



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JORGE ALBERTO CARDOSO PEREIRA BORGES**

**Produção de biopolímero com o uso simultâneo de espécies de  
*Xanthomonas* spp. e *Zymomonas mobilis*.**

Salvador – BA

2015

**JORGE ALBERTO CARDOSO PEREIRA BORGES**

**Produção de biopolímero com o uso simultâneo de espécies de  
*Xanthomonas* spp. e *Zymomonas mobilis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida

Co-orientadores: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracema de Oliveira Moraes

Salvador – BA

2015

B732 Borges, Jorge Alberto Cardoso Pereira.

Produção de biopolímero com o uso simultâneo de espécies de *Xanthomonas spp.* e *Zymomonas mobilis* / Jorge Alberto Cardoso Pereira Borges. - Salvador, 2015.

91 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Fernando de Almeida.

Coorientadora: Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

1. Goma Xantana. 2. Biopolímeros. 3. *Xanthomonas*. 4. *Zymomonas mobilis* I. Almeida, Paulo Fernando de. II. Moraes, Iracema de Oliveira. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU: 604.2:547.458

**JORGE ALBERTO CARDOSO PEREIRA BORGES**

**PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMERO COM USO SIMULTÂNEO  
DE ESPÉCIES DE *Xanthomonas spp* e *Zymomonas  
mobilis***

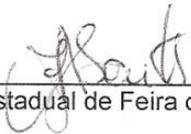
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia pelo Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em 09 de dezembro de 2015.

**BANCA EXAMINADORA:**

Paulo Fernando de Almeida – Orientador   
Doutor em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas,  
UNICAMP, Brasil.  
Universidade Federal da Bahia.

Fábio Alexandre Chinalia   
Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen,  
ABDN, Escócia.  
Universidade Federal da Bahia.

Adailson Feitoza de Jesus Santos   
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Estadual de Feira de Santana,  
UEFS, Brasil  
Universidade do Estado da Bahia

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado força, serenidade e coragem, por todos estes anos, para superar as dificuldades.

A minha família, em especial a minha mãe por todo o amor, carinho, dedicação e incentivo, ao meu pai (In Memoriam), ao meu padrasto, José Raimundo, pelo companheirismo e força que tem nos dado e aos meus irmãos Leandro e Rejane, pelo amor que existe entre nós, cada qual à sua maneira, os amo muito.

A todos os meus tios(as), primos(as), sobrinho(as), em especial aos meus avós Maurilha e Alberto (In Memoriam).

A minha esposa Ceci Figuerêdo companheira de todas as horas, a quem eu dedico todo o meu amor. Obrigado por tudo.

A UFBA – Universidade Federal da Bahia, que abriu novas portas para minha formação, contribuindo com toda a estrutura física e de pessoal, em especial ao ICS – Instituto de Ciências da Saúde.

Ao Grupo LABEM, pela oportunidade e confiança que tem me dado, em especial ao professor Paulo Almeida e a professora Iracema Moraes (UNICAMP) pela orientação, apoio e confiança, fundamentais no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Paulo Almeida pela competência com a qual exerce a pesquisa, sempre com uma incrível capacidade de criar "hiperlinks", com *insights* de onde surgem ideias maravilhosas que merecem ser investigadas. Por ter sido o grande mentor de minha pesquisa.

Ao Prof. Fábio Chinália, por toda ajuda no desenvolvimento do trabalho, mas principalmente pelas horas de conversas que tivemos nos momentos mais difíceis que atravessei, sempre com uma palavra de conforto e incentivo.

A Prof.<sup>a</sup> Josilene, por todo o apoio, incentivo e atenção sem igual, sempre disposta a nos ouvir e a colaborar da melhor forma possível.

Ao Prof. Adailson Feitosa, pelos longos anos de amizade e parceria, sempre disposto para um café, uma conversa ou uma pesquisa.

Aos membros da banca, por ter aceitado o convite e em poder contribuir com a elaboração final deste trabalho.

Aos amigos da “estatística”, professor Carlos Ledo da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), Cristovam do Grupo INSECTA – UFRB, e Denilson Assis, pela ajuda com os cálculos estatísticos.

A todo o pessoal que faz e fizeram parte do LABEM (Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Microrganismo), em especial a Leila por ter me recebido tão generosamente no grupo, a Sueli pelo incentivo constante, a Roberta pela amizade, a Bethania pela ajuda indispensável em diferentes momentos da realização deste trabalho, a Diego pelos “momentos filosóficos” e por toda ajuda que me deu ao longo da pesquisa, e a todos os outros colaboradores do LABEM, Luiz, Igor, Joalene, Jacson, Elderlei, Luciana, Tati, Pedro Crugeira, Pedro Francisco e todos os outros integrantes.

Aos alunos de Iniciação científica, em especial a Rose e Daniel que fizeram parte diretamente da pesquisa, os méritos também se estendem a vocês. A Mariana Ponzio e Júlia Sampaio pelas risadas descontraídas, a Amanda, Paulinha e todos os outros ICs.

Ao técnico de laboratório Ed (Edmundo) pelo esforço desmedido que dedica ao seu trabalho.

A Pedro Froes, pelo amor fraterno com o qual nossa amizade é sustentada.

A Átila por estar sempre presente em todos os momentos, sejam eles os mais tristes ou os mais alegres.

A CAPES pela concessão da bolsa e pelo incentivo financeiro e científico apostado em nossos projetos.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Bahia, pela oportunidade concedida.

A todos os professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia que engrandeceram meus conhecimentos e minha formação profissional.

A UFRB – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela sua contribuição em minha formação.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte desse processo, deixo os meus sinceros agradecimentos.

O sonho

*Sonhe com aquilo que você quer ser,  
Porque você só possui apenas uma vida  
e nela só se tem uma chance  
de fazer aquilo que quer*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.  
Dificuldades para fazê-la forte.  
Tristeza para fazê-la humana.  
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.  
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades  
que aparecem em seus caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.  
Para aqueles que se machucam.  
Para aqueles que buscam e tentam sempre,  
E para aqueles que reconhecem  
a importância das pessoas que passam por suas vidas.*

Clarice Lispector

Borges, Jorge Alberto Cardoso Pereira. Produção de biopolímero com o uso simultâneo de espécies de *Xanthomonas* spp. e *Zymomonas mobilis*. 89 f. il. 2015. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

## RESUMO

Exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos de origem microbiana, também conhecidos como gomas ou biopolímeros que possuem ampla aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de petróleo devido à sua capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis que lhes fornecem diversas propriedades reológicas. Atualmente, o mais importante EPS é a goma xantana cujo consumo é bastante difundido no Brasil, porém é um insumo ainda importado. Outro biopolímero que tem se destacado industrialmente é a levana, um exopolissacarídeo obtido pela reação de transfrutoseilação durante a fermentação de culturas *Zymomonas mobilis* quando crescidas em meio rico em sacarose. Esta bactéria tem despertado um grande interesse pelos pesquisadores e pelo setor industrial por apresentar um grande potencial tanto na produção de etanol, quanto para a produção de levana. O presente trabalho tem como objetivo principal, produzir biopolímeros com o uso simultâneo de espécies de *Xanthomonas* spp. e *Zymomonas mobilis*. Os resultados obtidos para a produção de biopolímeros entre os cultivos isolados das linhagens de *Xax* 1182 e *Zym* 4494 e do consórcio entre as duas cepas em diferentes meios demonstraram que, dentre os quatro meios testados para a produção de biopolímero: o meio MRT obteve o melhor resultado com produção de 6,56 g/L. Com relação ao efeito da adição de etanol ao processo de produção de biopolímero observou-se que a adição de 2% de etanol no tempo de 24 h ao meio alternativo (APD) obteve o melhor resultado (7,68 g/L), quando comparado com o tratamento controle (5,92 g/L). Enquanto para o meio convencional a maior produção foi obtida quando adicionados 4% de etanol com tempo final de fermentação de 24 h. A interpretação dos gráficos de superfície de resposta gerado a partir do modelo, demonstrou que tanto a produção quanto a viscosidade do biopolímero produzido obtiveram os valores máximos encontrados no ponto central (28 °C e 180 rpm). Este ensaio promoveu 10,13 g.L<sup>-1</sup> de biopolímero e viscosidade da solução a 1% de 4,38 cP a 1 s<sup>-1</sup>. Deste modo, a variação da temperatura e velocidade de agitação no processo fermentativo consorciado por *Xax* 1182 e *Zym* 4494, exerce grande influência na produção de biopolímero e nas suas propriedades de viscosidade aparente. Assim, tanto a adição de etanol ao meio fermentativo quanto o uso de co-culturas para a produção de biopolímeros demonstraram aumento na produção de biopolímero, consistindo em estratégias alternativas para a obtenção de biopolímeros comerciais, com ganhos consideráveis em relação a processos padrões de produção.

Palavras-chave: Goma xantana, biopolímero, *Xanthomonas*, *Zymomonas mobilis*.

Borges, Jorge Alberto Cardoso Pereira. Biopolymer production with the simultaneous use of species of *Xanthomonas* spp. and *Zymomonas mobilis*. 89 f. il. 2015. Thesis (MS). Institute of Health Sciences. Federal University of Bahia, Salvador, 2015.

## ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are polysaccharides of microbial origin, also known as biopolymers or gums that have a wide application in the food, pharmaceutical and oil industries due to their ability to form viscous solutions and water-soluble gels which provides them several rheological properties. Currently, the most important EPS is the xanthan gum whose consumption is widespread in Brazil, but it is still imported input. Another biopolymer that has stood out industrially is the Levan, exopolysaccharide obtained by transfructosylation reaction during fermentation of *Zymomonas mobilis* crops when grown in medium culture rich in sucrose. This bacterium has aroused great interest by researchers and the industry because it has great potential both in the production of ethanol, as for the production of levan. This study aims to produce biopolymers with the simultaneous use of species of *Xanthomonas* spp. and *Zymomonas mobilis*. The results obtained for the production of biopolymers from isolated cultures of the strains *Xax* 1182 and *Zym* 4494 and the consortium between the two strains in different mediums showed that among the four mediums tested for the production of biopolymers: the medium MRT had obtained the best results with production of  $6.56 \text{ gL}^{-1}$ . Concerning to the effect of addition of ethanol to the biopolymer production process it was observed that adding 2% ethanol in 24 hours to alternative medium (APD) presented the best result (7.68 g/L) compared with the control treatment (5.92 g/L). Whereas for the conventional medium, the highest production was obtained with the addition of 4% ethanol with final fermentation time of 24 h. The interpretation of response surface graphics generated from the model demonstrated that both the production and the viscosity of the produced biopolymer had obtained the maximum values at the center point (28 °C and 180 rpm). This assay provided  $10.13 \text{ gL}^{-1}$  biopolymer, and viscosity of a 1% solution of 1% de 4,38 cP at  $1 \text{ s}^{-1}$ . Thereby, the variation of temperature and stirring speed in the fermentation process consortium *Xax* 1182 and *Zym* 4494, has great influence on the production of biopolymer and its apparent viscosity properties. Thus, both the addition of ethanol to the fermentation medium as the use of co-cultures for the production of biopolymers have shown increased production of biopolymer consisting of alternative strategies for obtaining commercial biopolymers, with considerable gains compared to standard processes for production.

