi incubada por 48h a 28 °C. O inóculo foi preparado em caldo YM, e cada cepa foi incubada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo YM. Os frascos inoculados foram incubados a 28 ± 2 °C por 24h em agitador orbital (Tecnal, TE-424) a 180 rpm (ASSIS *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016).

### 4.3.2 Concentração celular e produção de goma xantana

O cultivo foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250 mL, cada um contendo 80 mL de meio. Os frascos foram inoculados com 16 mL de inóculo (20,0 % v v<sup>-1</sup>) e mantidos em incubadora orbital a 28 ± 2 °C e 250 rpm por até 168h (ASSIS *et al.*, 2014). O meio foi composto por uréia (0,01 % m v<sup>-1</sup>), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1 % m v<sup>-1</sup>) e glicose (2,0 % m v<sup>-1</sup>). Amostras do meio

foram coletadas a cada intervalo de 24h para extração, quantificação e purificação da goma xantana.

A cada período de cultivo, o meio foi centrifugado a 12.000 rpm por 30min a 4 °C (HITACHI, CR-GIII) para precipitação celular. As células foram então lavadas com solução de NaCl a 0,85 % e re-centrifugadas. Este processo foi repetido duas vezes, após esse período as células foram secas em estufa (Tecnal, TE 394/2) a  $30 \pm 2$  °C durante 24 horas e pesadas. A concentração celular foi medida gravimetricamente e foi expressa em  $\text{g L}^{-1}$ .

Ao sobrenadante foi então adicionado etanol (96 °GL) em uma proporção de 1: 3 (v v<sup>1</sup>) para a precipitação de goma xantana. A suspensão foi agitada e recolhida. A goma xantana foi seca em estufa (Tecnal TE, 394/2) a  $30 \pm 2$  °C por 48h. A produção de xantana por litro de meio foi medida gravimetricamente e expressa em  $\text{g L}^{-1}$  (ASSIS *et al.*, 2014; DEMIRCI *et al.*, 2017).

#### 4.3.3 Purificação da goma xantana

Soluções aquosas de goma xantana foram dialisadas (membranas de 12.000 Da) contra água purificada a 100 rpm e 25 °C durante 72h num agitador orbital (Tecnal, TE-424). As soluções foram liofilizadas (LIOBRAS L108) por 48h e armazenadas em frascos herméticos (ASSIS *et al.*, 2014).

#### 4.3.4 Composição de ácidos graxos das cepas de *Xanthomonas*

Os ácidos graxos celulares foram extraídos (30 mg de célula) e transformados em metil ésteres de ácidos graxos (FAMES) usando o protocolo Sherlock MIS, com algumas modificações. Resumidamente, foram realizados os seguintes passos: (i) saponificação a 100 °C durante 30 min com adição de 1 mL de NaOH 3,75 M em 50,0 % de metanol; (ii) metilação dos ácidos graxos liberados a 100 °C com 2 mL de BF<sub>3</sub> a 12,0 % durante 10 min; (iii) extração dos FAMES em 1,25 mL de isoctano; e (iv) lavagem do extrato orgânico com 3 mL de NaOH a 1,2 % (m v<sup>-1</sup>) (SILVA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2012).

Os FAMES foram separados usando um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de ionização de chama (Perkin Elmer, Clarus<sup>®</sup> 680) e um detector de espectrometria de massas (Perkin Elmer, Clarus 500) usando uma coluna DB-FFAP capilar (30 m × 0,32 mm × 0,25 mm) a uma temperatura inicial de 150 °C (16 min). A temperatura foi então aumentada para 180 °C a uma taxa de 2 °C min<sup>-1</sup>; esta foi mantida por 25 min antes de ser aumentada para 210 °C

(10min) a uma taxa de 5 °C min<sup>-1</sup>. A retenção isotérmica final foi a 230 °C (16 min); a temperatura foi aumentada a uma taxa de 10 °C min<sup>-1</sup>. Os parâmetros cromatográficos foram os seguintes: temperatura do injetor, 250 °C; razão de divisão de 1:100; vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> para He, 30 mL min<sup>-1</sup> para H<sub>2</sub> e 300 mL min<sup>-1</sup> de ar para DIC; e volume de injeção, 1µL. Após cada 24h de cultivo, os FAMES foram identificados comparando os tempos de retenção (TR) com o padrão BAME 47080-U (Supelco) da mistura bacteriana de éster de ácido graxo e foram confirmados por análise CG-EM. Os principais FAMES foram quantificados pela normalização das áreas cromatográficas, e os resultados foram expressos em porcentagem relativa de área (SILVA *et al.*, 2017).

A célula seca obtida após cada 24h de cultivo foi analisada quanto ao perfil de ácidos graxos da membrana celular para determinar a correlação entre o perfil de ácidos graxos de cada cepa de *Xanthomonas* e a produção e propriedades das respectivas gomas xantana biossintetizadas.

#### 4.3.5 Viscosidade aparente da goma xantana

A viscosidade aparente das amostras foi determinada com soluções de goma xantana (0,5 % m v<sup>-1</sup>) preparadas com água destilada. As soluções foram agitadas durante 10 min para completar a dissolução e foi então mantida a 10 °C durante 12h antes do ensaio. As viscosidades aparentes foram medidas em um reômetro de cilindro concêntrico (Haake Rheotest, 2.1) com uma taxa de cisalhamento de 25-1000 s<sup>-1</sup>. Os dados reológicos foram ajustados ao modelo de Ostwald-de Waele (Eq. (1)),

$$\mu = K \times \gamma^{(n-1)} \quad (1)$$

onde  $\mu$  é a viscosidade aparente, K é o índice de consistência,  $\gamma$  é a taxa de cisalhamento e n é o índice de comportamento do fluxo (ASSIS *et al.*, 2014, SILVA *et al.*, 2017).

#### 4.3.6 Massa molecular da goma xantana

A massa molecular da goma xantana foi estimada por cromatografia de exclusão molecular (sistemas GPC CLAE, PerkinElmer, Series 200) com colunas Shodex OHpak SB 803, 804, 805 e 806 em série; água purificada foi usada como eluente com uma vazão de 1mL min<sup>-1</sup>. Um detector de índice de refração (IR) (PerkinElmer, Série 200) foi usado. A coluna foi calibrada com padrões de dextrana (102.000; 207.200; 431.800; 655.200; 759.400; 1.360.000; 2.025.000; 2.800.000; 3.450.000; e 5.900.000 Da) (American Polymer Patterns). Alíquotas do

padrão de dextrana (40  $\mu\text{L}$ , 0,3 %  $\text{m v}^{-1}$ ) e solução aquosa de goma xantana foram injetadas. A massa molecular da goma xantana foi calculada utilizando a curva de calibração relacionando o log da massa molecular (massa molecular do padrão de dextrana) *versus* tempo de retenção (TR) (ASSIS *et al.*, 2014).

#### 4.3.7 Análise dos dados

Os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) foram calculados para determinar a correlação entre a proporção de ácidos graxos insaturados / saturados (I/S) das células *Xanthomonas* durante o cultivo, e a produção, viscosidade e massa molecular da goma obtida em cada ponto de tempo. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o programa ASSISTAT (2011), versão 7.7 beta. A estatística descritiva, a análise de cluster e a análise de componentes principais (ACP) foram realizadas utilizando o software estatístico e o pacote de análise de dados do STATISTICA 7.0. A diferença percentual foi usada como a medida de similaridade, e o método de Ward foi usado como a regra de ligação (XU *et al.*, 2016).

## 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.4.1 Composição de ácidos graxos das cepas de *Xanthomonas*

As cepas 290, 645 e 1155 mostraram perfis qualitativos de ácidos graxos celulares semelhantes durante as 168 horas de cultivo. A porcentagem média de ácidos graxos celulares em cada cepa é apresentada na Tabela 2.1. Identificamos aproximadamente 16 ácidos graxos celulares com base no padrão BAME, que variou entre os diferentes patovares (Tabela 2.1). Os ácidos graxos majoritários da cepa 290 foram i-C15: 0,  $\alpha$ -C15: 0, C16: 0, C16: 1n7, C18: 1n9c e C18: 2n6c. Os ácidos graxos identificados na cepa 290 estavam presentes em maiores porcentagens também na linhagem 645, com exceção do C18: 1n9c, que não foi detectado em altos percentuais. A cepa 1155 também exibiu os mesmos ácidos graxos majoritários que a cepa 645, com exceção de C18: 2n6c, que não foi detectado. Esses ácidos graxos celulares foram responsáveis por aproximadamente 70,0% do total de ácidos graxos identificados, semelhante aos resultados anteriormente relatados por Silva *et al.* (2017) para *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 2103. Esses resultados de ácidos graxos também foram consistentes com os relatados para *Xanthomonas* (SILVA *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2012) e observou-se que os ácidos graxos de cadeia linear, iso- e anteiso-ramificada, hidroxila, monoinsaturada e ciclopropano foram os ácidos graxos mais comuns, variando de 14 a 20 carbonos na cadeia.

Tabela 2.1. Composição de metil ésteres de ácidos graxos de células de *Xanthomonas* durante cultivo.