Keywords: Xanthan Gum, biopolymer, *Xanthomonas*, *Zymomonas mobilis*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Aspecto das colônias de <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> em meio YM (Yeast Malt).....	19
<b>Figura 2</b> - Via Entner–Doudoroff.....	20
<b>Figura 3</b> - Estrutura do polissacarídeo extracelular de <i>Xanthomonas</i> .....	23
<b>Figura 4</b> - Metabolismo de carboidratos em <i>Zymomonas mobilis</i> .....	31
<b>Figura 5</b> - Fluxograma das etapas dos experimentos adotados para a produção e caracterização dos biopolímeros.....	38
<b>Figura 6</b> - Esquema do teste de compatibilidade entre as linhagens de <i>Xanthomonas</i> ssp. e <i>Z. mobilis</i> . ....	42
<b>Figura 7</b> - Curva de crescimento bacteriano da <i>Zym</i> 4494, em meio ZM, 28 °C ± 2 °C a 120 rpm. ....	51
<b>Figura 8</b> - Curva de crescimento bacteriano da <i>Xax</i> 1182, em meio YM, 28 °C ± 2 °C a 120 rpm. ....	52
<b>Figura 9</b> - Teste de compatibilidade entre <i>Zym</i> 4494 e <i>Xac</i> 0001 (A); e <i>Xax</i> 1182 (B). ....	54
<b>Figura 10</b> - Aspecto dos biopolímeros após secagem à 50 °C, produzidos por <i>Xax</i> 1182 e <i>Zym</i> 4494 e o consórcio microbiano (A, B e C, respectivamente) no meio MRT à 180 rpm, 28 °C em 72 h.....	60
<b>Figura 11</b> - Superfície de resposta mostrando a variação de produção de biopolímero purificado (Y1) em função da variação da temperatura (X1) e da agitação (X2) para a fermentação a partir das cepas <i>Xax</i> 1182 e <i>Zym</i> 4494.....	64
<b>Figura 12</b> - Superfície de resposta para viscosidade aparente (Y2) em função da temperatura (X1) e da velocidade de agitação (X2). ....	69
<b>Figura 13</b> - Taxa de consumo de sacarose e produção de biopolímero pelas cepas <i>Xax</i> 1181 e <i>Zym</i> 4494 no período de 72 horas. ....	70
<b>Figura 14</b> - Espectro FT-IR das amostras de biopolímeros em <i>pastilhas</i> de KBr: Xantana comercial (XT – Makeni 03) e biopolímero produzido a partir do consórcio das linhagens <i>Xax</i> 1182 e <i>Zym</i> 4494 (N11 – 01). ....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Biopolímeros produzidos por bactérias.....	18
<b>Tabela 2</b> - Meios de cultura utilizados nas diversas etapas do trabalho. ....	39
<b>Tabela 3</b> - Planejamento experimental para a adição de etanol, em diferentes concentrações, aos meios de produção de goma xantana. ....	43
<b>Tabela 4</b> - Valores estabelecidos para o planejamento fatorial da variação da temperatura (X1) e agitação (X2) no consórcio microbiano para a produção e propriedades do biopolímero.....	47
<b>Tabela 5</b> - Planejamento experimental dos ensaios com diferentes condições de temperatura (°C) e agitação (rpm) no consórcio microbiano para a produção de biopolímero.....	47
<b>Tabela 6</b> - Médias e desvio padrão da produção de goma xantana adicionando diferentes concentrações de etanol ao longo do bioprocessamento em meio convencional (MRT) e alternativo à base de água produzida da indústria do petróleo (APD). ....	55
<b>Tabela 7</b> - Comparação de médias pelo teste de Tukey da produção de biopolímeros a partir de cultivos isolados e em consórcio das linhagens <i>Xax 1182</i> e <i>Zym 4494</i> em diferentes meios de produção. ....	58
<b>Tabela 8</b> - Matriz do planejamento experimental composto por variáveis independentes (valores reais e codificados) e resposta de produção e propriedades dos biopolímeros purificados, obtidos em 72h através da fermentação por <i>Xax 1182</i> e <i>Zym 4494</i> . ....	61
<b>Tabela 9</b> - Estimativa de efeitos de X1 e X2 na produção de biopolímero (Y1). ....	62
<b>Tabela 10</b> - Análise de variância para avaliação estatística do modelo de produção de Biopolímero (Y1) obtidas a partir da fermentação das cepas <i>Xax 1182</i> e <i>Zym 4494</i> . ....	63
<b>Tabela 11</b> - Estimativa de efeitos de X1 e X2 na viscosidade aparente das soluções a 1,0% de biopolímero (Y2) medidas a 25°C e taxa de cisalhamento de 25s <sup>-1</sup> .....	66
<b>Tabela 12</b> - Análise de variância para avaliação estatística do modelo para viscosidade aparente das soluções de biopolímero (Y2). ....	67
<b>Tabela 13</b> - Resumo das bandas nas quais se encontram os picos de intensidade de absorção presentes nos espectros, por análise de FT-IR, dos biopolímeros produzidos pelas linhagens <i>Xax 1182</i> e <i>Zym 4494</i> em cultivo consorciado e nos espectros da xantana comercial.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	<i>Central Composite Design</i>
CCT	Centro de Culturas Tropicais
cP	Centipoise
D/cm <sup>2</sup>	dyna/centímetro quadrado
Da	Daltons
DO	Densidade Ótica
EOR	Recuperação Avançada de Petróleo
EPS	Exopolissacarídeo
EUA	Estados Unidos da América
FAT	Fundação André Tosello
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
g.L <sup>-1</sup> ; g/L	Gramma por litro
h	Horas
KDGP	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato
L	Litros
LABEM	Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Micro-organismos
MEOR	Recuperação Melhorada de Petróleo com Micro-organismos
mL	Mililitro
mol	Mole
mPa.s	Megapascal
nm	Nanômetro
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
P.A.	Padrão Analítico
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por Minuto
RSM	Metodologia Superfície de Resposta
s <sup>-1</sup>	Segundos
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

<i>Xax</i> 1182	<i>Xanthomonas axonopodis</i> 1182
<i>Xax</i> 0001	<i>Xanthomonas campestris</i> CCT 0001
YM	Yeast Malt
ZM	Zymomonas medium
<i>Zym</i> 4494	<i>Zymomonas mobilis</i> 4494
μm	Micrómetro
\$	Dólar
%	Porcentagem
°C	Graus centígrados

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Exopolissacarídeos Microbianos .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 <i>Xanthomonas campestris</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 A Goma Xantana .....</b>	<b>21</b>
3.3.1 A Estrutura da Goma Xantana.....	23
<b>3.4 Propriedades da Goma Xantana.....</b>	<b>24</b>
3.4.1 Propriedades Reológicas da Goma Xantana.....	25
<b>3.5 Aplicações da Goma Xantana.....</b>	<b>26</b>
3.5.1 Usos na Indústria Alimentícia .....	26
3.5.2 Usos na Indústria Farmacêutica .....	27
3.5.3 Usos na Indústria de Cosméticos .....	28
3.5.4 Usos na Indústria Petroquímica.....	28
<b>3.6. <i>Zymomonas mobilis</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>3.7 Fatores que Influenciam na Produção de Exopolissacarídeos .....</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Fluxograma da Metodologia Adotada para Avaliar a Produção de Biopolímero.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Meios de Cultura .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Micro-organismos.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4 Curva de Crescimento.....</b>	<b>40</b>
4.4.1 Curva da <i>Zymomona mobilis</i> CCT 4494 ( <i>Zym</i> 4494).....	40
4.4.2 Curva da <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihot</i> 1182 ( <i>Xax</i> 1182).....	41

<b>4.6 Teste de Compatibilidade entre as Cepas Seleccionadas .....</b>	<b>42</b>
<b>4.5 Avaliação do Efeito da Adição de Etanol na Produção de Biopolímero por <i>Xanthomonas</i> sp. em Meio Convencional e Alternativo à Base de Água Produzida da Indústria do Petróleo.....</b>	<b>43</b>
4.5.1 Produção de Células para Inóculo.....	44
4.5.2 Produção de Goma Xantana .....	44
4.5.3 Recuperação do Biopolímero .....	45
<b>4.7 Avaliação da Produção de Biopolímero em Diferentes Meios Utilizando as Linhagens <i>Xax</i> 1182 e <i>Zym</i> 4494 .....</b>	<b>45</b>
4.7.1 Produção de Células para Inóculo.....	45
4.7.2 Produção e Recuperação do Biopolímero .....	46
<b>4.8 Avaliação do Efeito das Variáveis de Processo (Temperatura e Agitação) por Meio da Metodologia de Superfície de Resposta.....</b>	<b>46</b>
<b>4.9 Avaliação do Consumo de Substrato e Formação de Produto.....</b>	<b>48</b>
<b>4.10 Caracterização do biopolímero.....</b>	<b>48</b>
4.10.1 Análise da Viscosidade Aparente .....	48
4.10.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FT-IR .....	49
<b>4.11 Análise Estatística .....</b>	<b>49</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1. Curva de Crescimento .....</b>	<b>51</b>
5.1.1 Curva da <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 ( <i>Zym</i> 4494).....	51
5.1.2 Curva da <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv <i>manihoti</i> 1182 ( <i>Xax</i> 1182).....	52
<b>5.2 Teste de Compatibilidade entre as Cepas Seleccionadas .....</b>	<b>53</b>
<b>5.3 Efeito da Adição de Etanol na Produção de Biopolímero (Goma Xantana) em Meio Convencional e Alternativo pela Cepa <i>Xax</i> 1182 .....</b>	<b>55</b>
<b>5.4 Produção de Biopolímero em Diferentes Meios de Produção por <i>Xax</i> 1182 e <i>Zym</i> 4494 em Cultivo Isolado e em Consórcio.....</b>	<b>58</b>

<b>5.5 Estudo dos Efeitos da Temperatura e Agitação na Produção e Propriedades do Biopolímero Produzidos a partir do Consorcio Microbiano.....</b>	<b>61</b>
5.5.1 Produção de Biopolímero (Y1).....	62
5.5.2 Viscosidade Aparente (Y2) .....	66
<b>5.6 Avaliação do Consumo de Substrato e Formação de Produto do Ótimo da Produção do Consórcio Microbiano ao Longo das 72 Horas de Fermentação.....</b>	<b>69</b>
<b>5.7 Análise Espectroscópica (FT-IR).....</b>	<b>71</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS), também chamados de biopolímeros é muito comum em muitos gêneros de bactérias. Esses exopolissacarídeos podem formar uma cápsula ao redor da célula ou podem ser excretados para o meio como uma espécie de muco (COPLIN; COOK, 1990).

A principal característica destes biopolímeros é a sua capacidade em modificar a reologia de soluções, além de serem, em sua maioria, multifuncionais, isto é, exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para definir sua aplicação final. Tais propriedades são determinadas por sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, seu peso molecular médio e sua distribuição (PACE, 1991).

A goma xantana é um polissacarídeo natural e um importante biopolímero industrial. Foi descoberta na década de 1950 e comercializada a partir da década de 1960 (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). É um heteropolissacarídeo produzido por cultivo aeróbio de culturas de *Xanthomonas campestris*, normalmente pelo pv *camprestris* e outras espécies de *Xanthomonas* (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MAUGERI, 2001).

Dentre os biopolímeros microbianos, a xantana tem destaque especial no mercado devido suas propriedades reológicas bastante distintas e incomuns, tais como: alto grau de pseudoplasticidade, elevada viscosidade mesmo a baixas concentrações, compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos, excelente solubilidade e estabilidade tanto em meio ácido quanto alcalino, isto é, resistência à degradação em ampla faixa de pH e temperatura. A goma exibe inúmeras vantagens como espessante, estabilizante, gelificante, agente de suspensão e de floculação nas indústrias alimentícia, petrolífera, farmacêutica, cosmética, de tintas, têxtil e de produtos agrícolas (MULCHANDANI et al., 1988; ASHTAPUTRE; SHAH, 1995).