Ácidos graxos	Concentração (%)						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
<i>Xanthomonas axonopodi</i> pv. <i>manihotis</i> 290							
C14:0	5,93 ± 0,40 <sup>a</sup>	3,12 ± 0,20 <sup>b</sup>	10,26 ± 0,10 <sup>c</sup>	7,62 ± 0,60 <sup>d,e</sup>	6,64 ± 0,40 <sup>a,d</sup>	8,26 ± 0,20 <sup>e</sup>	6,83 ± 0,30 <sup>d</sup>
i-C15:0	16,14 ± 0,80 <sup>a</sup>	8,05 ± 0,90 <sup>b</sup>	12,04 ± 0,31 <sup>c</sup>	4,06 ± 0,21 <sup>d</sup>	4,61 ± 0,20 <sup>e</sup>	14,72 ± 0,30 <sup>f</sup>	15,40 ± 0,12 <sup>a</sup>
a-C15:0	1,61 ± 0,30 <sup>a</sup>	5,38 ± 0,70 <sup>b</sup>	4,36 ± 0,31 <sup>c</sup>	3,24 ± 0,10 <sup>d</sup>	3,57 ± 0,53 <sup>d</sup>	12,17 ± 0,72 <sup>e</sup>	13,57 ± 0,50 <sup>f</sup>
C15:0	2,37 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,19 ± 0,71 <sup>a,b</sup>	2,19 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,63 ± 0,31 <sup>b,d</sup>	3,23 ± 0,15 <sup>c</sup>	2,18 ± 0,50 <sup>a,b</sup>	1,16 ± 0,20 <sup>d</sup>
i-C16:0	1,18 ± 0,12 <sup>a</sup>	3,99 ± 0,60 <sup>b,c,d</sup>	3,63 ± 0,22 <sup>b</sup>	2,69 ± 0,70 <sup>c</sup>	2,76 ± 0,44 <sup>c</sup>	4,43 ± 0,30 <sup>d</sup>	1,31 ± 0,21 <sup>a</sup>
C16:0	27,76 ± 1,21 <sup>a</sup>	17,48 ± 1,02 <sup>b</sup>	19,81 ± 0,40 <sup>c</sup>	14,72 ± 0,22 <sup>d</sup>	27,80 ± 0,73 <sup>a</sup>	19,04 ± 0,01 <sup>e</sup>	18,84 ± 0,32 <sup>e</sup>
C16:1n7	25,51 ± 0,84 <sup>a</sup>	15,50 ± 0,63 <sup>b</sup>	32,33 ± 0,30 <sup>c</sup>	55,31 ± 0,51 <sup>d</sup>	41,69 ± 0,82 <sup>e</sup>	26,78 ± 0,60 <sup>a</sup>	32,21 ± 0,15 <sup>c</sup>
i-C17:0	3,51 ± 0,41 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,98 ± 0,17 <sup>c</sup>	0,73 ± 0,03 <sup>d</sup>	2,32 ± 0,12 <sup>e</sup>	2,47 ± 0,15 <sup>e</sup>	2,13 ± 0,31 <sup>e</sup>
3-OH C12:0	3,37 ± 0,50 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,18 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,36 ± 0,27 <sup>b</sup>	1,32 ± 0,18 <sup>c</sup>	4,51 ± 0,10 <sup>d</sup>	3,79 ± 0,40 <sup>a</sup>
C18:0	4,18 ± 0,51 <sup>a,b</sup>	4,71 ± 0,30 <sup>a</sup>	3,49 ± 0,60 <sup>b</sup>	2,59 ± 0,61 <sup>b,c</sup>	1,99 ± 0,33 <sup>c</sup>	ND	2,26 ± 0,60 <sup>c</sup>
C18:1n9c	5,41 ± 0,72 <sup>a</sup>	8,57 ± 0,21 <sup>b</sup>	6,79 ± 0,56 <sup>c</sup>	5,04 ± 0,51 <sup>a</sup>	3,38 ± 0,92 <sup>d</sup>	1,69 ± 0,21 <sup>e</sup>	2,50 ± 0,20 <sup>d</sup>
C18:2n6c	3,05 ± 0,22 <sup>a</sup>	26,90 ± 0,55 <sup>b</sup>	0,95 ± 0,04 <sup>c</sup>	ND	0,70 ± 0,12 <sup>d</sup>	3,76 ± 0,44 <sup>e</sup>	ND
Σ Saturados	66,03 ± 4,43 <sup>a,d</sup>	49,03 ± 4,53 <sup>b</sup>	59,93 ± 2,54 <sup>a</sup>	39,65 ± 3,03 <sup>c</sup>	54,23 ± 3,06 <sup>b</sup>	67,77 ± 2,26 <sup>d</sup>	65,29 ± 2,94 <sup>a,d</sup>
Σ Insaturados	33,97 ± 1,78 <sup>a,f</sup>	50,97 ± 1,39 <sup>b</sup>	40,07 ± 0,90 <sup>c</sup>	60,35 ± 1,02 <sup>d</sup>	45,77 ± 1,86 <sup>e</sup>	32,23 ± 1,25 <sup>a</sup>	34,71 ± 0,35 <sup>f</sup>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> 645							
Ácidos graxos	Concentração (%)						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
C14:0	2,57 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,69 ± 0,40 <sup>b</sup>	2,60 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,97 ± 0,33 <sup>b</sup>	3,15 ± 0,12 <sup>c</sup>	4,24 ± 0,40 <sup>d</sup>	3,40 ± 0,62 <sup>d</sup>
i-C15:0	19,68 ± 0,11 <sup>a</sup>	20,14 ± 0,55 <sup>a,d</sup>	15,77 ± 0,40 <sup>b</sup>	17,30 ± 0,22 <sup>c</sup>	20,08 ± 0,23 <sup>d</sup>	5,66 ± 0,50 <sup>e</sup>	6,31 ± 0,81 <sup>e</sup>
a-C15:0	17,91 ± 0,20 <sup>a</sup>	17,62 ± 0,63 <sup>a</sup>	22,10 ± 0,44 <sup>b</sup>	14,89 ± 0,20 <sup>c</sup>	19,25 ± 0,24 <sup>d</sup>	4,37 ± 0,73 <sup>e</sup>	7,67 ± 0,40 <sup>f</sup>
C15:0	3,13 ± 0,43 <sup>a</sup>	3,17 ± 0,41 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,10 <sup>b</sup>	3,05 ± 0,63 <sup>a</sup>	5,06 ± 0,40 <sup>c</sup>	1,50 ± 0,31 <sup>b</sup>	6,13 ± 0,30 <sup>d</sup>
i-C16:0	1,98 ± 0,22 <sup>a</sup>	1,70 ± 0,21 <sup>a,e</sup>	5,46 ± 0,20 <sup>b</sup>	1,83 ± 0,27 <sup>a,e</sup>	2,82 ± 0,30 <sup>c</sup>	1,23 ± 0,14 <sup>d,e</sup>	1,49 ± 0,22 <sup>e</sup>
C16:0	20,62 ± 0,30 <sup>a</sup>	23,33 ± 0,31 <sup>b,f</sup>	17,37 ± 0,52 <sup>c</sup>	22,07 ± 0,60 <sup>d</sup>	16,56 ± 0,52 <sup>b</sup>	30,11 ± 0,22 <sup>e</sup>	23,04 ± 0,15 <sup>f</sup>
C16:1n7	13,17 ± 0,30 <sup>a</sup>	20,84 ± 0,11 <sup>b</sup>	17,45 ± 0,50 <sup>c</sup>	25,37 ± 0,14 <sup>d</sup>	25,29 ± 0,20 <sup>d</sup>	29,18 ± 0,20 <sup>e</sup>	34,65 ± 0,31 <sup>f</sup>
i-C17:0	ND	1,36 ± 0,20 <sup>a</sup>	5,95 ± 0,81 <sup>b</sup>	3,43 ± 0,16 <sup>c</sup>	0,61 ± 0,10 <sup>d</sup>	2,60 ± 0,42 <sup>e</sup>	1,21 ± 0,40 <sup>a</sup>
3-OH C12:0	0,58 ± 0,05 <sup>a</sup>	4,32 ± 0,40 <sup>b</sup>	3,58 ± 0,61 <sup>b,c</sup>	3,52 ± 0,20 <sup>c</sup>	0,78 ± 0,13 <sup>d</sup>	3,42 ± 0,82 <sup>b,c</sup>	1,97 ± 0,50 <sup>e</sup>
C17:0	0,44 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,22 <sup>b</sup>	ND	1,19 ± 0,10 <sup>c</sup>	ND	ND
C17:0 <sup>A</sup>	ND	0,93 ± 0,03 <sup>a</sup>	ND	ND	0,71 ± 0,30 <sup>a</sup>	ND	ND
C18:0	5,30 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,41 <sup>b</sup>	1,32 ± 0,10 <sup>c</sup>	2,50 ± 0,50 <sup>d</sup>	0,90 ± 0,21 <sup>b</sup>	2,75 ± 0,11 <sup>d</sup>	5,41 ± 0,30 <sup>a</sup>
C18:1n9c	13,49 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,20 <sup>b</sup>	4,14 ± 0,10 <sup>c</sup>	2,40 ± 0,30 <sup>d</sup>	1,19 ± 0,40 <sup>b</sup>	3,99 ± 0,20 <sup>c</sup>	6,93 ± 0,20 <sup>e</sup>
C18:1n9t	ND	0,89 ± 0,61 <sup>a</sup>	ND	1,68 ± 0,40 <sup>a</sup>	ND	ND	ND
C18:2n6c	1,14 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,88 ± 0,70 <sup>a,c,e</sup>	0,41 ± 0,12 <sup>b</sup>	ND	2,42 ± 0,10 <sup>c</sup>	10,97 ± 0,29 <sup>d</sup>	1,79 ± 0,16 <sup>e</sup>
Σ Saturados	72,20 ± 1,74 <sup>a</sup>	75,61 ± 3,65 <sup>a,b</sup>	78,00 ± 3,50 <sup>b</sup>	70,56 ± 3,11 <sup>a</sup>	71,10 ± 2,64 <sup>a</sup>	55,86 ± 3,64 <sup>c</sup>	56,63 ± 3,69 <sup>c</sup>
Σ Insaturados	27,80 ± 0,66 <sup>a</sup>	24,39 ± 1,62 <sup>b</sup>	22,00 ± 0,72 <sup>c</sup>	29,45 ± 0,84 <sup>d</sup>	28,90 ± 0,70 <sup>d</sup>	44,14 ± 0,69 <sup>e</sup>	43,37 ± 0,67 <sup>e</sup>
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1155							
Ácidos graxos	Concentração (%)						
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
C13:0	ND	ND	ND	0,99 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,63 ± 0,20 <sup>b</sup>	0,73 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,55 ± 0,13 <sup>c</sup>
C14:0	2,22 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,94 ± 0,30 <sup>b</sup>	3,86 ± 0,22 <sup>b</sup>	2,69 ± 0,18 <sup>c,e</sup>	3,35 ± 0,22 <sup>d,e</sup>	2,91 ± 0,26 <sup>e</sup>	2,12 ± 0,28 <sup>a</sup>
i-C15:0	7,57 ± 0,31 <sup>a</sup>	11,46 ± 0,30 <sup>b</sup>	7,87 ± 0,61 <sup>a</sup>	7,30 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,76 ± 0,11 <sup>c</sup>	9,88 ± 0,33 <sup>d</sup>	10,80 ± 0,19 <sup>e</sup>
a-C15:0	17,26 ± 0,40 <sup>a</sup>	11,05 ± 0,20 <sup>b</sup>	8,51 ± 0,70 <sup>c</sup>	8,61 ± 0,16 <sup>c</sup>	11,47 ± 0,82 <sup>b</sup>	10,28 ± 0,23 <sup>d</sup>	3,94 ± 0,45 <sup>e</sup>
C15:0	2,78 ± 0,60 <sup>a,b</sup>	2,49 ± 0,10 <sup>a,b</sup>	2,19 ± 0,50 <sup>a,b</sup>	2,42 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,77 ± 0,21 <sup>b</sup>	2,19 ± 0,32 <sup>a,b</sup>	1,23 ± 0,20 <sup>c</sup>
i-C16:0	3,11 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,96 ± 0,41 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,13 <sup>b</sup>	3,38 ± 0,40 <sup>a</sup>	2,38 ± 0,22 <sup>c</sup>	2,10 ± 0,41 <sup>c</sup>	2,22 ± 0,10 <sup>c</sup>
C16:0	18,75 ± 0,20 <sup>a</sup>	21,70 ± 0,40 <sup>b</sup>	33,74 ± 1,22 <sup>c</sup>	29,47 ± 0,31 <sup>d</sup>	23,03 ± 0,33 <sup>e</sup>	27,88 ± 0,40 <sup>f</sup>	36,39 ± 0,31 <sup>g</sup>
C16:1n7	30,20 ± 0,40 <sup>a</sup>	28,45 ± 0,26 <sup>b</sup>	30,46 ± 0,77 <sup>a</sup>	32,02 ± 0,59 <sup>c</sup>	34,92 ± 0,47 <sup>d</sup>	29,87 ± 0,15 <sup>a</sup>	26,75 ± 0,66 <sup>e</sup>
i-C17:0	2,36 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,47 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,06 ± 0,11 <sup>b</sup>	2,04 ± 0,44 <sup>a</sup>	5,26 ± 0,52 <sup>c</sup>	2,50 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,86 ± 0,10 <sup>d</sup>
3-OH C12:0	5,16 ± 0,34 <sup>a</sup>	6,11 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,53 ± 0,12 <sup>c</sup>	5,10 ± 0,86 <sup>a,d</sup>	6,34 ± 0,41 <sup>d</sup>	5,77 ± 0,30 <sup>a,d</sup>	5,98 ± 0,13 <sup>d</sup>
C17:0	ND	1,98 ± 0,22	ND	ND	ND	ND	ND
C18:0	3,13 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,37 ± 0,41 <sup>b</sup>	3,68 ± 0,22 <sup>c</sup>	1,05 ± 0,11 <sup>d</sup>	3,22 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,57 ± 0,20 <sup>e</sup>	1,86 ± 0,31 <sup>b,e</sup>
C18:1n9c	5,23 ± 0,14 <sup>a</sup>	2,62 ± 0,50 <sup>b</sup>	3,87 ± 0,31 <sup>c</sup>	1,54 ± 0,10 <sup>d</sup>	3,88 ± 0,13 <sup>c</sup>	1,45 ± 0,20 <sup>d</sup>	1,41 ± 0,42 <sup>d</sup>
C18:1n9t	2,24 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,21 <sup>b</sup>	1,97 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,37 ± 0,30 <sup>c</sup>	ND	2,87 ± 0,30 <sup>d</sup>	3,88 ± 0,70 <sup>c</sup>
Σ Saturados	62,33 ± 2,56 <sup>a,c,d</sup>	67,52 ± 2,61 <sup>b,c</sup>	63,70 ± 3,82 <sup>c,d</sup>	63,07 ± 2,81 <sup>c,d</sup>	61,20 ± 3,13 <sup>d</sup>	65,81 ± 2,75 <sup>c,d</sup>	67,96 ± 2,19 <sup>b,c</sup>
Σ Insaturados	37,67 ± 0,74 <sup>a,c</sup>	32,48 ± 0,97 <sup>b</sup>	36,30 ± 1,18 <sup>a</sup>	36,93 ± 0,99 <sup>a</sup>	38,80 ± 0,60 <sup>c</sup>	34,19 ± 0,65 <sup>d</sup>	32,04 ± 1,78 <sup>d</sup>

Médias ± desvio padrão. ND é não detectado. Médias seguidas por letras diferentes no canto superior direito, na mesma linha, indicam diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey.

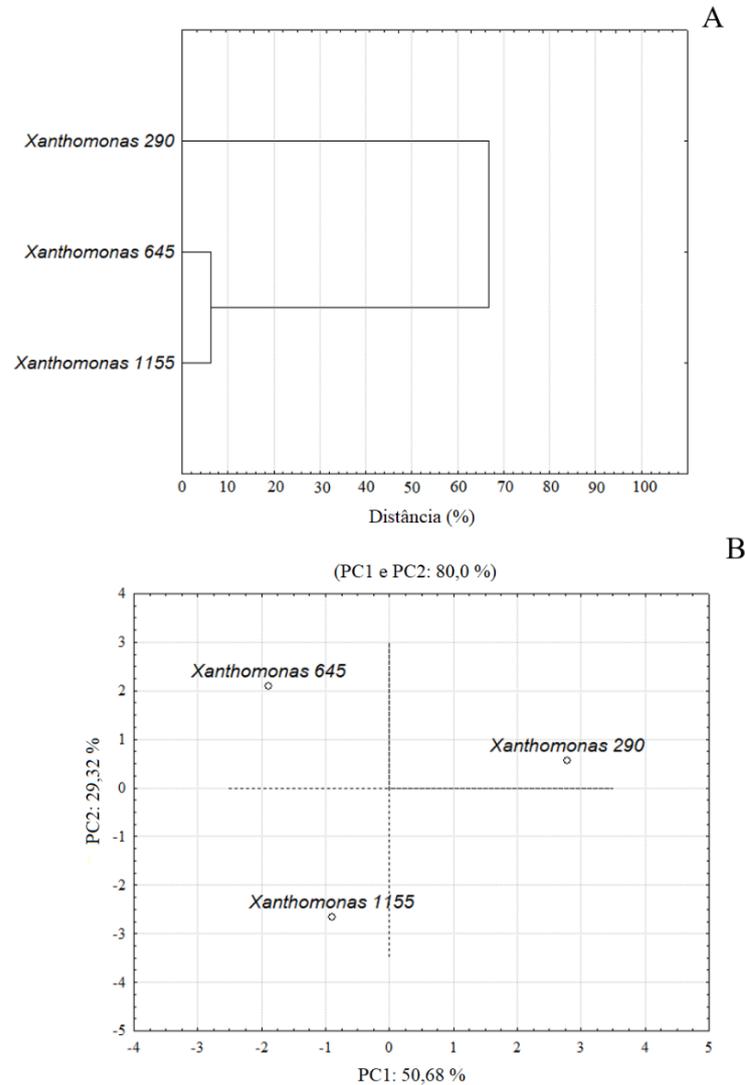
Piotrowska-Seget e Mrozik (2003) relataram que os ácidos graxos de cadeia ramificada são componentes comuns das bactérias Gram-positivas e frequentemente estão ausentes nas bactérias Gram-negativas. Entretanto, pelo menos 10 gêneros de bactérias gram-negativas, incluindo *Xanthomonas*, foram relatados como produtores de ácidos graxos de cadeia ramificada (KANEDA, 1991; YANG *et al.*, 2012), como demonstrado neste estudo. Devido a diferenças discretas na membrana celular bacteriana, a composição de ácidos graxos da membrana celular bacteriana tem sido extensivamente estudada, a fim de correlacioná-la com espécies microbianas, ou para monitorar mudanças nas populações de micro-organismos (AZEVEDO *et al.*, 2014, SILVA *et al.*, 2017, YANG *et al.*, 2012).

No presente estudo, observou-se que a composição dos ácidos graxos foi semelhante entre os patovares estudados, com pequenas variações na porcentagem de cada ácido graxo identificado. Isso resulta em diferenças discretas nos ácidos graxos identificados majoritariamente para cada patovar (Tabela 2.1). Segundo Vauterin *et al.* (1996), a similaridade entre as cepas de *Xanthomonas* está diretamente associada à composição de seus principais ácidos graxos. Os ácidos graxos minoritários têm pouco impacto na similaridade das espécies, no entanto, eles podem ser muito úteis na diferenciação entre espécies de *Xanthomonas* que apresentam perfis de ácidos graxos da membrana celular muito semelhantes, ou mesmo entre diferentes espécies.

Os ácidos graxos celulares das três cepas foram compostos principalmente de estruturas de cadeia linear, especialmente ácidos graxos saturados (Tabela 2.1). Os ácidos graxos celulares insaturados e saturados mais significativos foram C16: 1n7 e C16: 0 para as três linhagens, com média de aproximadamente 28,95% e 23,31%, respectivamente. A mudança no teor de insaturação ocorre durante o cultivo, o que dá origem a porcentagens oscilantes de ácidos graxos saturados e insaturados. Nossos resultados sugerem que mudanças na composição da membrana celular de *Xanthomonas* ocorrem durante a produção de goma xantana.

A similaridade na composição de ácidos graxos da membrana celular entre as cepas de *Xanthomonas* foi determinada por análise de dados multivariada. Ensaio de cluster foi realizado para determinar a porcentagem de ácidos graxos obtidos durante o cultivo. Os clusters são apresentados graficamente por um dendrograma na Figura 2.1A. Observamos que as cepas foram divididas em dois clusters principais. O primeiro cluster contém apenas a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290, enquanto o segundo agrupamento contém ambas *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155.

Figura 2.1. Dendrograma (A) e resultados da análise de agrupamento de cepas de *Xanthomonas* (B). As pontuações no plano são definidas pelos primeiros componentes principais PC1 e PC2, utilizando as percentagens de ácidos graxos das células de *Xanthomonas* durante a produção de goma.



A distribuição baseada nos perfis de ácidos graxos celulares obtidos por ACP e o agrupamento das três cepas estão apresentados na Figura 2.1B, onde as cepas estão representadas em função dos dois primeiros componentes principais (PC). Os dois primeiros PC extraíram 80,0% da variação total. Como mostrado na Figura 2.1, as cepas *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 foram agrupados no lado esquerdo do PC1 (50,68%).

A cepa *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 foi separada das outras cepas e ficou do lado direito do PC1. Esses resultados demonstraram que os perfis das linhagens 645 e 1155 foram mais semelhantes entre si do que com a linhagem 290. Esse comportamento foi

previsto para as espécies de *X. campestris*, que, apesar de serem classificadas como patovares distintos, apresentam características químicas semelhantes, quando comparadas à cepa 290, que é classificada como *X. axonopodis*. Nosso estudo demonstrou que o reconhecimento da composição de ácidos graxos permite a identificação de bactérias no nível da espécie para estabelecer relações taxonômicas e pode ser usado como marcadores químicos de espécies de *Xanthomonas* (BUYER, 2002; VAUTERIN *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2012).