Outro biopolímero que tem se destacado industrialmente pela sua aplicação em áreas como da saúde e alimentação humana dentre outras possibilidades é a levana, um exopolissacarídeo obtido pela reação de transfrutossilacção durante a

fermentação de culturas *Zymomonas mobilis* quando crescidas em meio rico em sacarose. Esta bactéria tem despertado um grande interesse pelos pesquisadores e pelo setor industrial por apresentar um grande potencial tanto na produção de etanol, proporcionando altos rendimentos com produtividade em etanol a partir da glicose acima de 97% do valor teórico máximo, quanto para a produção de levana, quando utilizado sacarose como fonte de carbono (SPRENGER, 1996; SWINGS; DELEY, 1977). Diversas pesquisas buscam entender melhor as vias metabólicas de síntese de levana bem como a otimização do processo para a sua produção (MURO et al., 2000; REISS; HARTMEIER, 1990).

Tendo em vista a larga utilização de biopolímeros em diversos setores industriais, a busca por novos micro-organismos que produzam polissacarídeos em grandes quantidades economicamente interessantes com menor custo de produção tem despertado grande interesse nos últimos tempos. Pesquisas têm direcionado esforços em busca da obtenção de novos biopolímeros microbianos que possam representar novas possibilidades de aplicação. Apesar dos avanços é sabido que poucos micro-organismos foram completamente estudados dentre os diversos micro-organismos produtores de biopolímeros (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo principal a produção de biopolímeros com o uso simultâneo de culturas de espécies de *Xanthomonas* spp. e *Zymomonas mobilis*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Produzir biopolímero com o uso simultâneo de culturas de espécies de *Xanthomonas* spp. e *Zymomonas mobilis*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do etanol na produção de biopolímero por *Xanthomonas axonopodis* pv *manihot* 1182 em meio convencional e alternativo;
- Avaliar a produção de biopolímero em diferentes meios fermentativos por *X. axonopodis* pv *manihot* 1182 e *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em cultivo isolado e em consórcio;
- Avaliar os efeitos das variáveis independentes temperatura e agitação para obtenção de biopolímero do cultivo em consórcio de *Xax* 1182 e *Zym* 4494, por meio da metodologia de superfície de resposta;
- Avaliar o consumo de substrato e a formação de produto do ótimo da produção do consórcio microbiano ao longo das 72 horas de fermentação;
- Caracterizar e avaliar a qualidade do biopolímero produzido, através da análise de viscosidade aparente de soluções a 1% de biopolímero e Espectroscopia de Infra-Vermelho com transformada de Fourier – FT-IR.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Exopolissacarídeos Microbianos

Os exopolissacarídeos microbianos (EPS) também chamados de biopolímeros são macromoléculas formadas por monossacarídeos e derivados ácidos, produzidos durante o crescimento de uma série de gêneros de bactérias, fungos filamentosos, leveduras (STUTHERLAND, 1982) e algumas Arqueas (PAROLIS, 1996).

Os polissacarídeos produzidos por bactérias podem ser subdivididos em três grupos: exopolissacarídeos (por exemplo, xantana, dextrana, alginato, celulose, ácido hialurônico e ácido colânico), que pode ser secretada e/ou sintetizada por enzimas extracelulares ancoradas na parede da célula; os polissacáridos capsulares (por exemplo, o antígeno K30) e os polissacarídeos intracelulares (glicogênio) (MAYO, 2009; REHM, 2010).

A biossíntese de EPS e até mesmo as propriedades materiais desses polímeros são reguladas por vias complexas em resposta a estímulos externos e está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do micro-organismo em condições adversas do meio ambiente (MOREIRA, 2002; REHM, 2010). Estes polímeros cumprem várias funções biológicas, tais como: proteção contra a desidratação celular; podem servir de barreira contra vírus e o sistema imune, impedindo que se liguem a sítios específicos da parede celular; acoplar e neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; servir de material de reserva como fonte de carbono e energia; servir como meio de interação celular entre animais ou plantas através de relações interespecíficas, simbióticas ou patogênicas (PACE, 1991).

Os exopolissacarídeos podem ser homopolissacarídeos, quando as unidades monoméricas são idênticas, ou heteropolissacarídeos, quando são constituídas por duas ou mais espécies de monômeros, e quanto à sua estrutura podem ser lineares ou ramificados (GARRET; GRISHAM, 1997). Para síntese de homopolissacarídeo, é necessário uma fonte de carbono específica, onde são produzidos, geralmente, por

apenas uma enzima ou por um sistema enzimático simples. Por outro lado, os heteropolissacarídeos são formados a partir de qualquer fonte de carbono utilizável, devido a maior complexidade do sistema enzimático envolvido na biossíntese desses polissacarídeos (FARIA, 2009).

Alguns exopolissacarídeos são sintetizados durante todo o crescimento bacteriano enquanto que outros são produzidos somente durante a fase logarítmica ou na fase estacionária (DE SOUZA; SUTHERLAND, 1994). Estes exopolissacarídeos são, geralmente, considerados como metabólitos secundários, produzidos quando uma fonte de carboidratos está presente em excesso (PACE; RIGHELATO, 1980). Os metabólitos secundários são definidos como compostos sintetizados pelos micro-organismos quando as células crescem lentamente ou cessam o crescimento. Seu papel no crescimento e metabolismo do micro-organismo nem sempre é definido. Demain (2000) destaca a importância dos metabólitos secundários para o micro-organismo também como efetivos na diferenciação microbiana.

Atualmente, é conhecida uma ampla gama de biopolímeros produzidos por micro-organismos. Alguns destes são apresentados na Tabela 1 (ERNANDES e GARCIA-CRUZ, 2005; DOLS et al., 1998; MOREIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007; SANDFORD, 1979; SUTHERLAND, 1990 e 1998).

**Tabela 1 - Biopolímeros produzidos por bactérias**

Exopolissacarídeo	Micro-organismo produtor
gelana	<i>Pseudomonas elodea</i>
curdlana	<i>Alcaligenes faecalis</i> var. <i>mixogenes</i> ; <i>Agrobacterium</i> e <i>Rhizobium</i>
dextrana	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
xantana	<i>Xanthomonas</i> spp
welana	<i>Alcaligenes</i> sp
clariana	<i>Beijerinckia</i> sp
Levana	<i>Zymomonas mobilis</i> ; <i>Bacillus mesentericus</i> ; <i>Bacillus</i> <i>subtilis</i> e outros.

### 3.2 *Xanthomonas campestris*

A *Xanthomonas* é um gênero pertencente à família *Pseudomonaceae*. Todos os organismos desse gênero são patógenos de plantas, com exceção da espécie *Xanthomonas maltophilia* (patógeno oportunista de humanos). Os patovares de *Xanthomonas* infectam uma grande variedade de plantas, incluindo algumas de interesse agrícola, por exemplo, o repolho, a alfafa, o feijão, alcachofra e o algodão (LUVIELMO et al., 2007).

As células de *Xanthomonas* podem ocorrer em bastonetes retos, isolados, medindo 0,4-0,7  $\mu\text{m}$  de largura e 0,7-1,8  $\mu\text{m}$  de comprimento. As células são móveis, gram-negativas, apresentando um único flagelo polar (1,7-3  $\mu\text{m}$  de comprimento). O micro-organismo é quimiorganotrófico e aeróbio obrigatório com um tipo de metabolismo estritamente respiratório que requer o oxigênio como aceptor final de elétrons. A bactéria não é desnitrificante, é catalase positiva e oxidase-negativa. As colônias são geralmente amarelas, lisas e mucoides conforme ilustra a Figura 1 (HOLT et al., 1993). A estrutura do envoltório da célula é semelhante a das outras células Gram-negativas. Pigmentos amarelos, conhecidos como xantomonadinas, estão presentes em todas as espécies de *Xanthomonas ssp.*, mas eles podem estar ausentes, especialmente quando ocorre degradação por tensão (BRADBURY, 1984; GARCÍA-OCHOA, 2000).

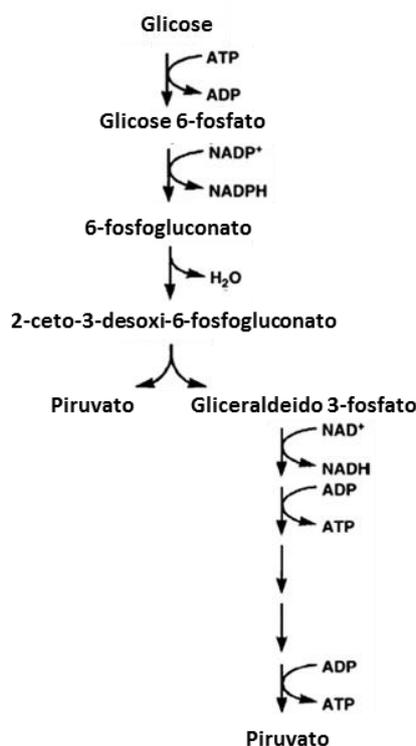
**Figura 1** - Aspecto das colônias de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em meio YM (Yeast Malt)



Embora a presença do pigmento seja um parâmetro usado para a identificação, a ausência de pigmentação não exclui o gênero *Xanthomonas*, uma vez que algumas linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *ricini* e *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* ocorrem naturalmente sem a presença de pigmento (CHUN, 2002).

As *Xanthomonas* spp. são capazes de oxidar a glicose e a via Entner-Doudoroff (Figura 2), é predominantemente utilizada para o catabolismo da glicose, onde cataboliza cerca de 80% da glicose disponível até piruvato (a via das pentoses fosfato, também ocorre, mas utiliza apenas 8-16% da glicose total consumida); tanto o ciclo do ácido tricarboxílico como do glioxilato estão presentes (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; FARIA, 2009).

**Figura 2** - Via Entner–Doudoroff



Fonte: Adaptado de ROSALAM; ENGLAND, 2006.

As bactérias do gênero *Xanthomonas* apresentam um grande potencial biotecnológico, sendo um micro-organismo produtor do biopolímero xantana, que

apresenta propriedades reológicas únicas, se destacando no mercado de polímeros em relação a outros polímeros de origem vegetal e de origem microbiana (ROTTAVA 2005).

### 3.3 A Goma Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo natural, e um importante biopolímero industrial. Ele foi descoberto em 1963 pelo *Northern Regional Research Laboratory* (NRRL). O polissacarídeo B-1459, ou goma xantana, produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 foi amplamente estudado devido suas propriedades que lhe permitiam suplementar outras gomas solúveis em água, naturais e sintéticas conhecidas. A produção comercial importante teve início em 1964 (MARGARITIS; ZAJIC, 1978). Quanto as propriedades toxicológicas e de segurança a xantana é atóxica e não inibe o crescimento. É não sensibilizante e não causa irritação da pele ou dos olhos. Baseado nisto, a xantana foi aprovada nos Estados Unidos pela Food and Drug Administration (FDA) desde 1969, para uso em aditivo alimentar sem quaisquer limitações de quantidade específicas. No Brasil, o Decreto de Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos permite o uso de xantana em alimentos desde 1965 (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011; LIMA et al., 2001; ROTAVVA, 2005).

A potencial utilização de biopolímeros nos mais diversos setores da indústria é um consenso na literatura existente. De acordo com Rosalam; England (2006), as principais vantagens do uso da xantana em relação a outras gomas são: alta viscosidade em baixas concentrações; alta estabilidade em amplas faixas de pH (2,5-11), em altas concentrações de eletrólitos ( $150 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaCl}$ ) e em variações de temperaturas entre  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; grande escala de produção em curto espaço de tempo por processo fermentativo e por formar soluções aquosas de alta viscosidade, extremamente pseudoplásticas.

Do ponto de vista econômico, a xantana é o polissacarídeo microbiano mais importante com elevado interesse industrial, principalmente para a indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica. Nesses setores observa-se uma contínua

substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana, por inúmeras razões, como a possibilidade de modificação de suas características reológicas através do controle de parâmetros de fermentação, da independência de fatores sazonais para a produção, especificidade da biossíntese dos microorganismos, os quais permitem adicionalmente modificações genéticas, visando obter polissacarídeos com propriedades e características específicas, entre outras (VENDRUSCOLO, 1995; SUTHERLAND, 1997; SOUZA e GRACIA-CRUZ, 2004).

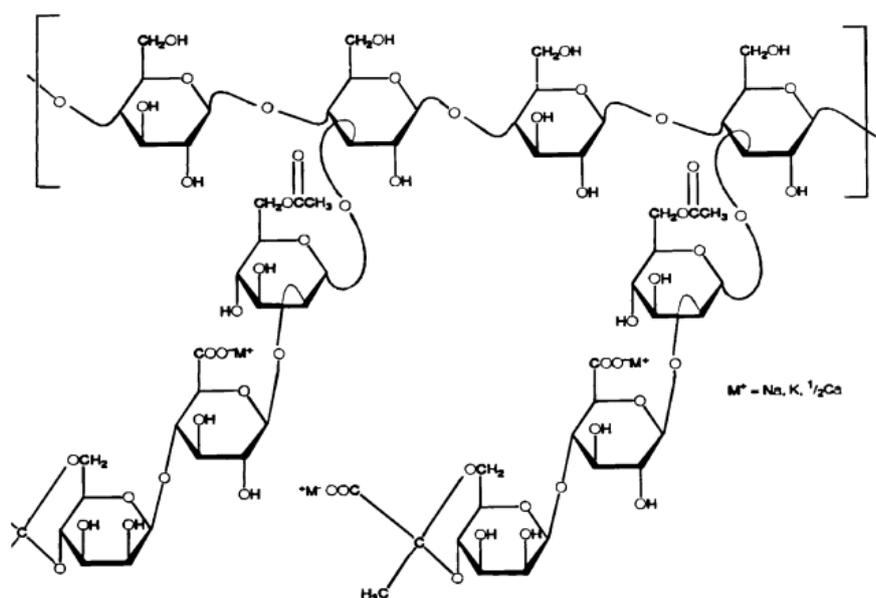
Atualmente, os principais produtores de xantana são o Grupo Fufeng (China), a Merck, Cargill, Kelco e Pfizer (Estados Unidos), Rhône Poulenc e Sanofi-Elf (França), Danisco (Dinamarca) e Jungbunzlauer (Áustria). De toda a goma xantana produzida mundialmente, estima-se que 65% desta seja utilizada na indústria de alimentos, 15% na indústria do petróleo e 20% são utilizadas em outros segmentos da indústria, entre estes, a indústria farmacêutica, cosmética, têxtil e outras (GARCIA-OCHOA et al., 2000; BORGES; VENDRUSCOLO, 2008; ROSALAM; ENGLAND, 2006). O mercado da xantana está estimado em aproximadamente \$270 milhões e é esperado que chegue a \$400 milhões, com uma produção de 80.000 toneladas/ano em 2015 (CARIGNATTO et al., 2011). A demanda por este insumo vem aumentando e estima-se um crescimento anual de 5 - 10% (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

O Brasil segue a tendência mundial de incremento no consumo de xantana, entretanto, toda a goma xantana consumida pelos diversos setores industriais são importadas, enfatizando a relevância de investimentos no setor para uma produção nacional competitiva, uma vez que o Brasil mostra-se com um grande potencial para a fabricação deste polímero em escala industrial, já que o Brasil é um dos maiores produtores de insumos básicos para a produção de xantana: açúcar e álcool do setor sucro-alcooleiro, utilizado para a recuperação do polímero (SOUZA; VENDRUSCOLO, 1999; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009).

### 3.3.1 A Estrutura da Goma Xantana

A Xantana é um heteropolissacarídeo, sendo composta por mais de um monossacarídeo e outros compostos químicos, cuja unidade básica repetidora é um pentassacarídeo, formado por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico na proporção molar de 2,8:2,0:2,0 e grupos piruvato e acetil. A molécula de xantana apresenta uma cadeia principal semelhante à da celulose, constituída de moléculas de glicose ligadas através de ligações  $\beta$ -(1-4), sendo a cadeia lateral formada por um trissacarídeo ligado à segunda glicose da unidade básica. Esta cadeia lateral é formada por uma molécula de ácido glicurônico entre duas manoses. Aproximadamente a metade das D-manoses terminais contém um resíduo de ácido pirúvico ligado através de um grupo cetônico aos carbonos 4 e 6, com distribuição indeterminada. A D-manose ligada à cadeia principal contém um grupo acetila na posição 6 (Figura 3). A presença dos ácidos acético e pirúvico produz um polissacarídeo do tipo aniônico (GARCIA-OCHOA, 2000; SUTHERLAND, 1992).

**Figura 3** - Estrutura do polissacarídeo extracelular de *Xanthomonas*.



Fonte: GARCIA-OCHOA et al., 2010.

A massa molar da goma xantana varia de  $2 \times 10^6$  a  $20 \times 10^6$  Da (Daltons), dependendo da preparação da amostra e do método utilizado na análise (MOITINHO, 2012). Esta distribuição da massa molar depende da associação entre cadeias, dando forma a agregados de diversas cadeias individuais. As variações nas condições de fermentação são fatores que influenciam a massa molar da xantana (GARCÍA-OCHOA et al., 2000, LIMA et al., 2001).

A conformação secundária da xantana é dependente das condições em que a molécula é caracterizada. A molécula pode se apresentar em uma conformação ordenada (nativa ou renaturada) ou desordenada. São propostos dois modelos para a estrutura secundária da molécula de xantana: simples e em dupla hélice; não há consenso quanto à existência de relação entre a natividade 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 produzida está dissolvida. A transição conformacional ordem-desordem é dirigida pela ocorrência de temperaturas acima do ponto de transição e/ou a redução da força iônica. Tanto a manutenção da conformação nativa (ordenada), quanto a renaturada (re-ordenada) dependem dos mesmos fatores (BORN, et al. 2002; RAMOS, 2011).

### **3.4 Propriedades da Goma Xantana**

Segundo Diaz e colaboradores (2004) para um polissacarídeo apresentar propriedades de interesse comercial, este, deve ser capaz de formar, de modo ordenado, estruturas secundárias, terciárias e, às vezes, quaternárias em meio aquoso. Para isso, a estrutura primária não pode constituir-se num impedimento para as associações intermoleculares e intramoleculares. Por sua vez, a xantana é capaz de formar estas estruturas (MORRIS, 1984). As propriedades físico-químicas únicas da xantana superam todos os outros polissacarídeos disponíveis no mercado despertando grande interesse comercial em relação a outras gomas.

A principal característica da xantana é sua capacidade de modificar a reologia ou o comportamento de escoamento das soluções (MARGARITIS; PACE, 1985).

Suas propriedades são determinadas por sua composição química, arranjos e ligações moleculares (PACE; RIGHELATO, 1980). Dentre as principais propriedades de interesse industrial-tecnológico deste polissacarídeo podemos destacar:

- Alta viscosidade a baixa concentração;
- Alta viscosidade a baixas taxas de cisalhamento;
- Alto grau de pseudoplasticidade;
- Alto módulo de elasticidade;
- Baixo grau de tixotropia (comportamento não-newtoniano);
- Excelente estabilidade térmica;
- Resistência à degradação mecânica;
- Facilidade de degradação (Biodegradabilidade);
- Estabilidade frente a enzimas como as celulases, amilases e proteases;
- Excelente solubilidade e estabilidade em ampla faixa de pH;
- Compatibilidade e estabilidade com a maioria dos sais metálicos.

#### 3.4.1 Propriedades Reológicas da Goma Xantana

Reologia pode ser vista como a ciência da deformação e do escoamento da matéria, ou seja, é o estudo da maneira, segundo a qual os materiais respondem à aplicação de uma determinada tensão ou deformação. A deformação aplica-se no caso da matéria sólida e o escoamento quando a matéria é líquida. Todos os materiais possuem propriedades reológicas, de modo que a reologia é uma ciência que pode ser aplicada em diversas áreas de estudo (CANUTO, 2006; TONELI et al., 2005).

Na reologia de sólidos, a propriedade de maior interesse é a elasticidade ao passo que, em líquidos, a viscosidade é a propriedade mais importante. A viscosidade de um material pode ser definida como a propriedade física dos fluidos que caracterizam a sua resistência ao escoamento (TONELI et al., 2005).

Existem duas maneiras gerais de estudar aspectos reológicos: a primeira consiste em desenvolver expressões matemáticas, que possam descrever os

fenômenos reológicos sem fazer maiores referências a suas causas, e a segunda consiste em correlacionar o comportamento mecânico observado com a estrutura detalhada do material em questão (SHAW, 1975). Por meio da análise reológica, ou seja, de análises de viscosidade e viscoelasticidade, têm-se um indicador da qualidade do polímero (AMANULLAH et al., 1996; MARCOTTE et al., 2001; BORGES; VENDRUSCOLO, 2008).

Em relação às propriedades reológicas, as soluções de xantana mostram um comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido. Quando em solução aquosa, a xantana mostra uma transição conformacional entre cadeias ordenadas e desordenadas, dependendo da temperatura, da força iônica e do pH. A viscosidade das soluções praticamente não se altera com a temperatura entre 4 e 93 °C, com o pH entre 1 e 13 e com forças iônicas equivalentes a concentrações de cloreto de sódio entre 0,05 e 1%. Há compatibilidade plena com uma grande diversidade de insumos usados industrialmente, como metais, ácidos, sais, agentes redutores, outros texturizantes, solventes, enzimas, surfactantes e conservantes (ROTTAVA, 2005; TONELI, 2005).

### **3.5 Aplicações da Goma Xantana**

#### **3.5.1 Usos na Indústria Alimentícia**

A produção de biopolímeros microbianos destinados à alimentação humana torna-se muito mais complexa quando comparada a sua utilização em outros produtos, uma vez que devem ser considerados seguros para o consumo e atender aos requisitos das legislações de alimentos em vigor. Apesar dos inúmeros esforços em pesquisas realizadas há mais de três décadas, até agora apenas três polissacarídeos estão aprovados para uso alimentar nos EUA pela FDA: xantana produzida por *Xanthomonas campestris*, gelana por *Sphingomonas* e dextrana por *Leuconostoc* (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007; STREDANSKY et al., 1999).

O uso de xantana na indústria de alimentos tem expressiva importância, sendo este setor o principal consumidor desta goma. Seu uso está presente em uma

série de alimentos com diversas finalidades, por exemplo, textura, aparência, palatabilidade, entre outras, contribuindo com a melhora dos produtos e tendo, conseqüentemente, melhor aceitabilidade no mercado (CANUTO, 2006).

Devido às suas propriedades de suspensão, estabilização, espessante e por exibir propriedades pseudoplásticas a goma xantana é amplamente utilizada na indústria de alimentos, sendo o segundo polissacarídeo de origem microbiana a ser aprovado pela FDA como aditivo em alimentos. A goma exibe a capacidade de manter as propriedades particulares de cada alimento, como a textura, viscosidade, a liberação de sabor, aparência e controla a reologia final do produto, apresentando comportamento pseudoplástico em soluções, característica importante para liberação do sabor, sensação bucal e estética do produto (PETTITT, 1982; ROTTAVA, 2005).