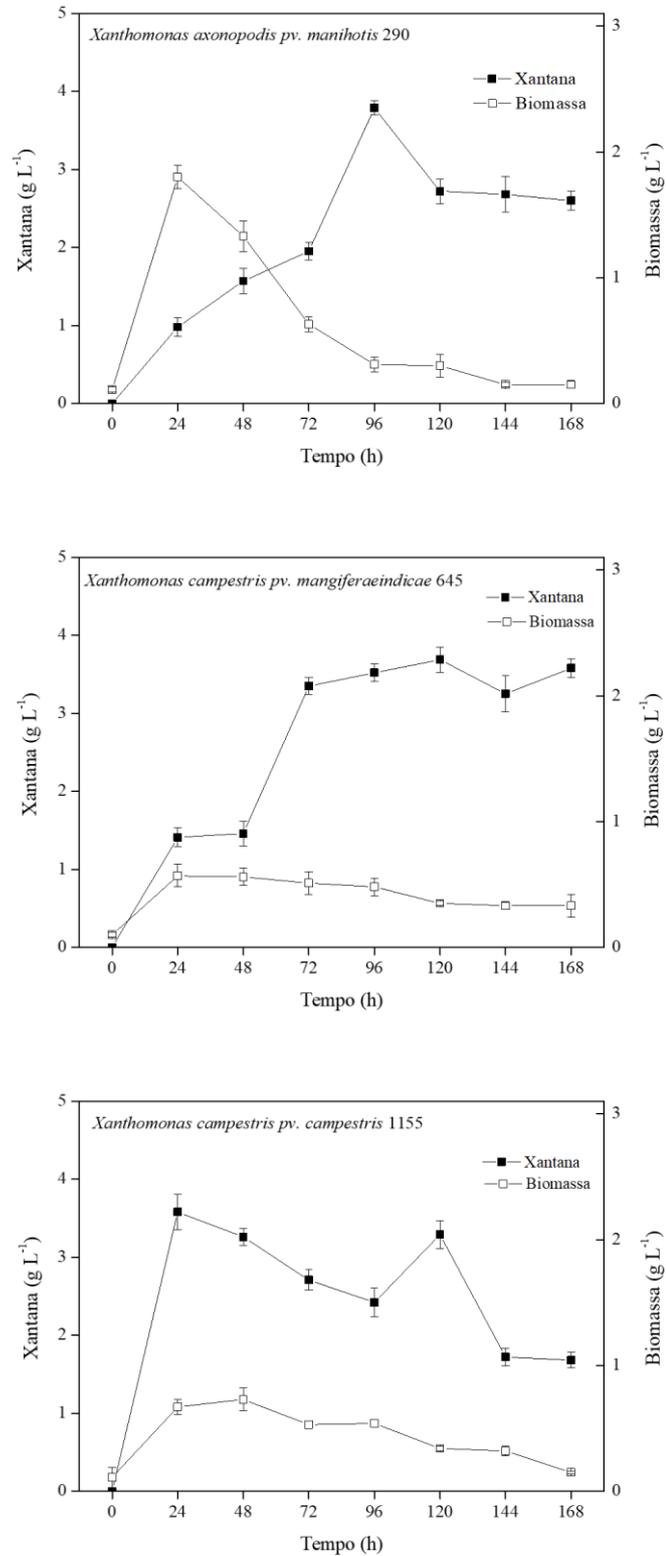
#### 4.4.2 Concentração celular e produção da goma xantana

As curvas de crescimento celular e produção de goma xantana para as três cepas (290, 645 e 1155) foram estudadas e os resultados são mostrados na Figura 2.2. Como mostrado pelas curvas de crescimento celular, as cepas não exibiram a fase lag (adaptação ao meio de cultivo). Isto foi devido a preparações anteriores do inóculo, que já introduzem a glicose como fonte de carbono. A fase exponencial de crescimento, durante a qual ocorreu o crescimento dos isolados de *Xanthomonas*, foi iniciada após 24h de cultivo para *Xanthomonas* 290 e 645, e ocorreu após 48 horas de cultivo para *Xanthomonas* 1155.

A produção de goma xantana ocorreu após 24h de cultivo e com um aumento acentuado na taxa no início da fase estacionária para as cepas 290 e 645. Para a cepa *X. campestris pv. campestris* 1155, a maior produção de xantana ocorreu nas primeiras 24 horas de cultivo. Foi demonstrado que a fase estacionária de crescimento para diferentes espécies de *Xanthomonas* spp. ocorre entre 48 e 60h. Durante esse tempo, a composição de ácidos graxos permanece estável e a produção de xantana atinge um máximo. A produção de xantana torna-se muito limitada durante a fase exponencial (HABIBI e KHOSRAVI-DARANI, 2017; YANG *et al.*, 2012).

Para a cepa 290, a produção máxima do polímero foi observada com 96h de cultivo (3,79 g L<sup>-1</sup>). Por outro lado, o patovar 645 demonstrou a maior produção de goma xantana em 120h (3,69 g L<sup>-1</sup>), e a cepa 1155 exibiu o maior acúmulo de goma xantana em 24h (3,58 g L<sup>-1</sup>). Após 96h de cultivo, a cepa 290 mostrou um declínio acentuado na produção de xantana, o que indicou que, neste estágio, o consumo de glicose está ligado à hidrólise do polímero mediada por enzimas para restaurar as fontes de carbono (CASAS *et al.*, 2000).

Figura 2.2. Produção de goma xantana e crescimento celular de cepas de *Xanthomonas* durante 168h de cultivo.



A cepa 1155 mostrou uma produtividade máxima de xantana de  $0,15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , um valor 75,0% maior do que os encontrados nas cepas 645 ( $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e 290 ( $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Ficou evidente que os patovares de *Xanthomonas* são críticos para a produção de goma xantana. Rottava *et al.* (2009) propuseram que a produtividade de xantana é influenciada pela cepa microbiana específica, o tempo de cultivo e a fonte de carbono utilizada. No presente estudo, o tempo de cultivo e a fonte de carbono foram padronizados para as três cepas analisadas, o que indicou que características inerentes dos patovares podem levar a variações no comportamento da produção de biopolímeros.

#### 4.4.3 Viscosidade aparente da goma xantana

A viscosidade da goma xantana é importante pelas suas propriedades espessantes, assim como seus efeitos reológicos e pseudoplásticos em soluções aquosas. Essas propriedades são importantes para sua aplicação industrial e, portanto, são os principais indicadores de qualidade da xantana (LI e FEKE, 2015; SILVA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). A Figura 2.3 mostra a análise comportamental reológica das gomas xantanas produzidas pelas três cepas de *Xanthomonas* avaliadas em diferentes estágios do cultivo.

Os resultados mostraram que quando a tensão de cisalhamento foi gradualmente aumentada, a viscosidade foi diminuindo cada vez mais à medida que agregados de moléculas de xantana limitados por ligações de hidrogênio e emaranhamento de polímeros se rompem sob a pressão de cisalhamento aplicada. No entanto, após a remoção do estresse de cisalhamento, a viscosidade inicial da solução foi imediatamente recuperada (DAWKINS e NANNA, 1995; NIKNEZHAD *et al.*, 2015). Assim, verificou-se que as amostras exibem comportamento pseudoplástico, no qual a viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de cisalhamento. Este comportamento é típico de soluções poliméricas contendo polissacarídeos microbianos de alta massa molecular, como a xantana (RAO *et al.*, 2003; ROTTAVA *et al.*, 2009). Quando comparados os dados da solução aquosa de goma xantana das três cepas estudadas, observamos que a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  com uma taxa de cisalhamento de  $25 \text{ s}^{-1}$ , a *X. axonopodis pv manihotis* 290 apresenta uma maior viscosidade aparente quando comparados com as de *X. campestris pv. mangiferaeindicae* 645 e *X. campestris pv campestris* 1155, com uma viscosidade aparente máxima de 149 mPa.s contra 135 mPa.s e 90 mPa.s, respectivamente (Figura 2.4). Portanto, enquanto a cepa *X. campestris pv campestris* 1155 alcançou maior produtividade de xantana, a goma produzida apresentou menor viscosidade, o que pode limitar seu uso industrial.

Figura 2.3. Viscosidade aparente de soluções aquosas de goma xantana a 0,5% derivada da glicose produzida por cepas de *Xanthomonas* a 25 °C em função da taxa de cisalhamento.

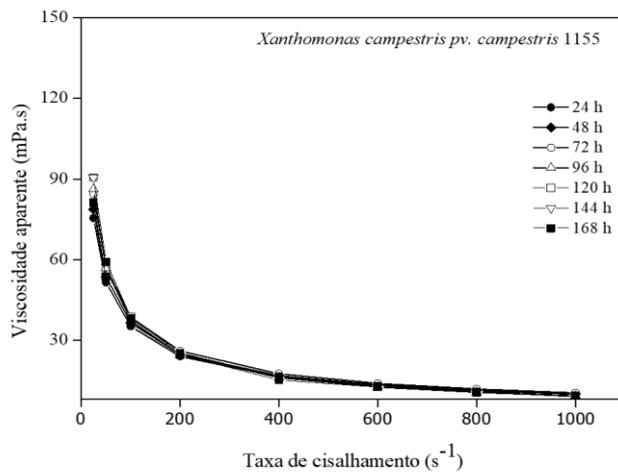
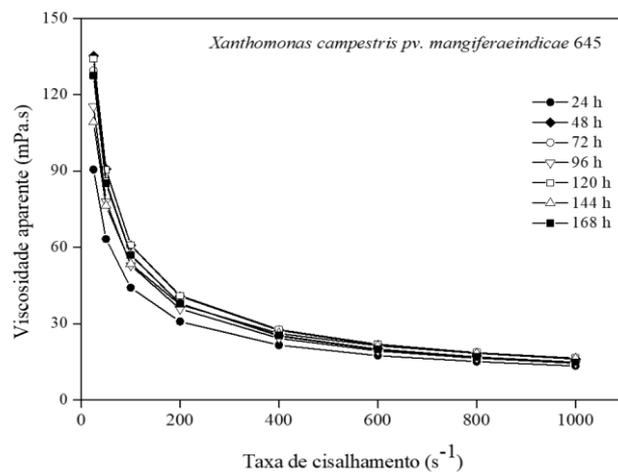
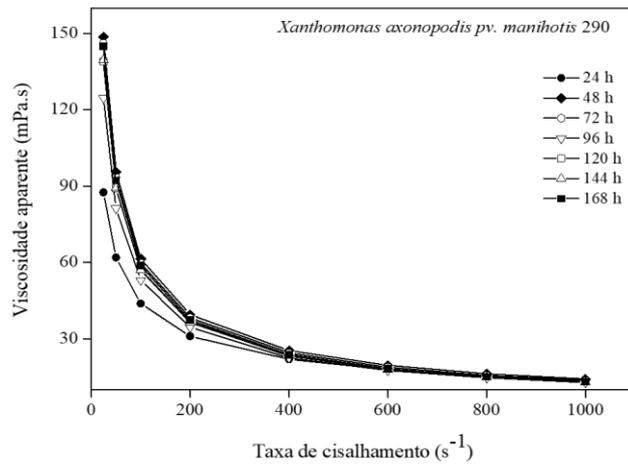
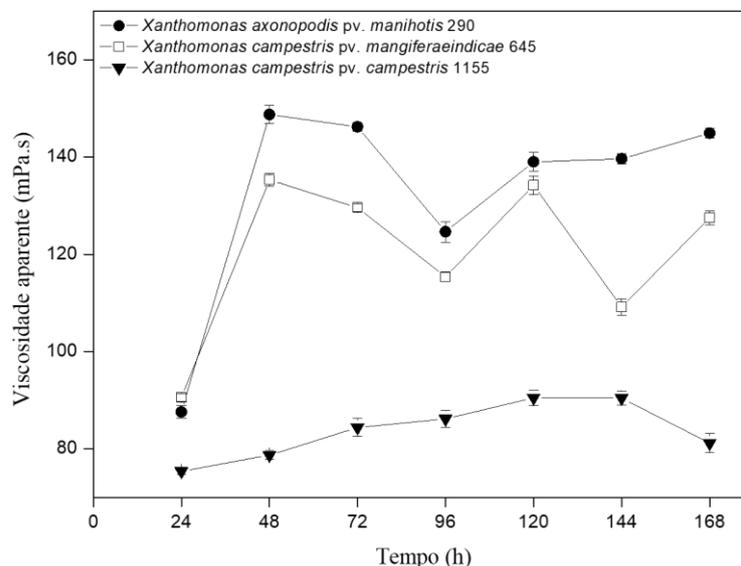


Figura 2.4. Viscosidade aparente de solução aquosa de goma xantana a 0,5% derivada da glicose produzida por *Xanthomonas* a 25 °C / 25 s<sup>-1</sup>, expressa em função do tempo.



As propriedades reológicas das soluções de goma xantana mudam com a natureza do polímero. Em geral, elas são dependentes da massa molecular média (TAKO e NAKAMURA, 1984), dos níveis de ácido pirúvico na goma (CADMUS *et al.*, 1978), das condições operacionais (PETERS *et al.*, 1993), e das espécies de *Xanthomonas* usadas (KENNEDY e BRADSHAW, 1984). Nossos resultados confirmaram que as gomas xantana sintetizadas pelas três cepas estudadas foram distintas quanto a produção, composição e qualidade, apesar das mesmas condições de cultivo.

#### 4.4.4 Massa molecular da goma xantana

As massas moleculares médias das gomas xantana sintetizadas pelas três cepas são apresentadas na Tabela 2.2. As gomas xantanas sintetizadas pela cepa *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 apresentou maiores massas moleculares médias e variou de  $1,03 \times 10^8$  Da com 24h de cultivo a  $2,97 \times 10^8$  Da com 48h. A cepa *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 apresentou valores mais baixos, que variaram de  $1,44 \times 10^8$  Da (24h) a  $2,18 \times 10^8$  Da (48h), enquanto a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 exibiram massas moleculares médias de  $4,58 \times 10^7$  Da (24h) a  $0,61 \times 10^8$  Da (120h).

Os valores obtidos no presente estudo foram maiores quando comparados com aqueles relatados por Assis *et al.* (2014), onde foram analisadas as gomas xantanas sintetizadas com

glicerina bruta como substrato, onde polímeros com massa molecular máximas de  $2,74 \times 10^7$  Da foram obtidos. Sabe-se que a composição do meio pode influenciar a massa molecular, portanto, diferenças nos resultados podem ser oriundas da fonte de carbono usada para produzir o polissacarídeo. É provável que micro-organismos desenvolvam diferentes rotas metabólicas dependendo do meio de cultivo, o que pode afetar a massa molecular da xantana. Além disso, observou-se que maiores resultados de viscosidade aparente estão positivamente associados com massas moleculares médias de gomas sintetizadas por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 ( $R^2 = 0,96$ ), *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 ( $R^2 = 0,92$ ) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 ( $R^2 = 0,87$ ).

Tabela 2.2. Massa molecular da goma xantana produzida por diferentes cepas de *Xanthomonas*.

Cepa	Período de cultivo (h)	MM média (Da)
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 290	24	$1,44 \times 10^8 \pm 0,03^a$
	48	$2,18 \times 10^8 \pm 0,04^b$
	72	$1,99 \times 10^8 \pm 0,04^c$
	96	$1,74 \times 10^8 \pm 0,05^d$
	120	$1,84 \times 10^8 \pm 0,04^e$
	144	$1,89 \times 10^8 \pm 0,06^{c,e,f}$
	168	$1,91 \times 10^8 \pm 0,01^f$
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> 645	24	$1,03 \times 10^8 \pm 0,03^a$
	48	$2,97 \times 10^8 \pm 0,02^b$
	72	$2,39 \times 10^8 \pm 0,10^c$
	96	$1,75 \times 10^8 \pm 0,06^d$
	120	$2,47 \times 10^8 \pm 0,09^c$
	144	$1,37 \times 10^8 \pm 0,06^e$
	168	$2,23 \times 10^8 \pm 0,02^f$
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1155	24	$0,46 \times 10^8 \pm 0,07^a$
	48	$0,49 \times 10^8 \pm 0,04^b$
	72	$0,54 \times 10^8 \pm 0,02^c$
	96	$0,59 \times 10^8 \pm 0,03^d$
	120	$0,61 \times 10^8 \pm 0,04^e$
	144	$0,60 \times 10^8 \pm 0,09^d$
	168	$0,50 \times 10^8 \pm 0,06^b$

Médias  $\pm$  desvios padrão. Médias seguidas por letras diferentes no canto superior direito, na mesma coluna, indicam diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey.

Notou-se que maiores massas moleculares das xantanas também foram associadas com maiores viscosidades aparente. Sabe-se que a massa molecular e a estrutura terciária da goma

xantana são determinantes na viscosidade do polímero (GALINDO *et al.*, 1994). Além disso, as propriedades das gomas são afetadas pela linhagem específica que realiza a bioconversão do substrato utilizado, a composição do meio de cultivo e as condições de operação no processo de cultivo (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Neste estudo, as condições e a composição do meio de cultivo utilizado foram mantidas constantes, o que demonstrou que as variações na massa molecular podem ser determinadas por características intrínsecas da linhagem, e podem ser correlacionadas com a composição de ácidos graxos celulares.