Devido a propriedade de solubilização a goma xantana apresenta um ótimo desempenho como estabilizante e pode ser utilizada nos mais diversos produtos instantâneos como sopas e molhos, sobremesas, bebidas e coberturas proporcionando uma viscosidade uniforme. Ainda apresenta compatibilidade com a maioria dos colóides usados em alimentos, incluindo o amido, tornando-o ideal para a preparação de produtos da panificação: pães, bolos e outros assados com baixo valor calórico e sem glúten (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009; PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011).

### 3.5.2 Usos na Indústria Farmacêutica

Na indústria farmacêutica a goma xantana possui importante aplicação sendo usada principalmente em xaropes, cremes, emulsões e loções, melhora as propriedades dos xampus e de sabonetes líquidos através de sua capacidade de formar soluções viscosas e de estabilizar suspensões. Em comprimidos podem ser usados como agentes formadores de matrizes para liberação controlada, com a finalidade de se obter liberação prolongada e/ou controlada do fármaco. Atua também no desenvolvimento de formulações farmacêuticas isenta de sacarose por

proporcionar viscosidade semelhante à produzida pela sacarose e açúcar invertido (LUBI et al., 2003).

### 3.5.3 Usos na Indústria de Cosméticos

Em cosméticos, a utilização da goma xantana é devido, principalmente, a sua capacidade estabilizante, espessante e emulsificante. Ela melhora a retenção de água e textura em cremes, loções e géis, proporcionando suavidade e maciez devido a sua pseudoplasticidade. Fornece alta viscosidade em baixas concentrações a pastas, ajudando-os a manter sua textura tornando seu aspecto mais liso e uniforme facilitando sua saída do tubo (CANUTO, 2006; JUNGBUNZLAUER, 2013). Em xampus é utilizada para ajustar a viscosidade e a propriedade de escoamento, e como agente suspensor quando há a presença de substâncias insolúveis como pigmentos ou outros componentes ativos (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Também é muito utilizada em desodorantes, cosméticos de cuidados com os cabelos, higiene Oral, cuidados com a pele, sabões e produtos de banho (JUNGBUNZLAUER, 2013).

### 3.5.4 Usos na Indústria Petroquímica

Em reservatórios de petróleo, a recuperação do óleo se compõe de etapas que, sequencialmente, são chamadas de recuperação primária, secundária e terciária ou métodos especiais de recuperação, etc. (BORGES, 2007). Durante a recuperação primária a pressão natural dos fluidos que ocupam os poros do reservatório ou a gravidade, conduz os fluidos do reservatório para o poço em conjunto com técnicas de elevação artificiais (tais como bombas, caso a pressão obtida com a abertura do poço seja muito pequena). Mas apenas cerca de 5-15% do óleo original de um reservatório local normalmente é produzido durante a recuperação primária. Entretanto, com o desenvolvimento de pesquisas e inovações tecnológicas na indústria petrolífera, está se tornando possível obter melhores resultados nas operações de recuperação secundária e suplementar de petróleo e gás natural. Técnicas de recuperação secundária podem prolongar a vida produtiva

de um campo, geralmente por injeção de água ou de gás para deslocar óleo e conduzi-lo para um poço de produção, o que resulta na recuperação de 20 a 60% do óleo original local (ERNST; YOUNG, 2013).

A recuperação avançada de petróleo (Enhanced Oil Recovery – EOR) é caracterizada pela injeção de materiais normalmente estranhos aos presentes no reservatório. Dentro dos métodos especiais de recuperação podemos destacar alguns dos principais: químicos, solventes ou térmicos. Entre os químicos, pode-se citar a injeção de polímeros, surfactantes e de produtos alcalinos para ajudar a diminuir a tensão superficial que, frequentemente, impede gotículas de óleo de se mover através do reservatório. A injeção de solventes engloba os casos de hidrocarboneto miscível, CO<sub>2</sub> miscível e imiscível, nitrogênio e gás natural, que se expandem em um reservatório de óleo para empurrar o óleo adicional para um poço de produção. Os métodos térmicos incluem a injeção de vapor, água quente e combustão *in situ*, que ajuda a diminuir a viscosidade do óleo, tanto leve quanto pesado, e melhora a sua capacidade de fluir através do reservatório (GOWDY; JULIA, 2005; BORGES, 2007; PEGORARO, 2012).

Apesar das etapas de recuperação parecerem seguir uma ordem sequencial nem sempre é conveniente usar essa classificação como uma sequência cronológica, pois na recuperação de óleos pesados, altamente viscosos, ele pode não fluir por meio da pressão natural do reservatório, de tal modo que a energia primária não é suficiente para a recuperação do óleo. Óleos pesados em campos de petróleo ocorrem em inúmeras partes do mundo (PEGORARO, 2012).

A revolução na base de conhecimento dos sistemas biológicos, a partir da biotecnologia moderna vem gerando novas oportunidades de inovação. A MEOR – Microbial Enhanced Oil Recovery – é uma tecnologia promissora de recuperação terciária que utiliza micro-organismos e/ou seus produtos metabólicos na recuperação de óleo residual. Este tipo de recuperação envolve a estimulação de micro-organismos naturais do reservatório ou injeção de consórcios microbianos especialmente selecionados de bactérias naturais no reservatório para produzir eventos metabólicos específicos que levam à melhoria da recuperação de petróleo (THOMAS, 1991).

Devido a alta viscosidade em baixas concentrações, comportamento altamente pseudoplástico e estabilidade da viscosidade frente à salinidade, temperatura e condições alcalinas, a goma xantana passou a ser aplicada em larga escala na indústria do petróleo, tanto em métodos especiais de recuperação de petróleo, quanto em fluido de perfuração de poços (BORGES et al., 2009; COTTRELL; KANG, 1978).

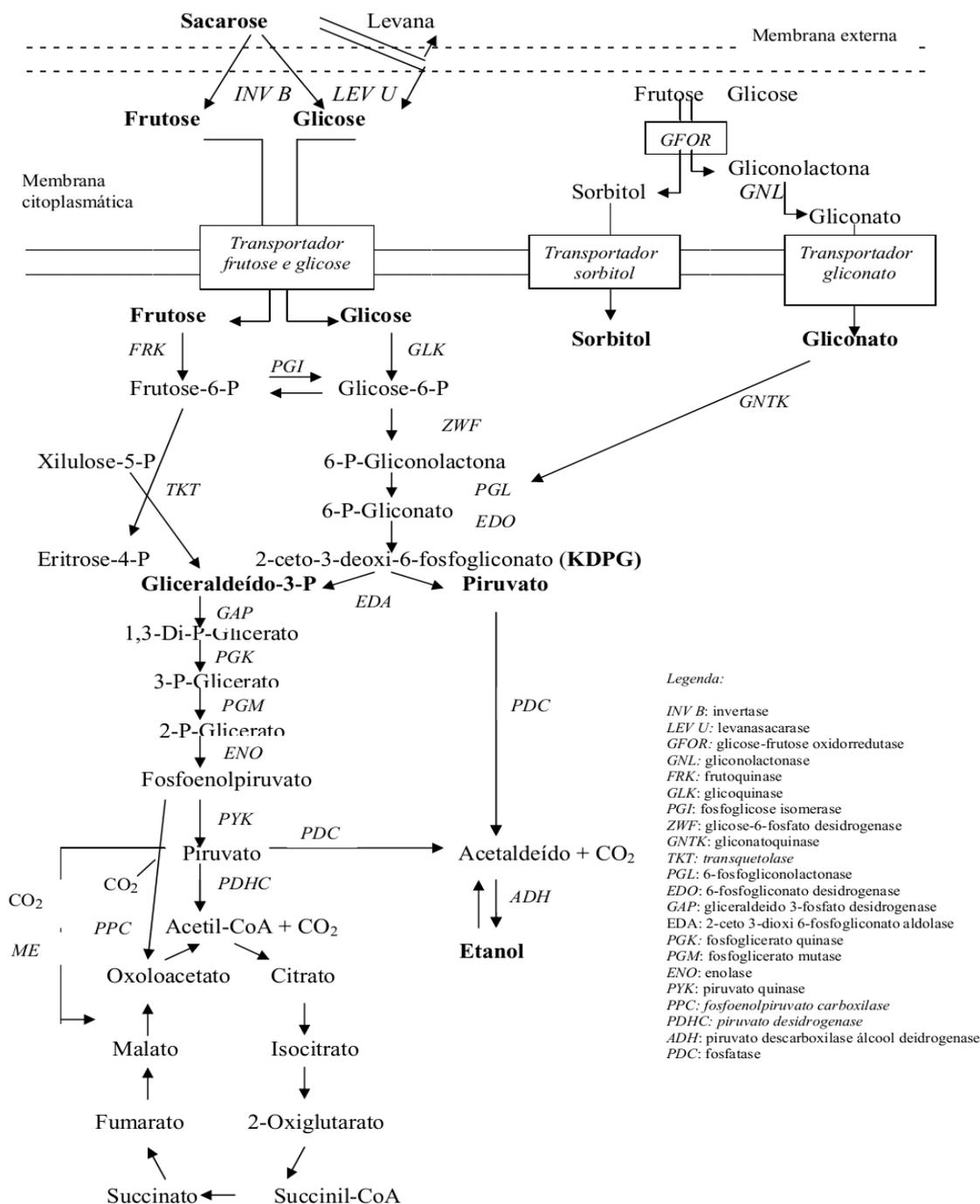
A incorporação da goma xantana representa uma importante contribuição para o progresso dos fluidos com baixo teor de sólidos. É um eficiente agente de suspensão tanto em água doce como em água salgada, mantendo-se estável em altas concentrações salinas. Esta tolerância por sal fez da xantana um dos componentes de grande aplicação em fluidos de perfuração para ambientes ricos em eletrólitos (DARLEY; GRAY, 1988; XIE; LECOURTIER, 1992). Nascimento et al. (2010) enfatiza que aditivos poliméricos e lubrificantes utilizados no desenvolvimento dos fluidos de perfuração desempenharam com êxito as funções de modificadores reológicos, redutores de filtrado e agente lubrificante.

### **3.6. *Zymomonas mobilis***

A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbica facultativa, em formato de bastonetes de 2-6 µm de comprimento por 1-1,4 µm de largura, geralmente aglomeradas aos pares. Podem ser móveis, possuindo de 1-4 flagelos e perdem a mobilidade espontaneamente. Esta bactéria não forma esporos ou cápsulas e também não apresentam lipídios intracelulares e glicogênio (SWINGS; DE LEY, 1977). Foi isolada pela primeira vez em países tropicais a partir de bebidas alcólicas como o "vinho de palm" da África e o "pulque" uma bebida alcólica tradicional Mexicana, obtida a partir da seiva extraída das plantas do gênero *Agave* (*Agave atrovirens* e *Agave americana*). Esta bactéria produz etanol a partir de glicose através da via de Entner-Doudoroff, variação da glicólise na qual a glicose-6-fosfato é convertida em 6-fosfogluconato (como a via das pentoses-fosfato) e a seguir a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato (KDGP) em conjunção com as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase (Figura 4). O etanol e dióxido de

carbono são os principais produtos de catabolismo, quando as células crescem em condições anaeróbicas a partir do consumo da glicose (SPRENGER, 1996; BARATTI; BU'LOCK, 1986).

**Figura 4 - Metabolismo de carboidratos em *Zymomonas mobilis*.**



Fonte: LEMOS e STRADIOTTO (2012), modificado de SPRENGER, 1996.

Nos últimos anos tem-se despertado um grande interesse sobre a utilização da bactéria *Z. mobilis* na produção de etanol combustível, devido ao seu alto potencial na produção de etanol, produzindo aproximadamente 1,9 mol de etanol por mol de glicose, com velocidade três a quatro vezes maior que a *Saccharomyces cerevisiae* e rendimento de etanol, a partir da glicose, de cerca de 97% do valor teórico máximo. Outras características favoráveis, tais como requisitos de crescimento simples, alta tolerância a açúcares (até 400 g/L) e alta resistência a concentrações de etanol (até 12%) faz deste micro-organismo um sério concorrente às leveduras tradicionalmente utilizada em fermentações etanólicas (SPRENGER, 1996).

De acordo Lyness; Doelle (1980), a fermentação quantitativa de glicose, frutose ou sacarose a etanol e dióxido é considerada uma característica importante do gênero *Zymomonas*. Quando a glicose e frutose são utilizadas como fonte de carbono, é obtido rendimento superior a 95% em relação ao rendimento teórico, pois a fermentação produz quase exclusivamente etanol e CO<sub>2</sub>. Quando sacarose, um substrato industrialmente disponível e de baixo custo, é utilizado, o rendimento de etanol representa 75-80% do valor teórico, em função da formação de subprodutos como levana e sorbitol.

Como substratos para o crescimento de *Zymomonas mobilis* são utilizadas principalmente a sacarose, frutose ou glicose como fontes de carbono (SPRENGER, 1996). Embora quando utilizada a sacarose a composição do meio de cultivo pode coexistir com a fermentação etanólica, a produção de alguns subprodutos, tais como a levana (SWINGS; DE LEY, 1977), sorbitol (BARROS; CELLIGOI, 2006) e frutooligossacarídeos (DOELLE et al., 1993) e também a formação de alguns ácidos orgânicos como o ácido glutâmico, ácido acético e acetaldeído (LEIGH et al., 1984).

A produção de levana, durante a fermentação de sacarose, por *Z. mobilis* tem sido relatada por diversos autores (SWINGS; DE LEY, 1977; ANANTHALAKSHMY; GUNASEKARAN, 1999; SENTHIKUMAR; GUNASE-KARAN, 2005) e tem despertado grande interesse devido às suas aplicações em diversas áreas como saúde e alimentação humana.

Muitos micro-organismos como *Bacillus subtilis*, *Aerobacter levanicum*, *Erwinia herbicola*, *Streptococcus salivarius* e *Zymomonas mobilis* produz levana de

alto peso molecular, quando cultivada em meios de sacarose (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). Entre os muitos organismos produtores de levana, *Z. mobilis* é considerado como um candidato potencial para a produção em larga escala.

*Zymomonas mobilis* metaboliza a sacarose por meio de três enzimas: levanasacarase (LevU), extracelular, responsável pela síntese de levana e fruto-oligossacarídeos; a sacarase (InvB), também extracelular, que hidrolisa a sacarose; e a sacarase (SacA/InvA), sem localização nem função bem definidas. (SPRENGER, 1996).

A hidrólise da sacarose por levanasacarase pode produzir glicose, frutose, frutooligossacarídeos e levana, no entanto, a concentração de cada produto depende da concentração inicial de sacarose e na taxa de hidrólise da sacarose ou acumulação de frutose (VIAKARI; LINKO, 1986)

A levana é um exopolissacarídeo obtido pela reação de transfrutossilacção durante a fermentação de culturas crescidas em meio rico em sacarose, mas não em frutose, glicose ou de sua mistura. A levana pode ser chamada também de polifrutana por ser constituída de moléculas de frutose (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). Seu peso molecular pode atingir valores em torno de aproximadamente  $10^7$  Daltons, correspondente a aproximadamente 60.000 unidades de frutose unidas por ligações  $\beta$ -(2-6). Os polímeros de levana são lineares ou ramificados (graus variáveis) na hidroxila do carbono 1 (MURO et al., 2000).

A potencialidade do uso de polissacarídeos de origem microbiana em diversos setores da indústria é um consenso na literatura existente e são atribuídas às suas propriedades e características específicas. A levana tem despertado grande interesse devido às suas aplicações em diversas áreas de saúde e de alimentação humana. Na indústria de alimentos, a levana tem vários usos potenciais, tais como: agente espessante, fixador de cores e sabores e em produtos dietéticos. Suas aplicações estão relacionadas às suas propriedades reológicas que podem ser usadas como emulsificante, estabilizante em formulações de produtos alimentícios, outras aplicações como agente encapsulante, crioprotetor e osmorregulador, são atribuídas (CAVALCANTI, 2013).

Na área da saúde a levana possui diversas aplicações tais como substituto do plasma sanguíneo (THACHENKO; SEVRYUGINA, 1989), agente prolongador da

ação de fármacos, preparação de frutose altamente purificada para uso médico, fator de promoção do desenvolvimento de *Bifidus*, agente hipocolesterolêmico (LIEPA et al., 1993) e como imunomodulador e anticarcinogênico (CALAZANS et al., 2000; YOO et al., 2004).

O potencial de aplicação da levana nos setores alimentício e farmacêutico tem estimulado investigações constantes em busca da compreensão das vias metabólicas envolvida na síntese de levana e em sua função fisiológica. Há também um interesse na biologia dos micro-organismos produtores visando a regulação da sua formação e otimização do processo de produção (OLIVEIRA et al., 2007; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2011).

### **3.7 Fatores que Influenciam na Produção de Exopolissacarídeos**

Inúmeras estratégias têm sido utilizadas para otimizar a produção de exopolissacarídeos. É importante considerar que diversos fatores afetam a produção de EPS, tais como: A espécie e linhagem bacteriana, composição do meio, condições operacionais (temperatura, pH, rotação e aeração), podendo obter variações no rendimento e na qualidade do polímero produzido (GARCIA-OCHOA, 2000).

A seleção da linhagem bacteriana pode ser considerada um dos primeiros passos para o processo de produção de exopolissacarídeos (LUVIELMO et al., 2007). Diversos estudos evidenciam uma dependência da linhagem utilizada na fermentação com as propriedades do polímero produzido. A busca por micro-organismos produtores de polissacarídeos com propriedades funcionais que sejam economicamente viáveis é um desafio. Segundo Meneses (2013) a linhagem é uma das variáveis responsáveis pela variação na estrutura da xantana e, conseqüentemente, em suas propriedades.

Segundo Luvielmo; Scamparino (2009) em processos que visam à produção de biopolímeros, a cepa microbiana deve ser conservada por longos períodos, através de métodos que mantenham as propriedades desejadas da cepa.

Dentro das estratégias de melhoramento do processo para a produção de EPS, as cepas são selecionadas e melhoradas por vários métodos convencionais. O objetivo da modificação genética pode ser a melhoria das propriedades requeridas para a sua aplicação, para se adequar ao meio suplementado, melhorar o rendimento do produto, o desempenho, reduzindo o tempo de fermentação ou para simplificar a recuperação e purificação em processos seguintes (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

A produção de um inóculo de boa qualidade é um dos fatores que estão envolvidos na síntese de biopolímeros em processos fermentativos, sendo uma das etapas iniciais em processos fermentativos e consiste na preparação de uma população de micro-organismos a partir de uma cultura estoque, que deve estar em bom estado fisiológico para que possam ser utilizados para a produção em fermentadores (WEBB; KAMAT, 1993). Dependendo das condições de propagação, células bacterianas individuais dentro de uma mesma população podem ser muito heterogêneas em relação ao seu estado fisiológico e sensibilidade ao stress ambiental (HORNBAEK et al., 2004).

Trabalhos como o de Pan et al. (2000) demonstram a importância da etapa de inoculação em processos fermentativos. Neste trabalho foi avaliado a concentração inicial do inóculo no crescimento celular e na qualidade da goma xantana produzida por *Xantomonas campestris* pv. *pruni* cepa 06. Os resultados demonstraram que os tratamentos com menor concentração inicial de células apresentaram menor produção e viscosidade aparente (cP) para os biopolímeros, além de grandes flutuações na curva de crescimento celular durante a fermentação.

Segundo Garcia-Ochoa et al. (2000) durante a produção do inóculo, o objetivo é aumentar a concentração de células, limitando a produção do biopolímero, pois este quando liberado no meio envolve as células dificultando a transferência de nutrientes e oxigênio levando as células à morte. Para a produção em fermentador é usualmente utilizado um volume de inóculo entre 5 e 10% do volume total do caldo.

A temperatura é um dos fatores físicos mais críticos para a produção de biopolímeros. As temperaturas empregadas para o maior crescimento celular e maior produção de exopolissacarídeos ocorrem na faixa de 25 a 35 °C, onde cada

linhagem bacteriana pode apresentar uma temperatura ótima distinta (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

Esgalhado et al. avaliando o efeito da temperatura sobre a produção de xantana, pela cepa *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, demonstrou que valores ótimos para a produção foram encontrados com uma temperatura de 30 °C e que valores acima (35 °C) e abaixo (25 °C) avaliados, diminuem a produção.

A produção de polissacarídeos e o crescimento celular também são influenciados pelo pH. Pesquisas apontam o pH neutro como o ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que, o pH do caldo pode decrescer do pH neutro até pH próximo a 5, pela presença de grupos ácidos na xantana (GARCIA-OCHOA et al., 2000), ou pode aumentar, dependendo da composição do meio e da cepa utilizada.

Segundo Ernandes e Garcia-Cruz (2005), o pH ótimo para a atividade da enzima levanasacarase, presente em *Zymomonas*, é de 6,5, podendo ser utilizado pH com valores menores para a produção adequada de levana pela mesma enzima em meio contendo sacarose.

A agitação e a aeração são parâmetros necessários para a síntese de polissacarídeos, que na grande maioria são produzidos em condições aeróbicas. A aeração é muito importante para evitar a condição de anaerobiose provocada pela alta viscosidade do meio quando o polissacarídeo é produzido. Estes parâmetros precisam ser investigados a fim de evitar a limitação na transferência de oxigênio e condições de estresse hidrodinâmico (CASAS et al., 2000; GARCIA-OCHOA, 2000).