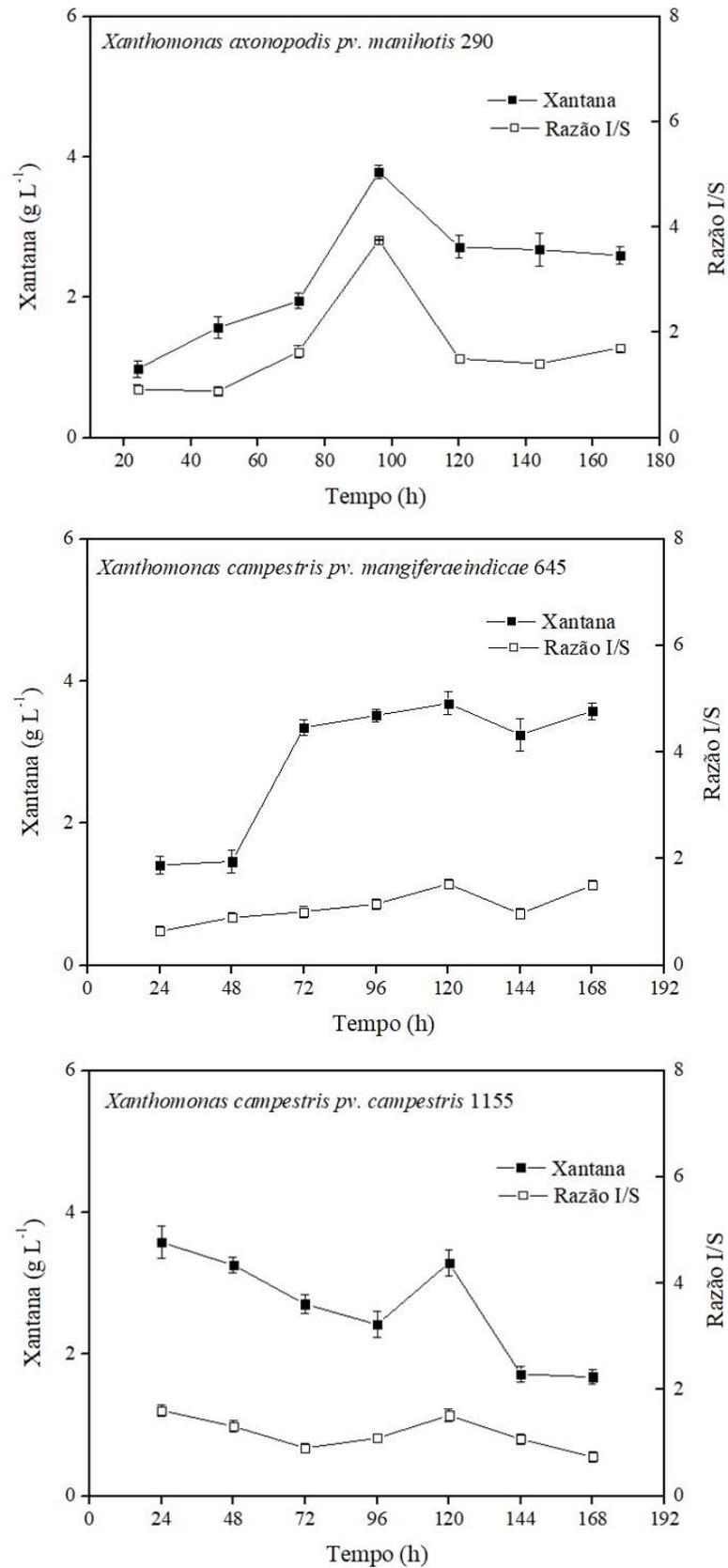
#### **4.4.5 Correlação entre a composição de ácidos graxos das *Xanthomonas* e a produção e qualidade da xantana**

Até o momento, nenhum estudo descrito na literatura demonstrou a associação entre a produção / qualidade da goma xantana e o perfil de ácidos graxos celulares das cepas de *Xanthomonas*. Neste estudo, a razão de ácidos graxos majoritários insaturados / saturados (I/S) em cada intervalo de 24h do processo de cultivo foi quantificada para determinar a associação entre perfis de ácidos graxos e produção, viscosidade e massa molecular de xantanas sintetizadas a partir de diferentes patovares de *Xanthomonas*. Outras razões, como aquelas entre ácidos graxos I/S C16: 0 e C18: 0, também foram calculadas para identificar possíveis marcadores químicos de produção e qualidade da goma xantana.

Como mostrado na Figura 2.5, comparado com as cepas 645 e 1555, a cepa 290 exibiu uma relação I/S relativamente elevada para os ácidos graxos celulares majoritários (C16: 1n7 / C16: 0), que está diretamente associado à produção de xantana ( $R^2 = 0,72$ ). Apesar disso, comportamentos semelhantes e diretamente associados também foram observados para os isolados 645 ( $R^2 = 0,65$ ) e 1155 ( $R^2 = 0,71$ ). Ao avaliar apenas os pontos até o período em que a produção de goma xantana é máxima e considerando que, após esse ponto, a produção de polímero se torna inviável, confirmou-se que a relação C16: 1n7 / C16: 0 foi mais significativamente correlacionada com a produção de goma pelos altos valores de  $R^2$  (estirpe 290 = 0,96, estirpe 645 = 0,73 e estirpe 1155 = 0,77). Assim, nosso estudo destaca a relação direta entre a razão C16: 1n7 / C16: 0 da membrana celular e a produção de goma xantana, dentro do nosso domínio experimental.

Para *X. axonopodis pv manihotis* 290, o aumento da relação I/S foi concomitante ao aumento da produção de polímeros de 24h para 96h, seguido por um decaimento em proporções semelhantes até o final do processo de cultivo. Para *X. campestris pv mangiferaeindicae* 645, um comportamento semelhante foi observado principalmente das 72h às 168h.

Figura 2.5. Correlação entre a produção de xantana ( $\text{g L}^{-1}$ ) e a razão de ácidos graxos majoritários insaturados / saturados (I/S) (C16: 1n7 / C16: 0) na membrana celular das cepas de *Xanthomonas* durante o cultivo.



E para a *X. campestris pv campestris* 1155, houve um decaimento característico das 24h às 72h, seguido de um pico às 120h, o que também confirmou a possível correlação entre os ácidos graxos celulares e a produção de goma xantana.

Não foi observada correlação entre a composição dos ácidos graxos celulares e as propriedades (viscosidade aparente e massa molecular) da xantana sintetizada por qualquer um dos três patovares estudados. As razões I/S de ácidos graxos totais e C18: 0 não foram associadas à produção, viscosidade aparente e massa molecular da goma. Isso demonstrou que a composição de ácidos graxos celulares de *Xanthomonas*, apesar de estar diretamente associada à produção de goma, não tem um efeito direto sobre a qualidade do polímero. Ácidos graxos insaturados presentes na membrana celular reduzem a sua rigidez e permitem maiores trocas entre os meios extra e intracelular, o que leva ao aumento da permeabilidade celular (DENICH *et al.*, 2003, SILVA *et al.*, 2017).

A via de produção da goma xantana pode ser dividida em três partes: (i) absorção de açúcares simples e conversão em derivados nucleotídicos, (ii) montagem de subunidades de pentassacárideo ligadas a um transportador de isopentil pirofosfato, e (iii) polimerização de unidades de repetição de pentassacarídeos e sua secreção (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

Durante a secreção do polímero no ambiente extracelular, mudanças na composição de ácidos graxos celulares ocorrem para facilitar o processo (CAI *et al.*, 2017). Portanto, o transporte facilitado de nutrientes do meio favorece a síntese da goma xantana. Com o consumo de fontes de nitrogênio mais rápido, mais favorecido é o crescimento microbiano, já com o consumo de fontes de carbono, é favorecida a produção e a secreção de polissacarídeos para fora da célula (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011). Assim, uma maior razão I/S está diretamente associada à produção de polímeros.

Além disso, os ácidos graxos são responsáveis pela ancoragem de lipopolissacarídeos (LPS) para a membrana externa de bactérias gram-negativas, como *Xanthomonas* spp., e o papel biológico do LPS envolve a participação em mecanismos patogênicos (DI LORENZO *et al.*, 2017; GONZÁLEZ e KESHAVAN, 2006). Portanto, os ácidos graxos presentes na membrana das cepas de *Xanthomonas* e a produção de xantana envolvidos na adesão da bactéria hospedeira podem mostrar uma correlação direta. Esse comportamento permite a identificação de um possível marcador químico de produção, uma vez que a composição dos principais ácidos graxos celulares e a produção de biopolímeros podem estar relacionadas.

## 4.5 CONCLUSÃO

Os perfis de ácidos graxos celulares para os todos patovares de *Xanthomonas* foram semelhantes e apresentaram maiores proporções de C16: 1n7 e C16: 0. Não houve associação entre a composição de ácidos graxos e as propriedades (viscosidade aparente e massa molecular) das gomas sintetizadas. No entanto, observamos uma possível relação entre a razão de ácidos graxos insaturados / saturados e a produção de goma xantana, possivelmente devido à influência da composição de ácidos graxos na fluidez da membrana celular. Portanto, é possível determinar marcador químico de produção para esses três patovares de *Xanthomonas*. Essa associação é de extrema importância para a produção industrial de goma xantana, uma vez que a reprodutibilidade desse polímero é o principal agente limitante de produção em larga escala.

## 4.6 REFERÊNCIAS

- ASSIS, D.J.; BRANDÃO, L.V.; COSTA, L.A.S.; FIGUEIREDO, T.V.B.; SOUSA, L.S.; PADILHA, F.F.; DRUZIAN, J.I. A study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2769-2785, 2014.
- AZEVEDO, A.F.; DUTRA, J.L.L.; SANTOS, M.L.B.; SANTOS, D.A. Fatty acid profiles in *Leishmania* spp. isolates with natural resistance to nitric oxide and trivalent antimony. **Parasitology Research**, v. 113, p. 19-27, 2014.
- BUYER, J.S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis. **Journal Microbiological Methods**, v. 48, p. 259-265, 2002.
- CADMUS, M.; KNUTSON, C.; LAGODA, A.; PITTSLEY, J.; BURTON, K. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 l fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 1003-1014, 1978.
- CAI, Z.; YUAN, Z.H.; ZHANG, H.; PAN, Y.; WU, Y.; TIAN, Z.Q. Fatty acid DSF binds and allosterically activates histidine kinase RpfC of phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* to regulate quorum-sensing and virulence. **Plos Pathogens**, v. 3, p. 13-24, 2017.
- CAMPBELL, J.W.; CRONAN JR. J.E. Bacterial fatty acid biosynthesis: Targets for antibacterial drug discovery. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 305-332, 2001.
- CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: Molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 282-291, 2000.

- DAWKINS, N.L.; NANNA, I.A. Studies on oat gum [(1→3, 1→4)-β-d-glucan]: Composition, molecular weight estimation and rheological properties. **Food Hydrocolloid**, v. 9, p. 1-7, 1995.
- DEMIRCI, A.S.; PALABIYIK, I.; ALTAN, D.D.; APAYDIN, D.; GUMUS, T. Yield and rheological properties of exopolysaccharide from a local isolate: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 18-23, 2017.
- DENICH, T.J.; BEAUDETTE, L.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 149-182, 2003.
- DI LORENZO, F.; SILIPO, A.; ANDERSEN, L.B.; PALMIGIANO, A.; LANZETTA, R.; GAROZZO, D. *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotypes: LPS structure and function as microbe-associated molecular patterns. **ChemBioChem**, v. 18, p. 772-781, 2017.
- FERNANDES, M.F.; CHAER, G.M. Analysis of fatty acid profiles as a tool for studies in soil microbiology. **Brazilian Agricultural Research Corporation**, v. 1, p. 37-44, 2010.
- GALINDO, E.; SALCEDO, G.; RAMIREZ, M.E. Preservation of *Xanthomonas campestris* on agar slopes: Effects on xanthan production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 634-637, 1994.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.
- GONZÁLEZ, J.E.; KESHAVAN, N.D. Messing with bacterial quorum sensing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 70, p. 859-875, 2006.
- HABIBI, H.; KHOSRAVI-DARANI, K. Effective variables on production and structure of xanthan gum and its food applications: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 130-140, 2017.
- HARTIG, C.; LOFFHAGEN, N.; HARMS, H. Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1915-1922, 2005.
- KANEDA, T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 288-302, 1991.
- KENNEDY, J.F.; BRADSHAW, I.J. Production, properties and applications of xanthan. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 19, p. 319-371, 1984.
- KUMAR, A.S.; MODDY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – A perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 103-117, 2007.
- LI, R.; FEKE, D.L. Rheological and kinetic study of the ultrasonic degradation of xanthan gum in aqueous solutions. **Food Chemistry**, v. 172, p. 808-813, 2015.
- LI, P.; LI, T.; ZENG, Y.; LI, X.; JIANG, X.; WANG, Y. Biosynthesis of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* LREL-1 using kitchen waste as the sole substrate. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 684-691, 2016.

- NIKNEZHAD, S.V.; ASADOLLAHI, M.A.; ZAMANI, A.; BIRIA, D.; DOOSTMOHAMMADI, M. Optimization of xanthan gum production using cheese whey and response surface methodology. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, p. 453-460, 2015.
- PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, V. Review – Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 1-12, 2011.
- PETERS, H.U.; SUH, I.S.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W.D. The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 565-566, 1993.
- PIOTROWSKA-SEGET, Z.; MROZIK, A. Signature lipid biomarker (SLB) analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 12, p. 669-675, 2003.
- RAO, Y.M.; SURESH, A.K.; SURAIISKUMAR, G.K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1301-1310, 2003.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas compestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 197-207, 2006.
- ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M.F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 65-71, 2009.
- SILVA, G.S.; ASSIS, D.J.; DRUZIAN, J.I.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; RIBEIRO, P.L.L.; CORDEIRO, S.M. Impact of preservation conditions on fatty acids, xanthan gum production and other characteristics of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 2103. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, p. 351-358, 2017.
- TAKO, M.; NAKAMURA, S. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. **Agricultural Biology Chemical**, v. 48, p. 2987-2993, 1984.
- VAUTERIN, L.; YANG, P.; SWINGS, J. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 298-304, 1996.
- WANG, Z.; WU, J.; ZHU, L.; ZHAN, X. Characterization of xanthan gum produced from glycerol by a mutant strain *Xanthomonas campestris* CCTCC M2015714. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 521-526, 2017.
- XU, L.; YU, X.; LIU, L.; ZHANG, R. A novel method for qualitative analysis of edible oil oxidation using an electronic nose. **Food Chemistry**, v. 202, p. 229-235, 2016.
- YANG, C.; GUO, Z.B.; DU, Z.M.; YANG, H.Y.; BI, Y.B.; WANG, G.Q. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter calcoaceticus*. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 25, p. 711-717, 2012.

## 5 CAPÍTULO III

### INFLUÊNCIA DO TEMPO DE CULTIVO E DE CEPAS DE *Xanthomonas* spp. NA PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E PROPRIEDADES DA GOMA XANTANA

Artigo submetido em: março / 2019

Revista: Journal Applied Polymer Science

#### 5.1 RESUMO

O objetivo desse estudo foi monitorar a influência de cepas de *Xanthomonas* spp. e do tempo de cultivo na produção, propriedades e composição da goma xantana, verificando como essas variáveis interferem na qualidade do biopolímero. Foram monitoradas três cepas distintas durante 168 horas de cultivo. A cada 24 horas foi coletada uma amostra para determinação do crescimento celular, produção de goma e consumo de substrato, o que permitiu a avaliação de parâmetros cinéticos do processo e a compreensão da influência da cepa e do tempo no cultivo. Análises de FTIR, DRX, viscosidade aparente, massa molecular, TGA, açúcares e ácidos foram realizadas com a finalidade de caracterizar as gomas produzidas e identificar possíveis diferenças nessas propriedades e composição conforme a estirpe utilizada e o tempo de cultivo. Os resultados apontaram a influência das cepas de *Xanthomonas* spp. e do tempo de cultivo na produtividade ( $Pr_{645} = 0,047 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ,  $Pr_{290} = 0,039 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ;  $Pr_{1155} = 0,149 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e qualidade das gomas, uma vez que a viscosidade foi máxima nas primeiras 48 h para as cepas 290 (148,71 mPa.s) e 645 (135,28 mPa.s), enquanto que para a cepa 1155, o valor máximo identificado para essa propriedade foi em 120 h (90,48 mPa.s). Percebeu-se também influência das variáveis na composição química da xantana, já que o aumento da concentração de piruvato na goma promoveu também o aumento da viscosidade do polímero, identificando maiores teores de ácido pirúvico (0,07 %) para a goma sintetizada pela cepa 290. Por outro lado, o maior teor de glicose (59,04%) permitiu a redução dessa propriedade (90,55 mPa.s) para a goma sintetizada com a cepa 645, confirmando que a composição da xantana está diretamente relacionada a sua qualidade. Os achados desse estudo apresentam importância prática, uma vez que estes permitem melhorar a produção e qualidade da xantana e identificar a cepa e o tempo de cultivo mais eficientes, possibilitando redução dos custos na produção a nível industrial.

**Palavras-chave:** produtividade; massa molecular; consumo de substrato; *Xanthomonas campestris*; *Xanthomonas axonopodis*.

## 5.2 INTRODUÇÃO

A goma xantana é um heteropolissacarídeo extracelular que é produzido por *Xanthomonas campestris* e outras *Xanthomonas* spp. durante a cultivo aeróbico (FARHADI *et al.*, 2012; NIKNEZHAD *et al.*, 2016; HABIBI e KHOSRAVI-DARANI, 2017). Este biopolímero é amplamente utilizado como aditivo nas indústrias alimentícia, cosmética, de recuperação de petróleo, farmacêutica e agrícola devido às suas excelentes propriedades reológicas, pseudoplasticidade, propriedade espessante e estabilidade ao calor, ácido e álcalis (ROSALAM e ENGLAND, 2006; LI *et al.*, 2016).

As aplicações tecnológicas dos exopolímeros, como a xantana, são bastante dependentes de suas propriedades, portanto, a determinação e o estudo da composição química e de outras características do polímero, como a massa molecular e a viscosidade, são extremamente relevantes para prever suas potenciais aplicações (KACI *et al.*, 2005). A massa molecular da goma xantana, normalmente apresenta-se superior a  $2,0 \times 10^6$  Da (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011; ASSIS *et al.*, 2014; MIRANDA *et al.*, 2018). Essa propriedade é fortemente influenciada pelas características da cepa produtora e condições de cultivo, podendo ter uma variação ainda mais significativa a depender da cepa e processo utilizado para obtenção da goma xantana.

A goma xantana é, em geral, composta de glicose, manose e ácido glucurônico com relação molar de 2,0:2,0:1,0, respectivamente, porém, essa composição química da xantana ainda pode variar, dependendo da cepa e composição do meio (PETERS *et al.*, 1993; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Outros monossacarídeos, como ramnose, arabinose, xilose e galactose, também podem ser encontrados na goma xantana, e influenciam diretamente na sua viscosidade e estabilidade em solução (WANG *et al.*, 2017). Alguns estudos ainda identificam variações no teor desses compostos, onde ausência de ácido glucurônico e razão molar de glicose e manose de 2:1 foram também percebidas em gomas xantana sintetizadas pela cepa *X. campestris* pv *campestris* 8396 (HEYRAUD *et al.*, 1998). Destaca-se que a xantana pode ainda conter teores de piruvato variando de quase zero até 8% (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

As espécies de *Xanthomonas* spp. empregadas na produção de xantana, influenciam diretamente na sua composição química e nas suas propriedades. As cepas de *Xanthomonas* de diferentes espécies, apresentam rotas metabólicas e comportamentos diferentes durante a

produção da goma, que pode ser atribuída a diferenças nas suas características intrínsecas, e até mesmo, das concentrações e das fontes de carbono e nitrogênio empregadas para seu crescimento (ASSIS *et al.*, 2014). O estudo cinético do crescimento microbiano e da formação de biopolímeros é importante para estudar essas variáveis e identificar melhores condições de processo para obtenção de biopolímeros como a xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 1995).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi monitorar a influência das cepas de *Xanthomonas* spp. e do tempo de cultivo na produção, propriedades e composição da goma xantana, verificando como essas variáveis interferem na qualidade do biopolímero.

## 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.3.1 Micro-organismos e preparação do inóculo

Neste estudo foram utilizadas três cepas de *Xanthomonas* isolados do Brasil: *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290, *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155. As cepas foram obtidas da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto de Biologia, Campinas, SP, Brasil, na forma liofilizada. As culturas liofilizadas foram cultivadas em caldo de extrato de levedura (YM) (Acumedia®) contendo (em g L<sup>-1</sup>): digestão enzimática de gelatina 5,0, extrato de malte 3,0, dextrose 10,0 e extrato de levedura 3,0, durante 48 h a 28 °C, e conservadas em glicerol (20,0 % v v<sup>-1</sup>) a -80 °C.

Cada experimento foi iniciado ativando as cepas congeladas em ágar YM (Acumedia®) com a seguinte composição (em g L<sup>-1</sup>): digestão enzimática de gelatina 5,0, extrato de malte 3,0, dextrose 10,0, extrato de levedura 3,0 e ágar 20,0, por 48 h a 28 °C. O inóculo foi preparado em caldo YM e uma alçada (~10µL) de cada cepa ativada foi incubada nos respectivos frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo YM a 28 ± 2 °C por 24 h em agitador orbital (Tecnal, TE-424) a 180 rpm (ASSIS *et al.*, 2014, LI *et al.*, 2016).

### 5.3.2 Concentração celular e produção de goma xantana

O cultivo foi realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo cada um 80 mL de meio de cultivo para permitir aeração adequada durante o processo. Os frascos foram inoculados com 16 mL de inóculo (20,0 % v v<sup>-1</sup>) e mantidos em incubadora orbital a 28 ± 2 °C, 250 rpm por 168 h (ASSIS *et al.*, 2014). Os meios foram compostos por (% m v<sup>-1</sup>): uréia (0,01), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,1) e glicose (2,0). Para cada tempo de cultivo com uma cepa de *Xanthomonas*, o processo foi realizado em triplicata, no qual a cada 24 h, três frascos contendo o meio cultivado

(96 mL) foram coletados para extração, quantificação e purificação da goma xantana, bem como obtenção e quantificação da biomassa e determinação do consumo do substrato.

As amostras coletadas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C (HITACHI, CR-GIII) para precipitação celular e obtenção do sobrenadante que seria utilizado para a extração da goma xantana. As células foram lavadas com solução de NaCl a 0,85% e novamente centrifugadas. Este processo foi repetido duas vezes e as células foram secas em estufa (Tecnal, TE 394/2) a  $30 \pm 2$  °C por 24 h e depois pesadas. A concentração celular foi determinada gravimetricamente e expressa em  $\text{g L}^{-1}$ .

Ao sobrenadante obtido foi então adicionado etanol (96 °GL) na proporção de 1:3 (vv<sup>1</sup>) para precipitação de goma xantana. A suspensão foi agitada e recolhida. A goma xantana foi seca em estufa (Tecnal TE, 394/2) a  $30 \pm 2$  °C por 48 h. A produção de xantana foi determinada gravimetricamente e expressa em  $\text{g L}^{-1}$  (ASSIS *et al.*, 2014; DEMIRCI *et al.*, 2017).

Para a purificação das gomas, as soluções aquosas de xantana foram dialisadas (membrana de 12000 Da) contra água purificada a 100 rpm e 25 °C durante 72 h em um agitador orbital (Tecnal, TE-424). Em seguida, as soluções foram liofilizadas (LIOBRAS L108) por 48 h e depois armazenadas em frascos herméticos (ASSIS *et al.*, 2014).

### 5.3.3 Parâmetros cinéticos do cultivo

Para verificar a cinética de produção de biomassa, produção de polímero e consumo de substrato para as três cepas estudadas, os cultivos foram realizados a 28 °C, 250 rpm, por até 168h (Tabela 3.1). As amostras foram coletadas a cada 24h e a concentração de biomassa, goma xantana e glicose consumida foram quantificadas em  $\text{g L}^{-1}$ . A biomassa e a produção de goma xantana foram determinadas gravimetricamente, seguindo o procedimento descrito anteriormente para produção de polímero e concentração celular. O consumo de substrato foi medido pelo teor de glicose no meio isento de células e determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ASSIS *et al.*, 2014).

Durante a produção de goma xantana em cada período de cultivo (24h), 5 mL de amostra foram coletados do sobrenadante imediatamente após a centrifugação para determinar o consumo de substrato. O consumo de substrato ao longo do cultivo foi determinado pela curva padrão construída a partir das áreas de picos de glicose versus concentração, separada por CLAE-IR ( $R^2 = 0,9914$ ).

Os seguintes parâmetros cinéticos foram calculados para um período de cultivo de 168h: velocidade instantânea ( $\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) de crescimento celular ( $r_x$ ), formação de produto ( $r_p$ ) e

consumo de substrato ( $r_s$ ), fator de conversão de substrato-biomassa ( $Y_{x/s}$ ), produto-biomassa ( $Y_{x/p}$ ) e substrato-produto ( $Y_{p/s}$ ), velocidades específicas ( $h^{-1}$ ) de crescimento celular ( $\mu_x$ ), formação de produto ( $\mu_p$ ) e consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e produtividade (Pr) ( $g L^{-1} h^{-1}$ ), como mostrado na Tabela 3.1. As velocidades específicas ( $\mu$ ) foram calculadas usando o método geométrico proposto por Le Duy e Zajic (1973).

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos determinados para o período de cultivo de 168h.

Parâmetros cinéticos	Equação
Velocidade instantânea de crescimento celular ( $g L^{-1}h^{-1}$ )	$rx = \frac{dX}{dt}$ (2)
Velocidade instantânea de formação de produto ( $g L^{-1}h^{-1}$ )	$rp = \frac{dP}{dt}$ (3)
Velocidade instantânea de consumo de substrato ( $g L^{-1}h^{-1}$ )	$rs = -\frac{dS}{dt}$ (4)
Fator de conversão substrato-biomassa	$Y_{x/s} = \frac{(Xf-Xi)}{(Si-Sf)}$ (5)
Fator de conversão produto-biomassa	$Y_{x/p} = \frac{(Xf-Xi)}{(Pf-Pi)}$ (6)
Fator de conversão substrato-produto	$Y_{p/s} = \frac{(Pf-Pi)}{(Si-Sf)}$ (7)
Velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ )	$\mu_x = \left(\frac{1}{X}\right)\left(\frac{dX}{dt}\right)$ (8)
Velocidade específica de formação de produto ( $h^{-1}$ )	$\mu_p = \left(\frac{1}{X}\right)\left(\frac{dP}{dt}\right)$ (9)
Velocidade específica de consumo de substrato ( $h^{-1}$ )	$\mu_s = \left(\frac{1}{X}\right)\left(-\frac{dS}{dt}\right)$ (10)
Produtividade ( $g L^{-1} h^{-1}$ )	$Pr = \frac{Pf-Pi}{t-ti}$ (11)

$X_i$  = concentração de biomassa no tempo inicial ( $t_i$ )

$X_f$  = concentração de biomassa medida no tempo ( $t$ )

$P_i$  = concentração de produto formado no tempo inicial ( $t_i$ )

$P_f$  = concentração de produto formado medido no tempo ( $t$ )

$S_i$  = concentração de substrato medido no tempo inicial ( $t_i$ )

$S_f$  = concentração de substrato medido no tempo ( $t$ )

### 5.3.4 Caracterização da goma xantana

#### 5.3.4.1 Viscosidade aparente

A viscosidade aparente das amostras foi determinada utilizando soluções de goma xantana (0,5% m v<sup>-1</sup>) em água destilada. A solução foi agitada durante 10 min para completar a dissolução e foi então mantida a 10 °C durante 12h antes do ensaio. As viscosidades aparentes foram medidas em um reômetro de cilindro concêntrico (Haake Rheotest, 2.1) a 25°C, com uma taxa de cisalhamento de 25-1000 s<sup>-1</sup>. Os dados reológicos foram ajustados ao modelo de Ostwald-de Waele (ASSIS *et al.*, 2014, MIRANDA *et al.*, 2018).

#### 5.3.4.2 Infra-Vermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Amostras de goma xantana foram analisadas qualitativamente por espectroscopia FTIR (PerkinElmer Model Spectrum 100) em um intervalo de 4000 e 400 cm<sup>-1</sup> usando o acessório de reflectância total (ATR) com um cristal de seleneto de zinco (COSTA *et al.*, 2018).

#### 5.3.4.3 Difração de raio-x (DRX)

Os índices de cristalinidade e os picos cristalinos das amostras de goma xantana foram medidos por difração de raios-X (DRX). Os difratogramas de raios-X das amostras foram obtidos em um difratômetro de raio-X SHIMADZU (XRD-6100) operado a 40 kV e 30 mA com radiação CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1,5433 \text{ \AA}$ ) na região de 5 a 50 ° (2 $\theta$ ) a uma taxa de 2 ° min<sup>-1</sup>. A determinação do índice de cristalinidade (% IC) foi calculada a partir da intensidade difratada medida por DRX de acordo com o método Vonk (VONK, 1973; RIBEIRO *et al.*, 2015).

#### 5.3.4.4 Massa molecular (MM)

As massas moleculares médias das amostras de goma xantana foram estimadas por cromatografia de exclusão molecular (sistemas GPC-CLAE, PerkinElmer, Serie 200) com colunas Shodex OHpak SB 803, 804, 805 e 806 em série, usando água purificada como o eluente a uma taxa de fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Um detector de índice de refração (IR) (PerkinElmer, Série 200) foi usado. A coluna foi calibrada com padrões de dextrana (102000; 207200; 431800; 655200; 759400; 1360000; 2025000; 2800000; 3450000; e 5900000 Da) (American Polymer Patterns). Alíquotas de 40  $\mu$ L (0,3% m v<sup>-1</sup>) dos padrões de dextrana e solução aquosa de goma xantana foram injetadas. A massa molecular de cada goma xantana foi calculada utilizando uma

curva padrão obtida correlacionando as massas moleculares dos padrões de dextrana com o tempo de retenção (TR) observado ( $\log MM = -0,2882 \times TR + 14,114$ ,  $R^2 = 0,9904$ ) (MIRANDA *et al.*, 2018).

### 5.3.4.5 Composição química

Para a determinação da composição química das gomas xantana (glicose, manose, ácido glucurônico e ácido pirúvico), as amostras de xantana obtidas e liofilizada (10,0 mg) de cada tempo de cultivo foram inicialmente hidratadas com água purificada (0,5 mL) durante 12 h, hidrolisadas com 0,5 mL de ácido trifluoroacético 1 M (TFA) durante 10 h a 100 °C, em tubos selados, e subsequentemente secas com nitrogênio gasoso e liofilizadas para remover completamente qualquer resíduo de TFA. As amostras hidrolisadas foram dissolvidas com 1 mL de água ultrapura e filtradas com filtros de membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  (ASSIS *et al.*, 2014).

Para determinar as concentrações de açúcar, as soluções hidrolisadas foram injetadas no CLAE-IR (PerkinElmer, série 200) usando uma pré-coluna Polypore Ca (30mm  $\times$  10mm  $\times$  4.6mm) seguida por uma coluna Polypore Ca (220mm  $\times$  4.6mm  $\times$  10mm), ambas foram mantidas em forno a 80 °C. A fase móvel utilizada foi a água ultrapura a um fluxo de 0,1 mL  $\text{min}^{-1}$ . O volume de injeção foi de 5  $\mu\text{L}$ . Os açúcares foram identificados comparando os TR dos picos obtidos nas amostras hidrolisadas com o TR dos padrões de glicose e manose injetados previamente. Os picos foram quantificados usando soluções aquosas de glicose e manose como padrões (0,10 a 3,10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) para obtenção das curvas padrão (Tabela 3.2), relacionando as concentrações dos padrões com as áreas obtidas.

Tabela 3.2. Curvas padrões e  $R^2$  usados para a obtenção das concentrações de açúcares e ácidos das amostras de xantana.

Curvas padrão	Equação	$R^2$
Glicose (mg $\text{mL}^{-1}$ )	$PA = (503629 \times \text{Conc}) - 50825;$	0,9959
Manose (mg $\text{mL}^{-1}$ )	$PA = (486085 \times \text{Conc}) - 430,53;$	0,9910
Ácido glucurônico (mg $\text{L}^{-1}$ )	$PA = (1365,8 \times \text{Conc}) - 58,61;$	0,9997
Ácido pirúvico (mg $\text{mL}^{-1}$ )	$PA = (17615 \times \text{Conc}) - 2382,9;$	0,9999

PA é a área do pico e Conc é a concentração do composto.

Para determinar a concentração de ácidos, soluções de amostras hidrolisadas foram injetadas no CLAE adaptado com um detector ultravioleta (UV) operando em um comprimento de onda de 195 nm (PerkinElmer, série 200) usando uma pré-coluna Polypore H (4,6 mm × 30 mm × 10 mm) seguido de uma coluna Polypore H (220 mm × 4,6 mm × 10 mm). As colunas foram colocadas num forno a 50 °C. A fase móvel utilizada foi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aquoso, pH 1,9, com vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 10 µL. As amostras foram identificadas comparando-se o tempo de retenção entre os picos dos padrões de ácido glucurônico (2,5 a 100,0 mg L<sup>-1</sup>) e ácido pirúvico (2,0 a 82,0 mg mL<sup>-1</sup>) com os picos obtidos nas amostras de goma xantana hidrolisada (ASSIS *et al.*, 2014). Os picos foram quantificados usando curvas padrão geradas por padrões de solução aquosa de ácido glucurônico e ácido pirúvico (Tabela 3.2).

#### 5.3.4.6 Análises termograviméticas (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizadas em um analisador termogravimétrico (Perkin Elmer, Pyris 1 TGA). Nas análises foram utilizadas massas de aproximadamente 5,0 mg de cada tempo de cultivo, cadinho de alumínio, faixa de temperatura de 30 a 700 °C, taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> e atmosfera inerte de nitrogênio com vazão de 20 mL min<sup>-1</sup>. As curvas TG e suas derivadas (DTG) foram usadas para determinação da temperatura inicial de decomposição (T<sub>onset</sub>), a máxima temperatura de decomposição (T<sub>pico</sub>) e a perda de massa (% massa) das amostras (Costa *et al.*, 2018).