Para o crescimento e reprodução as células necessitam de nutrientes para a síntese de membrana, proteína, parede celular, cromossomo e outros componentes. O fato de diferentes micro-organismos utilizarem diferentes fontes de carbono e energia mostra que diferentes micro-organismos não utilizam o mesmo mecanismo químico interno. A estrutura primária da goma não se altera com as diferentes fases do crescimento e nem com alterações do meio de crescimento, seja a fonte de carbono ou de nutrientes limitantes, mas podem afetar a estrutura das cadeias laterais, a massa molecular e o rendimento da goma, assim, diferentes fases de crescimento e condições da cultura pode influenciar nas propriedades da goma (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

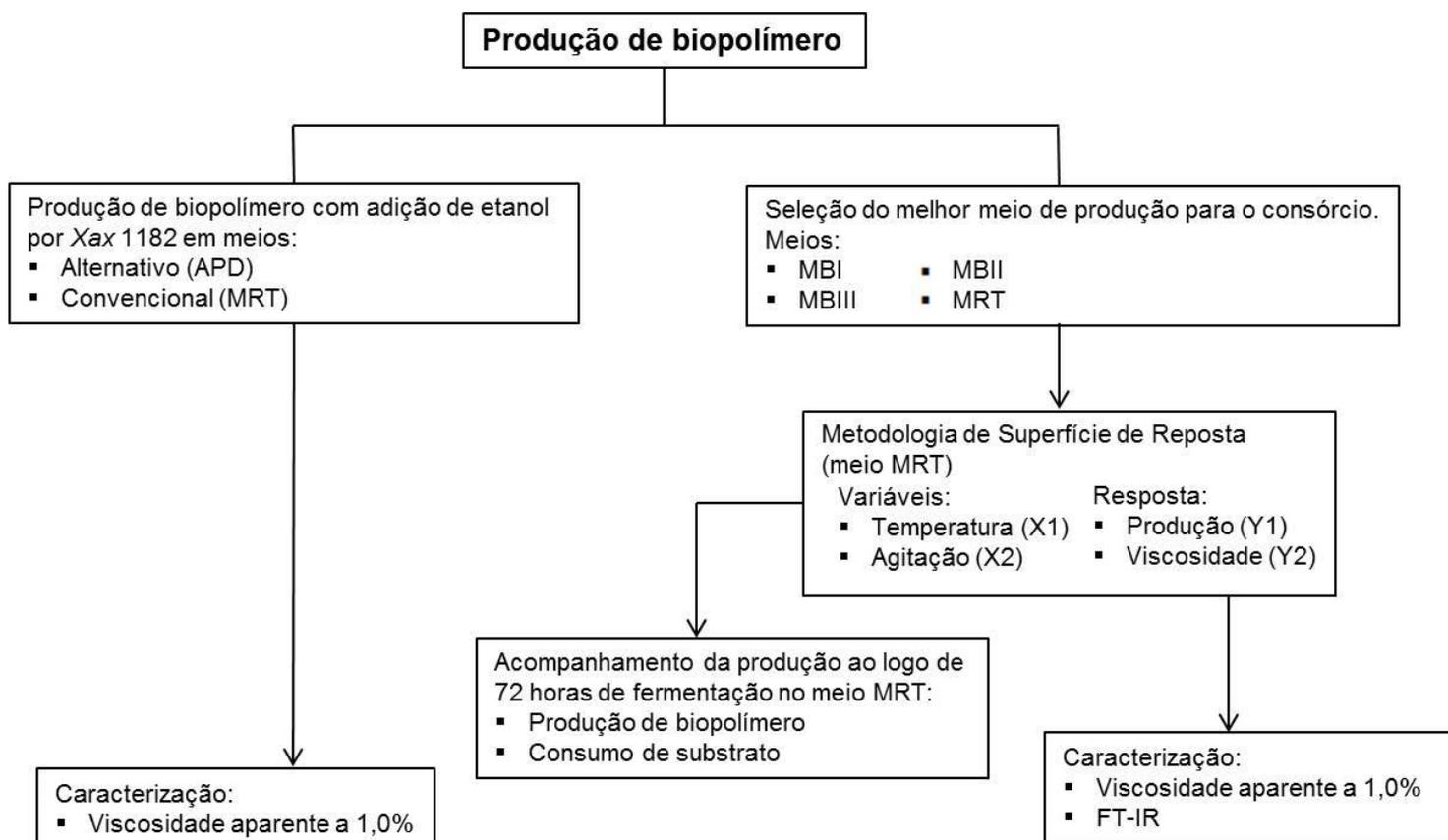
É necessário que o meio para a produção industrial de biopolímeros proporcione um equilíbrio entre as concentrações necessárias para o crescimento e para a formação de goma. Os requerimentos nutricionais mínimos necessários do meio fermentativo para a biossíntese de xantana são as fontes de carbono (C), nitrogênio (N) e fósforo (P) (BRANDÃO et al., 2010).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fluxograma da Metodologia Adotada para Avaliar a Produção de Biopolímero

Para o entendimento da metodologia adotada para avaliar a produção e caracterização dos biopolímeros, foi esquematizado um fluxograma destacando as principais etapas seguidas neste trabalho para obtenção dos biopolímeros em estudo (Figura 5).

**Figura 5** - Fluxograma das etapas dos experimentos adotados para a produção e caracterização dos biopolímeros.



## 4.2 Meios de Cultura

Nos experimentos foram utilizados diversos meios de cultura, de acordo com as necessidades de cada etapa do processo. Os meios usados neste trabalho estão sumarizados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Meios de cultura utilizados nas diversas etapas do trabalho.

Nomenclatura dos meios	Composição (g/L-1)	Item de referência	Referência
Hogness	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 6,3; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,8; citrato de sódio 0,45; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,09; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.9; glicerol 44 mL.	Item 4.3	Hogness, D.S.; Simmons (1964)
YM*	glicose 10,0; extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0.	Item 4.3	Haynes et al. (1955)
ZM*	peptona 10,0; extrato de levedura 10,0; glicose 20,0.	Item 4.3	Protocolo CCT*
APD*	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5,0; extrato de levedura 0,5; citrato de sódio 1,0; sacarose 20,0 e glicerina bruta 20,0 a base de água produzida.	Item 4.5.2	Ramos (2011)
MRT*	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5,0; NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,5; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0,006; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>2</sub> 2,0; FeCl <sub>3</sub> 0,0024; ZnSO <sub>4</sub> 0,002; CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,002; sacarose 50,0.	Item 4.5.2 Item 4.7	Rottava (2005)
MBI*	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5,0; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,5; C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NNaO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 0,1; ext. de levedura 0,1; sacarose 40,0.	Item 4.7	Modificado de Ramos (2011)
MBII*	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5,0; (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,5; C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NNaO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 0,1; ext. de levedura 0,1; xarope de glicose 40,0.	Item 4.7	Modificado de Ramos (2011)
MBIII*	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5,0; ext. de levedura 0,5; citrato de Sódio 1,0; sacarose 40,0.	Item 4.7	Modificado de Ramos (2011)

\*YM (Yeast Malt); ZM (Zymomonas Medium); APD (Meio a base de água produzida); MRT (Meio extraído de Rottava, 2005); MBI, MBII, MBIII (Variações do meio Ramos, 2011); Protocolo CCT (protocolo de crescimento da *Z. mobilis* CCT 4494, fornecido pela FAT)

## 4.3 Micro-organismos

Para o presente estudo foram selecionadas duas linhagens do gênero *Xanthomonas* e uma linhagem do gênero *Zymomonas*. As linhagens utilizadas

foram: (i) *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihot* 1182 (*Xax* 1182), oriunda da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF), Campinas – SP, (ii) *Xanthomonas campestris* CCT 0001 (*Xac* 0001) e (iii) *Zymomonas mobilis* CCT 4494 (*Zym* 4494), ambas cedidas pela Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello (FAT) Campinas, SP – Brasil, tendo, respectivamente, as nomenclaturas e os respectivos códigos de identificação citados acima.

A fim de verificar algumas características morfológicas das colônias, foram realizados ensaios de coloração de Gram e semeadura em estrias em ágar YM (Yeast Malt) e ágar ZM (*Zymomonas* Medium), para as linhagens de *Xanthomonas* e *Zymomonas*, respectivamente.

Para preservar as culturas e diminuir o risco de alteração no perfil genético, foi realizado o congelamento das linhagens em Ultra-freezer da marca Thermoelectron (2006) a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O procedimento de congelamento constou das seguintes etapas: incubação da cultura em meio YM líquido para a *Xanthomonas*, e meio ZM líquido para a *Z. mobilis* a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sob agitação de 120 rpm por 24 horas; adição de 0,5 mL do inóculo e 0,5 mL do meio Hogness (Tabela 2); homogeneização da mistura, sendo a suspensão aliquoteada em microtubos estéreis (1,5mL), devidamente identificados; e congelamento imediato em Ultra-freezer  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica.

As linhagens de *Xax* 1182 e *Xac* 0001 foram reativadas em meio YM e para a linhagem *Zym* 4494, foi utilizado o meio ZM (Tabela 2). As culturas foram incubadas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24h. Após esse período foram feitos os inóculos para os meios fermentativos.

#### **4.4 Curva de Crescimento**

##### **4.4.1 Curva da *Zymomonas mobilis* CCT 4494 (*Zym* 4494)**

Foi realizado uma curva de crescimento celular para a *Zymomonas mobilis* CCT 4494 através da transferência asséptica de 1 mL de inóculo inicial em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio ZM líquido. Estes foram incubado

em agitador orbital, com agitação de 120 rpm, a 28 °C ± 2 °C. Foram utilizados 3 Erlenmeyers para cada tempo avaliado, sendo em seguida sacrificados. Inicialmente amostras foram retiradas a cada 4 horas, prosseguindo com retiradas a cada 6 horas a partir do período de 24 horas de crescimento, durante 72 horas de crescimento.

A avaliação do crescimento celular foi realizada por leitura de absorbância e contagem expressa em UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Para a análise da densidade óptica, foi utilizado o Espectrofotômetro (HAch, HACH DR/2500) em comprimento de onda de 560nm contra um branco constituído pelo meio de cultura ZM sem inóculo. Para a contagem de UFC, foi utilizado meio de cultura ZM ágar para a semeadura das culturas através da técnica de disseminação com alça de *Drigalsky* e diluição seriada com solução salina 0,9%. A contagem das colônias foi feita após um período de 16 a 24 horas após a semeadura. A curva de crescimento microbiana foi construída a partir dos dados de absorbância e contagem total. Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### 4.4.2 Curva da *Xanthomonas axonopodis* pv *manihot* 1182 (*Xax* 1182)

A construção da curva da *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihot* 1182 se deu com a mesma metodologia empregada para a *Zymomonas mobilis* CCT 4494, alterando apenas o meio de ativação e crescimento, que foram, respectivamente, ágar Yeast Malt (YMA) e Yeast Malt (YM).

A estirpe utilizada neste trabalho é oriunda da reclassificação taxonômica da *Xanthomonas campestris* pv *manihot* – 1182, que passou a se chamar *Xanthomonas axonopodis* pv *manihot* – 1182 (VAUTERIN et al, 2000). Contudo, muitos trabalhos ainda trazem a antiga nomenclatura da *X. campestris* pv *manihot*.

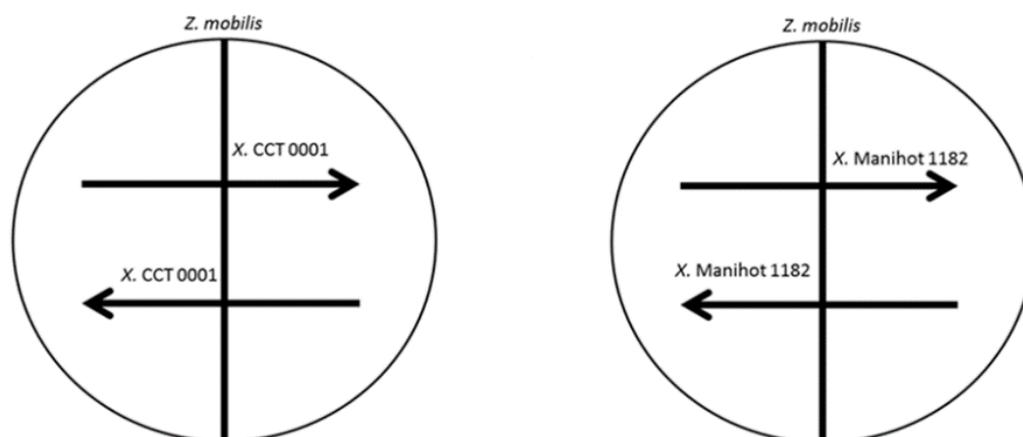
#### 4.6 Teste de Compatibilidade entre as Cepas Seleccionadas

Foram realizados testes para verificar se a cepa da *Zym* CCT 4494 cresciam em cultivo consorciado, juntamente com as cepas de *Xac* 0001 e *Xax* 1182, seleccionadas para o processo de produção.