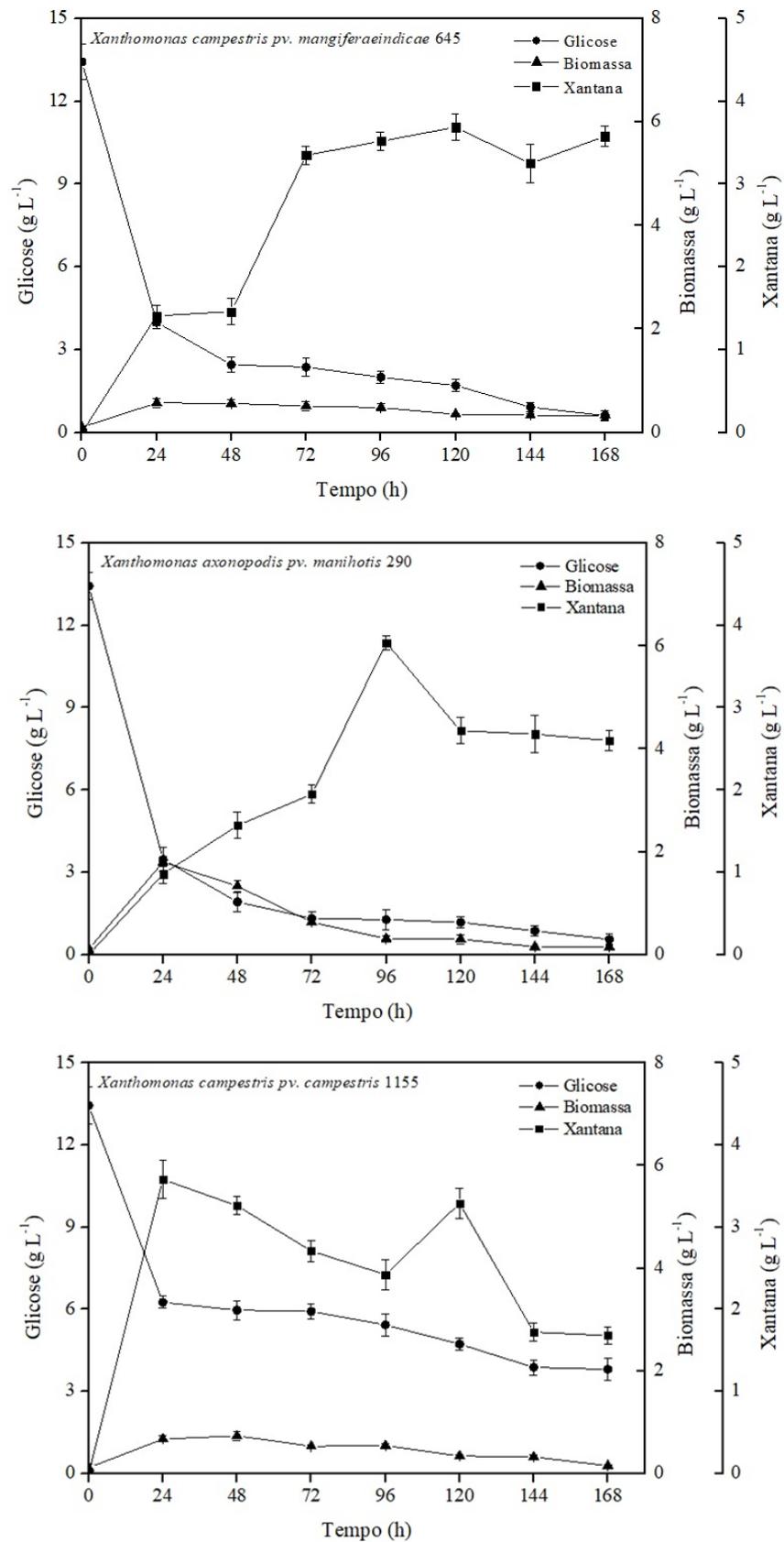
## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No capítulo anterior, foi demonstrado que os ácidos graxos saturados e insaturados estão diretamente relacionados à produção de goma xantana, mas não influenciam nas propriedades do biopolímero, como a viscosidade e massa molecular. Por esse motivo, variáveis do cultivo foram monitoradas quanto ao crescimento celular, consumo de substrato, produção e propriedades da xantana por até 168h.

### 5.4.1 Efeito das cepas de *Xanthomonas* spp. e do tempo de cultivo no crescimento celular, consumo de substrato e produção da xantana

A Figura 3.1 apresenta os comportamentos do crescimento celular, produção da goma xantana e consumo de substrato das três cepas de *Xanthomonas* durante 168 horas de cultivo.

Figura 3.1. Produção de goma xantana, crescimento celular e consumo de substrato durante o cultivo com as três cepas de *Xanthomonas* spp. por 168h.



Constata-se através da curva de crescimento celular que a fase lag foi mínima para todos patovares estudados. Esse fato pode ser justificado pela etapa de preparação do inóculo realizado antes do cultivo que já permite que as células se adaptem ao meio de crescimento. Por essa razão, a síntese da goma xantana ocorreu logo que o cultivo foi iniciado, uma vez que durante a fase inicial de crescimento celular, a acumulação de polímeros também se inicia, porém só continua após estabelecido o crescimento microbiano máximo (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

Durante as 168 horas de cultivo observou-se um crescimento celular acentuado. Nas primeiras 24 horas, para as cepas *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 (0,57 g L<sup>-1</sup>) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 (1,8 g L<sup>-1</sup>), enquanto que para a cepa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 o crescimento máximo ocorreu em 48h (0,73 g L<sup>-1</sup>), e então a fase estacionária foi estabelecida (Figura 3.1). Esses dados podem ser confirmados pelos valores da velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ) que foi máximo nas primeiras 24 horas de cultivo para todas as cepas estudadas (Tabela 3.3 e Figura 3.2). A produção de xantana por *Xanthomonas* é muito limitada durante a fase exponencial e ocorre na fase estacionária. De uma forma geral, após 40h de cultivo, o crescimento de *Xanthomonas* está na fase estacionária, no entanto, o tempo pode variar com base no tipo de estresse e condições de cultivo (UMASHANKAR *et al.*, 1996; HABIBI e KHOSRAVI-DARANI, 2017).

A síntese da goma xantana ocorreu de forma mais significativa na fase estacionária, atingindo valores máximos de produtividade de 0,047, 0,039, e 0,149 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> a 72, 96, e 24 h para os patovares 645, 290, e 1155, respectivamente. Até atingir a produção máxima de goma xantana, 84, 90, e 65% da glicose total presente no cultivo foram consumidos pelos patovares 645, 290, e 1155, respectivamente, o que demonstra maior dificuldade da cepa 1155 em utilizar toda a glicose disponível (Tabela 3.3).

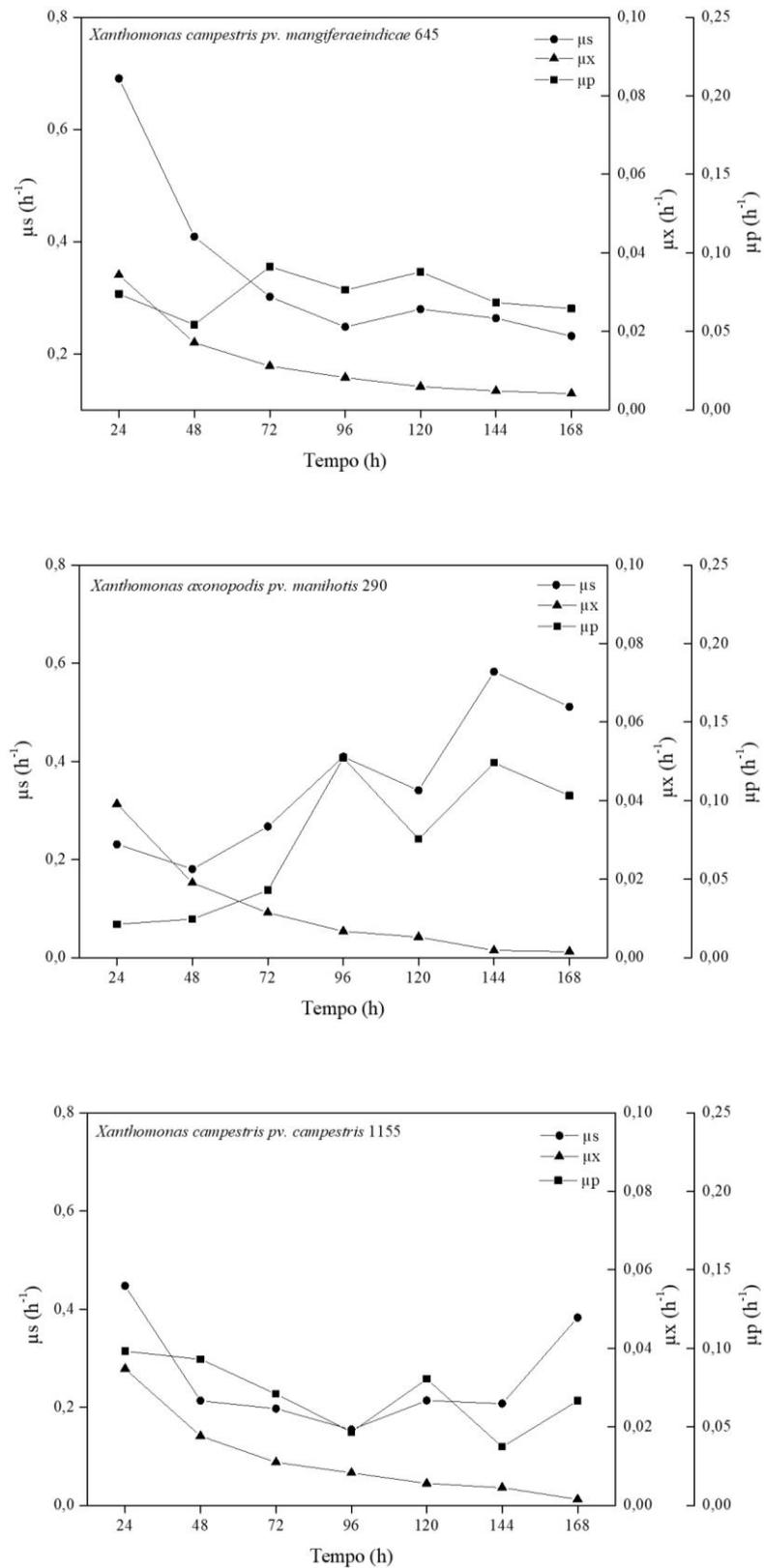
Para a cepa 645, observa-se que nas primeiras 24 horas de cultivo, o consumo de substrato foi mais direcionado à produção de goma xantana, visto que o valor de  $r_p$  (0,042 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) encontrado foi duas vezes maior do que o valor de  $r_x$  (0,020 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). Os valores de  $Y_{x/s}$  encontrados em todos os processos foram considerados baixos e apresentam redução ao longo do cultivo. Nos tempos máximos de produção de xantana, os valores de  $Y_{x/s}$  foram iguais a 0,037, 0,016 e 0,083 para as produções com as linhagens 645, 290 e 1155, respectivamente (Tabela 3.3). Valores baixos de  $Y_{x/s}$  indicam que mais substrato está disponível para a formação do produto e, portanto, quanto menor este coeficiente, mais eficiente é o processo de obtenção de goma. Ao final de todos os processos, o fator de conversão do substrato no produto

$Y_{p/s}$  foi muito superior ao fator de conversão do substrato da biomassa ( $Y_{x/s}$ ), demonstrando a capacidade das cepas de utilizar o substrato para a síntese da goma xantana (Tabela 3.3).

Tabela 3.3. Parâmetros cinéticos obtidos ao longo de 168h de cultivo com diferentes cepas de *Xanthomonas* spp.

	Parâmetros	Tempo						
		24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> 645	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,042	0,030	0,047	0,037	0,031	0,023	0,021
	$r_s$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,394	0,229	0,154	0,119	0,098	0,087	0,076
	$r_x$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,020	0,010	0,006	0,004	0,002	0,002	0,001
	$r_p$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,042	0,030	0,047	0,037	0,031	0,023	0,021
	$Y_{x/s}$	0,050	0,042	0,037	0,033	0,021	0,018	0,018
	$Y_{x/p}$	0,465	0,315	0,122	0,108	0,068	0,071	0,064
	$Y_{p/s}$	0,107	0,133	0,303	0,308	0,314	0,259	0,279
	$\mu_s$ (h <sup>-1</sup> )	0,691	0,409	0,302	0,248	0,280	0,264	0,231
	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	0,034	0,017	0,011	0,008	0,006	0,005	0,004
	$\mu_p$ (h <sup>-1</sup> )	0,074	0,054	0,091	0,076	0,088	0,068	0,065
<i>Xanthomonas axonopodi</i> pv. <i>manihotis</i> 290	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,038	0,033	0,027	0,039	0,023	0,019	0,015
	$r_s$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,416	0,240	0,168	0,127	0,102	0,087	0,077
	$r_x$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,070	0,025	0,007	0,002	0,002	0,000	0,000
	$r_p$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,038	0,033	0,027	0,039	0,023	0,019	0,015
	$Y_{x/s}$	0,169	0,106	0,043	0,016	0,015	0,003	0,003
	$Y_{x/p}$	1,837	0,777	0,267	0,053	0,070	0,015	0,015
	$Y_{p/s}$	0,092	0,136	0,161	0,311	0,222	0,213	0,202
	$\mu_s$ (h <sup>-1</sup> )	0,231	0,180	0,267	0,409	0,341	0,582	0,511
	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	0,039	0,019	0,011	0,007	0,005	0,002	0,002
	$\mu_p$ (h <sup>-1</sup> )	0,021	0,025	0,043	0,127	0,076	0,124	0,103
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1155	Produtividade (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,149	0,068	0,038	0,025	0,027	0,012	0,010
	$r_s$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,300	0,156	0,105	0,084	0,073	0,066	0,057
	$r_x$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,023	0,013	0,006	0,004	0,002	0,001	0,000
	$r_p$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	0,149	0,068	0,038	0,025	0,027	0,012	0,010
	$Y_{x/s}$	0,078	0,083	0,056	0,054	0,026	0,022	0,004
	$Y_{x/p}$	0,156	0,190	0,155	0,178	0,070	0,122	0,024
	$Y_{p/s}$	0,498	0,436	0,360	0,302	0,377	0,180	0,174
	$\mu_s$ (h <sup>-1</sup> )	0,447	0,213	0,197	0,155	0,214	0,208	0,382
	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	0,035	0,018	0,011	0,008	0,006	0,005	0,002
	$\mu_p$ (h <sup>-1</sup> )	0,223	0,093	0,071	0,047	0,081	0,037	0,067

Figura 3.2. Comportamento de velocidades específicas ( $\mu$ ) ao longo de 168h de cultivo para diferentes cepas de *Xanthomonas*.



Embora a linhagem 1155 tenha apresentado menor consumo de substrato (65%) e maior valor do fator de conversão substrato/biomassa, apresentou maior conversão em produtos, com conversão máxima de 43,6% com 48h de cultivo, e produção de 3,26 g L<sup>-1</sup>. A cepa 290 apresentou uma conversão máxima de substrato para goma de 31,1% com 96h de cultivo, e produção de 3,79 g L<sup>-1</sup>, enquanto a estirpe 645 mostrou uma conversão máxima de substrato em goma de 31,4% com 120h de cultivo e uma produção de 3,69 g L<sup>-1</sup>.

Os perfis de velocidades específicas de consumo de substrato ( $\mu_s$ ), produção de goma xantana ( $\mu_p$ ) e formação de biomassa ( $\mu_x$ ) revelam que no início de todos os processos a velocidade específica de consumo de substrato está diretamente relacionada à velocidade de formação de biomassa, com praticamente nenhuma produção de goma xantana (Figura 3.2). Após 24h de cultivo, observa-se uma melhor correlação entre os perfis das três velocidades específicas. Esses perfis são típicos de cultivos em que a formação de produtos está parcialmente associada ao crescimento bacteriano e, sua formação não está diretamente ligada à via metabólica produtora de energia (PALANIRAJ e JAYARAMAN, 2011).

#### **5.4.2 Efeito das cepas de *Xanthomonas* spp. e do tempo de cultivo nas propriedades da xantana**

##### **5.4.2.1 Viscosidade aparente**

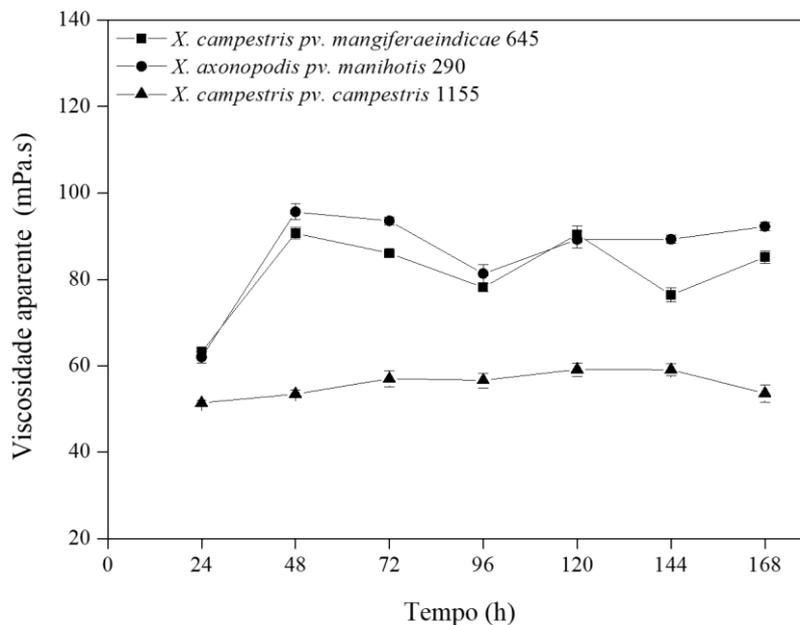
As gomas xantana obtidas pelas diferentes linhagens apresentaram comportamento pseudoplástico típico de xantana, uma vez que as curvas de viscosidade diminuíram com o aumento da taxa de cisalhamento, como foi possível visualizar no capítulo anterior. Esse comportamento ocorre nos diferentes tempos de cultivo em que a goma foi obtida, demonstrando que o comportamento pseudoplástico é inerente ao material e não se altera com as variáveis estudadas. Segundo Dario *et al.* (2011), quando a taxa de cisalhamento é alta, além do alinhamento da cadeia, as ligações entre estas podem ser desfeitas, levando à ruptura das ligações entre os elementos estruturais do material, resultando em baixas viscosidades.

A viscosidade aparente das soluções de goma foi influenciada pelo tempo de cultivo e pela cepa de *Xanthomonas* empregada em cada processo (Figura 3.3). A influência da cepa *Xanthomonas* na viscosidade da goma é bastante evidente. Os maiores valores de viscosidade aparente, em todos os tempos de cultivo, foram alcançados pelas xantanas produzidas com as linhagens de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 e *Xanthomonas campestris* pv.

*mangiferaeindicae* 645. Esses resultados são consistentes com os dados de massa molecular, que foram maiores para as xantanas sintetizadas por essas linhagens.

Em relação ao tempo de cultivo, observou-se aumento na viscosidade das soluções de goma produzidas nas primeiras 48 horas de cultivo para todas as linhagens estudadas. Após 48 horas de cultivo, há uma estabilização da viscosidade das soluções de goma com pequenas reduções depois de 72h de cultivo para as cepas 290 e 645. Por outro lado, a cepa 1155 sintetiza gomas com menor viscosidade, porém com maior estabilidade. Uma propriedade importante das gomas xantanas é a capacidade de modificar o comportamento reológico das soluções. As propriedades reológicas das gomas xantanas estão relacionadas principalmente à composição química, arranjo e/ou ligação molecular, massa molar e cepa usada na bioconversão (LI *et al.*, 2016). Na medida da viscosidade, há interferência da estrutura molecular e concentração do polímero, uma vez que a viscosidade da solução aquosa de uma goma está diretamente relacionada à rigidez da molécula que depende principalmente das estruturas primárias e secundárias (COSTA *et al.*, 2014).

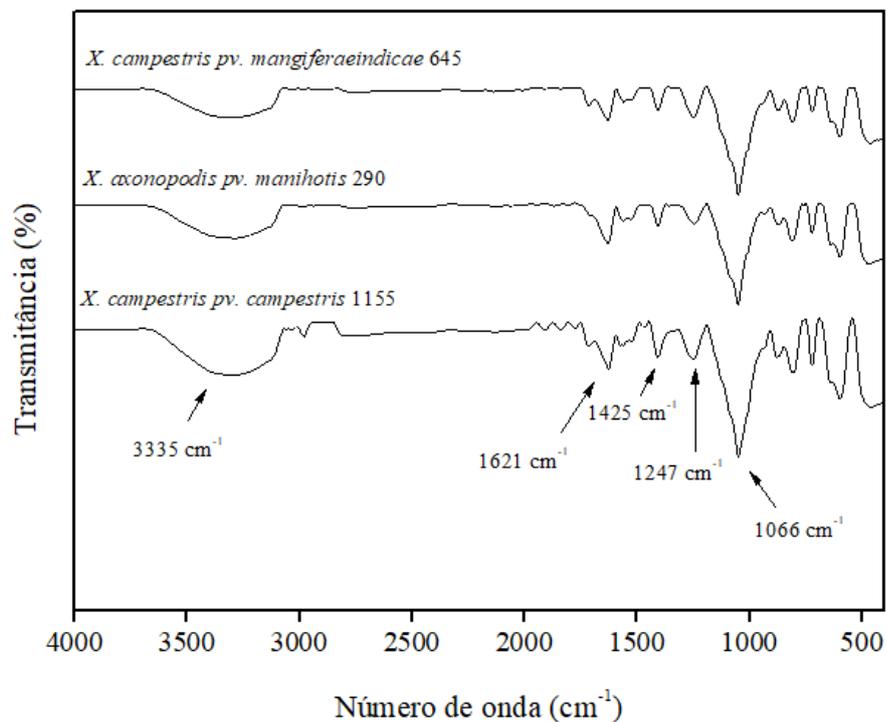
Figura 3.3. Viscosidade aparente de soluções de xantana a 0,5% ( $\text{m v}^{-1}$ ) obtidas pelas diferentes cepas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} / 50\text{ s}^{-1}$  em função do tempo.



### 5.4.2.2 FTIR

A Figura 3.4 apresenta os espectros de infravermelho da goma xantana sintetizada com as diferentes cepas de *Xanthomonas*. Os espectros obtidos foram muito semelhantes, apresentando variações discretas entre as amostras (Figura 3.4). Todas as amostras de goma xantana apresentaram bandas de absorção principais entre 3200-3450  $\text{cm}^{-1}$ , o que representa a deformação axial de -OH; 1530-1650  $\text{cm}^{-1}$ , devido a deformação axial de C=O dos enóis; 1420-1430  $\text{cm}^{-1}$ , devido à curvatura CH do grupo metila; e 1050-1150  $\text{cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídos ao estiramento dos grupos C-C e C-O, a banda típica de polissacarídeo C-H, além de ser atribuída à ligação O-acetiléster do ácido urônico. A ocorrência de numerosas bandas menores que 1000  $\text{cm}^{-1}$  é devida à presença de prováveis vínculos entre monossacarídeos (FARIA *et al.*, 2011, AHUJA *et al.*, 2012). Independentemente da cepa de *Xanthomona* e do tempo de cultivo, a goma xantana sintetizada apresentou a mesma estrutura molecular. As variações discretas encontradas entre as amostras podem estar relacionadas a variações na composição química dos polímeros, mostrando influência das cepas de *Xanthomonas* e do tempo de cultivo na composição química da goma.

Figura 3.4. Espectros FTIR das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas nos tempos de cultivo de produção máxima de goma xantana.



### 5.4.2.3 Difração de raio-x (DRX) e massa molecular

A Figura 3.5 apresenta os resultados de DRX obtidos para a xantana produzida por diferentes cepas de *Xanthomonas*. O perfil de DRX dos exopolímeros exibe picos predominantemente largos que indicam predominância da natureza amorfa, como esperado para as amostras de xantana. No entanto, apesar da semelhança entre os picos máximos de difração das xantanas, diferentes índices de cristalinidade foram observados entre as amostras, indicando que houve influências significativas da linhagem produtora e do tempo de cultivo nos índices de cristalinidade obtidos (Tabela 3.4).

Uma relação direta foi encontrada entre o índice de cristalinidade das amostras e a produção de goma em cada tempo de cultivo para todas as cepas: *X. campestris pv. mangiferaeindicae* 645 ( $R^2 = 0,86$ ), *X. axonopodis pv. manihotis* 290 ( $R^2 = 0,71$ ) e *X. campestris pv. campestris* 1155 ( $R^2 = 0,81$ ), demonstrando que nos momentos em que a produção de xantana é máxima, o índice de cristalinidade das xantanas é menor. O IC é uma propriedade importante da goma xantana, pois interfere diretamente em suas características e pode influenciar sua aplicação industrial.

Figura 3.5. Difratoogramas de raios-X das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas nos tempos de cultivo de produção máxima de goma xantana.

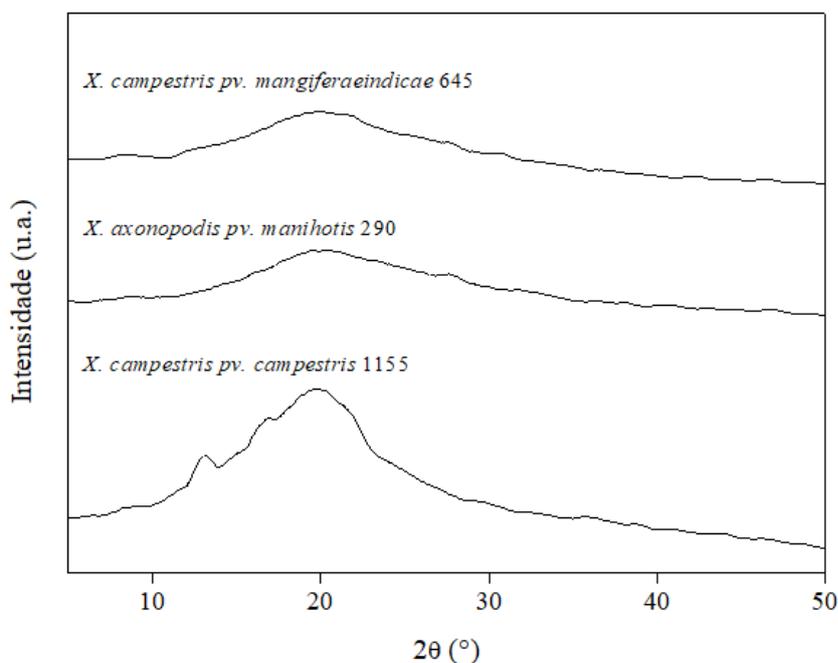


Tabela 3.4. Índice de cristalinidade (IC) e massa molecular (MM) das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas no tempo mínimo de cultivo, no tempo de cultivo com produção máxima de goma xantana e no tempo máximo de cultivo.

Cepa de <i>Xanthomonas</i>	Tempo de cultivo	IC (%)	MM (Da)
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> 645	24h	10,61	$1,03 \times 10^8 \pm 0,03$
	120h	6,96	$2,47 \times 10^8 \pm 0,09$
	168h	8,21	$2,23 \times 10^8 \pm 0,02$
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 290	24h	13,36	$1,44 \times 10^8 \pm 0,03$
	96h	9,87	$1,74 \times 10^8 \pm 0,05$
	168h	9,30	$1,91 \times 10^8 \pm 0,01$
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1155	24h	9,27	$0,46 \times 10^8 \pm 0,07$
	120h	8,71	$0,61 \times 10^8 \pm 0,04$
	168h	10,45	$0,50 \times 10^8 \pm 0,06$

As gomas xantana com os maiores valores de massas moleculares foram produzidas pela cepa *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645, sendo aproximadamente 42 e 400% maiores do que os obtidos com o *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155, respectivamente (Tabela 3.4). Em relação ao tempo de cultivo, verificou-se que para todos os processos houve variações nas massas moleculares da goma em função do tempo de cultivo, não evidenciando qualquer relação direta dos valores obtidos com a produção de goma encontrada em cada tempo. A massa molecular está diretamente associada às propriedades reológicas da xantana, pois o tamanho das cadeias poliméricas e a estrutura terciária conferem à solução aquosa a propriedade de ser viscosa, sendo importante para sua aplicação (MIRANDA *et al.*, 2018).

De acordo com Costa *et al.* (2014), as diferenças nas massas moleculares das xantanas podem ser influenciadas por fatores genéticos inerentes a cada cepa de *Xanthomonas*, como também a outros fatores, como concentração do inóculo, agitação, temperatura, pH, tempo de cultivo e conteúdo nutricional devido à composição do substrato, que podem provocar mudanças quantitativas e qualitativas nas xantanas sintetizadas.

#### 5.4.2.4 Composição química

A composição química das amostras de xantana está apresentada na Tabela 3.5. Pode-se observar que todas as xantanas obtidas são compostas pelos açúcares glicose e manose, e pelos ácidos glucurônico e pirúvico, em porcentagens variadas de acordo com o tempo de

produção. Em relação às linhagens produtoras, observa-se discreta influência na composição química da xantana, uma vez que os percentuais de glicose apresentaram pequenas variações na comparação das amostras obtidas pelas diferentes linhagens. Pequenas variações também foram encontradas em relação aos tempos de cultivo, onde as oscilações no teor de ácido e açúcar das xantanas foram observadas durante o cultivo. A partir das 48 horas de cultivo é observada uma redução do teor de glicose das xantanas. Este evento pode estar associado à limitação de oxigênio do meio na formação da goma, que influencia o conteúdo de glicose da cadeia polimérica da xantana. Os resultados mostraram que pequenas mudanças na composição de carboidratos do polímero são frequentemente dependentes do micro-organismo e do tempo de cultivo, e uma influência maior está relacionada a fonte de carbono usada no processo (LINDEN e LORIENT, 1996).

Os teores de manose encontrados nas amostras de xantana foram inferiores aos de glicose, apresentando um comportamento inversamente proporcional, ou seja, observa-se que à medida que diminui o teor de glicose, aumenta o teor de manose. Uma relação proporcionalmente inversa também foi encontrada entre a massa molecular das xantanas e seu teor de glicose a cada tempo de cultivo para todas as linhagens: *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* 645 ( $R^2 = 0,99$ ), *X. axonopodis* pv. *manihotis* 290 ( $R^2 = 0,99$ ) e *X. campestris* pv. *campestris* 1155 ( $R^2 = 0,99$ ), demonstrando que uma xantana com maior teor de glicose em sua estrutura pode apresentar menor massa molecular e, conseqüentemente, menor viscosidade.

Tabela 3.5. Composição química das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas no tempo mínimo de cultivo, no tempo de cultivo com produção máxima de goma xantana e no tempo máximo de cultivo.

Cepa de <i>Xanthomonas</i>	Tempo de cultivo	Açúcares (%)		Ácidos (%)	
		Glicose	Manose	Glucurônico	Pirúvico
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> 645	24h	59,04 ± 0,32	40,54 ± 0,32	0,41 ± 0,02	0,01 ± 0,01
	120h	55,76 ± 0,63	43,77 ± 0,63	0,43 ± 0,02	0,04 ± 0,01
	168h	52,48 ± 1,64	47,10 ± 1,64	0,38 ± 0,04	0,03 ± 0,01
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 290	24h	57,03 ± 0,94	42,39 ± 0,94	0,51 ± 0,01	0,07 ± 0,01
	96h	56,40 ± 0,36	43,14 ± 0,36	0,41 ± 0,01	0,05 ± 0,01
	168h	58,00 ± 0,19	41,52 ± 0,19	0,42 ± 0,01	0,06 ± 0,01
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1155	24h	55,06 ± 0,46	44,55 ± 0,46	0,36 ± 0,03	0,03 ± 0,01
	120h	57,04 ± 0,59	42,63 ± 0,59	0,32 ± 0,02	0,01 ± 0,00
	168h	56,47 ± 0,25	43,19 ± 0,35	0,33 ± 0,02	0,01 ± 0,00

As xantanas apresentaram, em geral, baixas concentrações de ácido glucurônico e pirúvico (<0,6%). O grau de piruvatação pode ter uma importante influência na eficácia de determinadas aplicações. A melhoraria na recuperação do petróleo, por exemplo, pode depender principalmente do grau de piruvatação, devido à precipitação da goma xantana ou adsorção do solo (BRANDFORD e BAIRD, 1983). As maiores concentrações de ácido pirúvico (0,07%) foram encontradas para a xantana obtida da linhagem *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 com 24h de cultivo. Borges *et al.* (2008) relatam que a concentração de ácido pirúvico pode variar dependendo das condições do processo de cultivo e, principalmente, da cepa de *Xanthomonas* utilizada. Segundo Sandford (1979), o teor de ácido pirúvico pode ser usado como indicador de qualidade reológica, no qual, as gomas xantanas com teores de ácido pirúvico superiores a 4,0% apresentam maiores viscosidades do que aquelas com até 3,0%.

Uma relação diretamente proporcional ( $R^2 = 0,99$ ) foi encontrada entre as massas moleculares das xantanas e o conteúdo de ácido pirúvico em cada tempo de cultivo para todas as cepas, o que demonstra que o conteúdo de piruvato na estrutura da goma tem um efeito oposto ao conteúdo de glicose, ou seja, apresenta um efeito positivo na massa molecular e viscosidade da xantana. Esta relação pode estar associada à formação de macromoléculas devido ao alto teor de substituintes piruvato, promovendo assim uma maior afinidade entre as cadeias poliméricas (SMITH *et al.*, 1981). Segundo Tako e Nakamura (1984), a goma xantana com alto grau de acetilação e, principalmente, com alto grau de piruvatação, apresentam soluções aquosas mais viscosas devido a associações intermoleculares favorecidas.

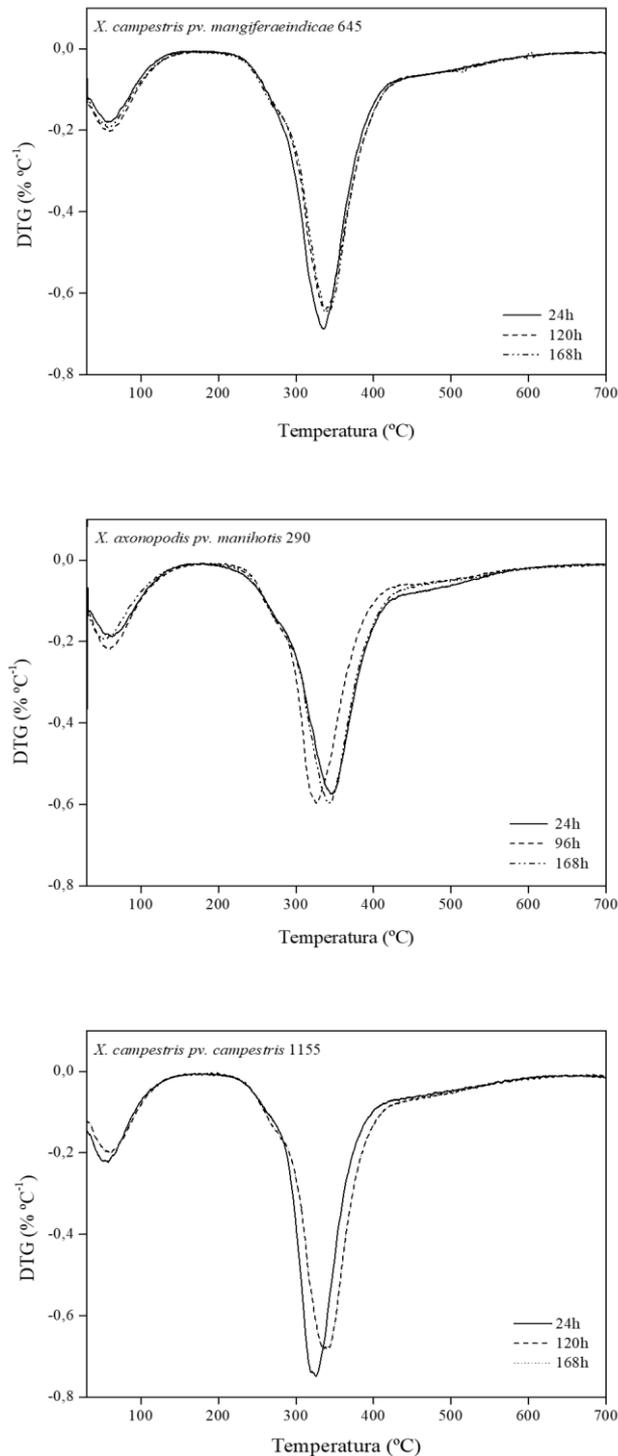
Tait *et al.* (1986), relatam um aumento da concentração do substituinte acetato com o tempo de cultivo. No entanto, este efeito não é suficientemente claro no grau de piruvatação. Alguns autores apontam que a concentração de substituinte piruvato aumenta com o tempo (FLORES *et al.*, 1994; HOLZWARTH, 1978), porém, outros relatam que essa concentração alcança um valor constante quando a biomassa atinge a fase estacionária de crescimento (CADMUS *et al.*, 1978; CASAS *et al.*, 2000).

#### **5.4.2.5 Análise termogravimétrica**

As curvas DTG (Figura 3.6) apresentam o mecanismo de decomposição térmica das xantanas obtidas pelas diferentes cepas e tempos de cultivo. Todas as xantanas exibiram comportamento de decomposição semelhante, com diferenças discretas entre as amostras. Houve predomínio de dois eventos térmicos (Tabela 3.6). O primeiro estágio de perda de massa começou em aproximadamente 30 °C, correspondendo a aproximadamente 13% de perda de

massa devido à desidratação da goma xantana. A goma xantana liofilizada absorve facilmente a água por causa dos grupos hidrofílicos, como o OH (ASSIS *et al.*, 2014).

Figura 3.6. Derivadas termogravimétricas (DTG) das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas no tempo mínimo de cultivo, no tempo de cultivo com produção máxima de goma xantana e no tempo máximo de cultivo.



O segundo evento térmico mais prevalente ocorreu a partir de 290 °C com perdas de massa em torno de 60%, devido à degradação da goma xantana. Os dados obtidos sugerem que as variáveis estudadas não influenciam a estabilidade térmica da xantana, uma vez que as variações encontradas entre as amostras foram muito discretas.

Tabela 3.6. Valores de  $T_{onset}$ ,  $T_{pico}$  e perda de massa das amostras de xantana obtidas pelas diferentes cepas no tempo mínimo de cultivo, no tempo de cultivo com produção máxima de goma xantana e no tempo máximo de cultivo.

Cepas de <i>Xanthomonas</i>	Tempo de cultivo	Evento	Parâmetros		
			$T_{onset}$	$T_{pico}$	% massa
<i>X. campestris</i> pv. <i>mangiferaeindicae</i> 645	24h	1	23,19	59,91	12,70
	120h		25,28	61,02	14,90
	168h		29,30	57,63	13,77
	24h	2	290,65	335,12	64,40
	120h		293,67	338,61	62,88
	168h		295,42	341,52	63,03
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>manihotis</i> 290	24h	1	58,26	61,96	14,55
	96h		34,92	61,52	15,77
	168h		63,03	54,21	14,04
	24h	2	290,50	346,22	61,01
	96h		289,09	328,08	48,52
	168h		293,70	344,04	59,72
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 1155	24h	1	22,98	55,87	14,89
	120h		28,70	61,18	14,13
	168h		27,60	60,58	14,56
	24h	2	295,83	326,43	60,55
	120h		292,73	337,64	62,32
	168h		293,56	339,76	62,78

## 5.5 CONCLUSÕES

Os resultados apontaram as influências das cepas de *Xanthomonas* spp. e do tempo de cultivo na produção, propriedades e composição da xantana. A cepa *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 1155 apresentou maior produtividade de goma nas primeiras 24 horas de cultivo, porém a goma produzida apresentou massa molecular e viscosidade menores do que as gomas produzidas pelas demais linhagens. O tempo de cultivo influenciou diretamente a qualidade da xantana, incluindo sua composição química. Além disso, os resultados mostraram que a

concentração de piruvato está diretamente associada a viscosidade, enquanto o maior teor de glicose tem o efeito oposto, demonstrando que a composição química da xantana é determinante para avaliar sua qualidade. Os achados desse estudo apresentam importância prática, uma vez que estes permitem melhorar a produção e qualidade da xantana e identificar a cepa e o tempo de cultivo mais eficientes, para a sua aplicação, além de possibilitar a redução dos custos na produção a nível industrial.

## 5.6 REFERÊNCIAS

- AHUJA, M.; KUMAR, A.; SINGH, K. Synthesis, characterization and in vitro release behavior of carboxymethyl xanthan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 1086-1090, 2012.
- ASSIS, D.J.; BRANDÃO, L.V.; COSTA, L.A.S.; FIGUEIREDO, T.V.B.; SOUSA, L.S.; PADILHA, F.F.; DRUZIAN, J.I. A Study of the effects of aeration and agitation on the properties and production of xanthan gum from crude glycerin derived from biodiesel using the response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 2769-2785, 2014.
- BORGES, C.D.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, C.T.; AYUB, M.A.Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris pv pruni* strain 101. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 40, p. 81-85, 2008.
- BRANDFORD, P.A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharide. **The Polysaccharides**, v. 2, p. 411-490, 1983.
- CADMUS, M.; KNUTSON, C.; LAGODA, A.; PITTSLEY, J.; BURTON, K. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 l fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 1003-1014, 1978.
- CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 282-291, 2000.
- COSTA, L.A.S.; INOMATA, M.I.; DRUZIAN, J.I.; OLIVEIRA, A.M.; JUNIOR, E.N.O. Biosynthesis of xanthan gum from fermenting shrimp shell: yield and apparent viscosity. **International Journal of Polymer Science**, v. 24, p. 1-9, 2014.
- COSTA, S.S.; MIRANDA, A.L.; ANDRADE, B.B.; ASSIS, D.J.; SOUZA, C.O.; MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; DRUZIAN, J.I. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 552–562, 2018.
- DARIO, A.F.; HORTÊNCIO, L.M.A.; SIERAKOWSKI, M.R.; NETO, J.C.Q.; PETRI, D.F.S. The effect of calcium salt on the viscosity and adsorption behavior of xanthan. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 669-676, 2011.

DEMIRCI, A.S.; PALABIYIK, I.; ALTAN, D.D.; APAYDIN, D.; GUMUS, T. Yield and rheological properties of exopolysaccharide from a local isolate: *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 30, p. 18–23, 2017.

FARHADI, G.B.; KHOSRAVI-DARANI, K.; NASERNEJAD, B. Enhancement of xanthan production on date extract using response surface methodology. **Asian Journal Chemistry**, v. 24, p. 129-133, 2012.

FARIA, S.; PETKOWICZ, C.L.O.; MORAIS, S.A.L.; TERRONES, M.G.H.; RESENDE, M.M.; FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L. Characterization of xanthan gum produced from sugar cane broth. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 469-476, 2011.

FLORES, F.; TORRES, L.G.; GALINDO, E. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *Xanthomonas campestris* on the production and quality of xanthan gum. **Journal of Biotechnology**, v. 34, p. 165-173, 1994.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; ALCON, A. Xanthan gum production: an unstructured kinetic model. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 206-217, 1995.

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

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

HEYRAUD, A.; SAYAH, B.; VOJNOV, A.; COLIN-MOREL, P.; GEY, C.; GEREMIA, R.; DANKERT, M. Structure of an extracellular mannosylated cellulose produced by a mutant strain of *Xanthomonas campestris*. **Cellular and Molecular Biology**, v. 44, p. 447-454, 1998.

HOLZWARTH, G. Molecular weight of xanthan polysaccharide. **Carbohydrate Research**, v. 66, p. 173-186, 1978.

KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from aid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 522-531, 2005.

LE DUY, A.; ZAJIC, J.E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, p. 805-815, 1973.

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

LINDEN, G.; LORIENT, D. Bioquímica agroindustrial – Revalorización alimentaria de la producción agrícola. Zaragoza: **Acríbia**, 428p., 1996.

MIRANDA, A.L.; COSTA, S.S.; ASSIS, D.J.; BOMFIM, B.A.; SOUZA, C.O.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; GUIMARÃES, A.G.; DRUZIAN, J.I. Investigation of cellular fatty acid

composition of *Xanthomonas* spp. as chemical markers of productivity and quality of xanthan gum. **Carbohydrate Polymers**, v. 192, p. 291-298, 2018.

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

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

PETERS, H.U.; SUH, I.S.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W.D. The pyruvate content of xanthan polysaccharide produced under oxygen limitation. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 565-566, 1993.

RIBEIRO, P.L.L.; SILVA, A.C.M.S.; FILHO, J.A.M.; DRUZIAN, J.I. Impact of different by-products from the biodiesel industry and bacterial strains on the production, composition, and properties of novel polyhydroxyalkanoates containing achiral building blocks. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 212-223, 2015.

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

SANDFORD, P.A. Exocellular microbial polysaccharide. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 36, p. 292-296, 1979.

SMITH, I.H.; SYMES, K.C.; LAWSON, C.J.; MORRIS, E.R. Influence of the pyruvate of xanthan on macromolecular association in solution. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 3, p. 129-134, 1981.

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

TAKO, M; NAKAMURA, S. Rheological properties of deacetylated xanthan in aqueous media. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, p. 2987-2993, 1984.

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

VONK, C.G. Computerization of Ruland's X-ray method for determination of the crystallinity in polymers. **Journal of Applied Crystallography**, v. 6, p. 148-152, 1973.

WANG, Z.; WU, J.; ZHU, L.; ZHAN, X. Characterization of xanthan gum produced from glycerol by a mutant strain *Xanthomonas campestris* CCTCC M2015714. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 521-526, 2017.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As três cepas de *Xanthomonas* apresentaram perfis qualitativos de ácidos graxos celulares semelhantes durante todo o cultivo utilizando a glicose como fonte de carbono, observando pequenas variações na porcentagem de cada ácido graxo identificado. Os ácidos graxos celulares insaturados e saturados mais significativos foram C16: 1n7 e C16: 0 para as três linhagens, respectivamente. Além disso, a composição de ácidos graxos celulares permitiu relacionar cepas da mesma espécie, como o caso da *X. campestris*.

Houve diferença na quantidade de goma xantana produzida ao comparar as cepas estudadas, o que confirmou a influência das características intrínsecas das cepas nas propriedades e produção do polímero. A cepa *X. campestris* pv. *campestris* 1155 apresentou maior produtividade da goma xantana com maior produção em 24 horas de cultivo, porém, foi percebido que para as propriedades de maior interesse comercial, tais como a viscosidade e massa molecular, menores valores foram encontrados, o que pode limitar o uso industrial dessa cepa. Por outro lado, a cepa *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 290 apresentou comportamento inverso, no qual valores mais elevados de viscosidade foram encontrados, assim como a maior produtividade só foi possível após 96h de cultivo.

Uma relação direta foi percebida entre a viscosidade e a massa molecular das xantanas produzidas, comportamento já esperado, visto que o tamanho das cadeias poliméricas e a estrutura terciária conferem à solução aquosa a propriedade de ser viscosa. Por outro lado, não houve associação entre a composição de ácidos graxos e as características (viscosidade aparente e massa molecular) das gomas sintetizadas.

Somente a razão entre os ácidos graxos I/S majoritários apresentaram relações diretas com a produção de goma xantana. Outras razões também foram testadas, porém não foram associadas à produção. Essa correlação pode ter sido confirmada devido ao efeito da presença de ácidos graxos insaturados na membrana celular, que permite maior fluidez da mesma e, conseqüentemente, maior transporte de água e nutrientes entre os meios intra e extracelular e formação do exopolissacarídeo.

Assim, pode-se afirmar que com base na composição de ácidos graxos celulares não é possível definir marcadores químicos de qualidade, porém é possível determinar marcadores químicos de produção para esses três patovares de *Xanthomonas*.

Foi possível confirmar ainda que as cepas de *Xanthomonas* spp. e o tempo de cultivo influenciam na produção, propriedades e composição da xantana. Uma relação direta também foi percebida ao analisar a concentração de ácido pirúvico e a viscosidade da goma xantana.

Percebeu-se que durante a determinação da composição química da xantana, as amostras com maior teor de piruvato produziam soluções aquosas do polímero com maior viscosidade. E uma relação inversa, ao comparar a concentração de glicose na composição das gomas foi ainda percebida.

Os parâmetros cinéticos analisados permitiram uma compreensão mais detalhada de como o substrato foi consumido para produção da goma xantana ou crescimento celular das cepas de *Xanthomonas*. Esse entendimento é primordial para definição da cepa de *Xanthomonas* e tempo de cultivo mais eficientes na produção de goma xantana.

Assim, é importante ressaltar que mais estudos que envolvam a composição de ácidos graxos da membrana celular devem ser realizados nos próximos anos. Deve-se analisar outras cepas de *Xanthomonas*, comparar a produção de goma xantana com o perfil de ácidos graxos dessas novas cepas e investigar outras propriedades das xantanas produzidas que possam apresentar uma relação com a composição de ácidos graxos celulares. Dessa maneira, pode ser possível confirmar o uso de marcadores químicos de produção e qualidade da goma xantana para qualquer cepa produtora, o que facilitaria a produção industrial desse biopolímero.