As cepas foram ativadas em Erlenmeyer de 250mL contendo 50 mL de meio YM e ZM líquido, para as cepas de *Xanthomonas* spp. e *Zymomonas*, respectivamente. Os Erlenmeyers foram colocados em incubadora (Tecnal, TE – 424), com agitação de 120 rpm e mantidos a uma temperatura de  $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , por 24 horas. Após esse período, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada cultura foram semeadas por estrias em placa de Petri contendo meio ágar ZM e incubados em estufa bacteriológica a  $28^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$  por 24 horas.

Para a realização do teste de compatibilidade, culturas das estirpes *Xax* 1182 e *Xac* 0001 foram testadas contra a cepa de *Zym* 4494, como mostra o esquema ilustrado na Figura 6. Uma placa contendo culturas puras de cada bactéria serviu de tratamento controle. As placas foram avaliadas com 24 e 48 horas, realizada através de análise visual, observando o crescimento da cultura e/ou formação de halo de inibição. Foram feitas duplicatas para cada ensaio.

**Figura 6** - Esquema do teste de compatibilidade entre as linhagens de *Xanthomonas* spp. e *Z. mobilis*.



#### 4.5 Avaliação do Efeito da Adição de Etanol na Produção de Biopolímero por *Xanthomonas* sp. em Meio Convencional e Alternativo à Base de Água Produzida da Indústria do Petróleo

Neste item, encontra-se a metodologia utilizada para avaliar o efeito da adição de etanol na produção de goma xantana, pela linhagem *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihoti* 1182 (Xax 1182).

Para avaliar a influência do etanol no processo de produção da xantana, pequenos volumes de álcool etílico absoluto P.A. (Etanol) foram adicionados ao longo do processo, em intervalos de 12 horas, até atingir as concentrações finais de 2, 3 e 4% e comparados com o controle (sem adição de etanol), de acordo com o planejamento experimental apresentado na tabela 3. Para todas as concentrações, incluindo o controle, a produção da goma foi avaliada nos tempos de 24 e 72 horas.

A fragmentação do volume de etanol até que alcançasse a concentração final desejada para cada tratamento, teve como medida diminuir o possível estresse à bactéria causada pela abrupta elevação de álcool no meio e, ao mesmo tempo, como condições simulatórias para o cultivo em consórcio com as cepas Xax 1182 e Zym 4494 (itens subsequentes), de maneira a empregar uma elevação gradativa da concentração de etanol ao meio.

**Tabela 3** - Planejamento experimental para a adição de etanol, em diferentes concentrações, aos meios de produção de goma xantana.

Vol. final etanol	Tempo (horas)						
	Volumes adicionados ao longo da produção (µL)						
	0	12	24	36	48	60	72
<b>Controle</b>	-	-	-	-	-	-	-
<b>1000 µL (2%)</b>	-	74	150	200	250	326	-
<b>1500 µL (3%)</b>	-	112	224	300	376	488	-
<b>2000 µL (4%)</b>	-	150	300	400	500	650	-

#### 4.5.1 Produção de Células para Inóculo

Para a produção do inóculo, inicialmente preparou-se o pré-inóculo partindo da reativação da cultura mantida à  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  em ultra-freezer e transferindo-a para 50 mL de meio YM líquido, em Erlenmeyers autoclavados com capacidade de 250 mL. Os Erlenmeyers foram incubados em agitador orbital, shaker (Innova, New Brunswick), a 120 rpm e mantidos a temperatura de  $28^{\circ} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas.

A segunda etapa teve início após as 24h, onde ocorreu o preparo do inóculo. Este preparo se deu através da transferência asséptica de 1000  $\mu\text{L}$  de pré-inóculo para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio YM. O inóculo foi então incubado em agitador orbital, com agitação de 120 rpm, a uma temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , até atingir a densidade ótica de 2,0 ( $\text{DO}_{560\text{ nm}} = 2,0$ ), que correspondeu ao ótimo da fase exponencial da cepa utilizada. Essa faixa de absorbância é atingida em torno de 12 horas de incubação e corresponde a uma concentração celular em torno de  $10^{10}$  UFC/mL de acordo os dados obtidos a partir da curva de crescimento.

#### 4.5.2 Produção de Goma Xantana

A produção de goma xantana foi realizada em Erlenmeyers com capacidade para 250 ml, contendo 50 mL dos meios de produção convencional (MRT) e alternativo (APD), a base de água produzida da indústria do petróleo, suplementados com sacarose e Glicerina Bruta (Tabela 2). O meio APD foi posteriormente pasteurizado a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos (RAMOS, 2011). Já o meio MRT foi autoclavado a temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos (ROTTAVA, 2005).

Os meios de produção foram inoculados com 14% (v/v) de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihot* 1182, incubados em agitador orbital a 180 rpm, a  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; ESGALHADO et al., 1995; PSOMAS et al., 2007) e avaliados nos tempos de 24 e 72 horas, após a adição de álcool segundo o planejamento experimental (Tabela 3).

#### 4.5.3 Recuperação do Biopolímero

Para a obtenção do biopolímero o caldo de fermentação de 72 horas foi centrifugado em uma velocidade de 5500 rpm por um tempo de 40 minutos, a uma temperatura de 4 °C, para a remoção das células. Ao sobrenadante foi adicionado etanol (1:3, v/v) para a precipitação da goma, sendo observada imediatamente a formação do precipitado. A goma precipitada foi armazenada sob refrigeração ( $\pm 4$  °C) durante 12 horas. Transcorrido o tempo de refrigeração as amostras foram novamente centrifugadas em uma velocidade de 7000 rpm, durante 30 minutos, a uma temperatura de 4 °C, para recuperação do biopolímero precipitado que foi mantido em estufa (50 °C  $\pm$  5 °C/ 24 horas) até atingir massa seca constante. O polissacarídeo foi armazenado em frasco vedado para as análises posteriores (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; GIAVASIS et al., 2003; PACE, 1991).

#### 4.7 Avaliação da Produção de Biopolímero em Diferentes Meios Utilizando as Linhagens *Xax 1182* e *Zym 4494*

A fim de verificar a produção pelas linhagens *Xax 1182* e *Zym 4494*, na fase preliminar dos ensaios, consideraram-se quatro situações distintas em termos de suplementação dos meios adotados com vistas à biossíntese de biopolímero. O meio de produção mais completo (MRT), mostrado na Tabela 2, foi extraído de Rottava (2005). As demais composições dos MBI, MBII e MBIII foram investigadas a partir de modificações do meio descrito por Ramos (2011), por exclusão de algumas substâncias (Tabela 2).

##### 4.7.1 Produção de Células para Inóculo

A produção de células foi realizada como descrito no item 4.5.1 empregando os meios ZM e YM para as linhagens *Zym 4494* e *Xax 1182*, respectivamente.

O preparo do inóculo da *Zym* 4494 se deu até  $DO_{560\text{ nm}} = 1,0$  que correspondeu ao ótimo da fase log desta cepa. Essa faixa de absorvância é atingida em torno de 16h de incubação e equivale a uma concentração celular em torno de  $10^9$  UFC/mL.

#### 4.7.2 Produção e Recuperação do Biopolímero

A produção e a recuperação da goma foram realizadas como descrito nos itens 4.5.2 e 4.5.3. Para avaliação da produção do consórcio, os meios MRT, MBI, MBII e MBIII (Tabela 2) foram inoculados com 7,0% (v/v) do inóculo *X. axonopodis* pv. *manihot* 1182 e 7,0% (v/v) do inóculo de *Z. mobilis*. Também foi avaliado a produção de polímero por cada cepa isoladamente, inoculando 14% (v/v) do inóculo de cada cepa, sendo então incubados em agitador orbital a 180 rpm, a temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 72 horas.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foram avaliadas como variáveis resposta a produção de biopolímero.

### 4.8 Avaliação do Efeito das Variáveis de Processo (Temperatura e Agitação) por Meio da Metodologia de Superfície de Resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (ou RSM, de Response Surface Methodology), é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas usada para a modelagem e análise de problemas em que se permite selecionar a combinação dos níveis ótimos dos fatores na obtenção da melhor resposta para um determinado processo ou produto.

Para avaliação da produção de biopolímero do consórcio microbiano foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) (fatorial completo)  $2^2 + 4$  nas condições axiais, mais triplicata no ponto central, totalizando 11 ensaios.

Os valores utilizados no planejamento estão apresentados na tabela 4 e o planejamento experimental na Tabela 5.

**Tabela 4** - Valores estabelecidos para o planejamento fatorial da variação da temperatura (X1) e agitação (X2) no consórcio microbiano para a produção e propriedades do biopolímero.

	Níveis das Variáveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
<b>Temperatura (X1)</b>	22	24	28	32	34
<b>Agitação (X2)</b>	95	120	180	240	265

**Tabela 5** - Planejamento experimental dos ensaios com diferentes condições de temperatura (°C) e agitação (rpm) no consórcio microbiano para a produção de biopolímero.

Nº de Ensaios	X1	X2
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	-1,41
8	0	+1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

As duas variáveis independentes avaliadas foram: X1 = Temperatura (°C), X2 = agitação (rpm) tendo como resposta a produção (Y1 = produção em g.L<sup>-1</sup>) e a viscosidade (Y2 = viscosidade em cP) do biopolímero, obtendo assim a melhor relação da faixa de temperatura e velocidade de agitação na concentração e propriedades do biopolímero. Após a fermentação, o meio seguiu as etapas de recuperação descritas no item 4.5.3.

## 4.9 Avaliação do Consumo de Substrato e Formação de Produto

Com o objetivo de avaliar o desempenho do consórcio microbiano no consumo de substrato e formação de exopolissacarídeos, foi realizada uma fermentação utilizando o meio de produção selecionado a partir do item 4.7, que obteve a melhor relação C:N e melhor produção de biopolímeros. As condições ótimas de crescimento para a produção de biopolímero (temperatura e agitação) foram determinadas após análise dos resultados obtidos no item 4.8.

A biomassa celular não pode ser determinada devido às duas linhagens envolvidas no consórcio apresentarem necessidades nutricionais muito similares, dificultando a implementação de meios seletivos para contagem em placa. Ao passo que a contagem na mesma placa foi dificultada, pois a *Xax 1182* exibiu uma velocidade de crescimento maior que a da *Zym 4494*, impossibilitando a visualização do crescimento da mesma.

A análise de consumo de substrato foi realizada pela determinação de açúcares totais pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

## 4.10 Caracterização do biopolímero

### 4.10.1 Análise da Viscosidade Aparente

Foram analisadas a viscosidade aparente das soluções dos biopolímeros resultantes da produção dos meios inoculados com *Xax 1182* e *Zym 4494* produzidas.

Após a secagem em estufa a 50 °C, o biopolímero foi acondicionado sob vácuo em dessecador para posterior preparo da sua solução a 1% (m/v) em água deionizada a 25 °C. O procedimento de hidratação da solução a 1% foi realizado sob agitação magnética e aquecidas a 60 °C até total dissolução da goma (RAMOS, 2011; ZHANG et al., 1996).

As análises da viscosidade das amostras foram realizadas em Reômetro Brookfield Rotacional, modelo LVDV III+, acoplado a um banho-maria, utilizando-se

o adaptador para pequenas amostras, *spindle* 18, o que permite variar a taxa de cisalhamento de 0 a 264 s<sup>-1</sup> e a viscosidade de 1,3 a 30000 cP. As leituras foram realizadas em intervalos de 10 segundos, variando-se a taxa de cisalhamento (0-264 s<sup>-1</sup>).

As unidades de medida utilizadas são: centipoise (cP) = m.Pa.s, para viscosidade aparente, 1/segundo (s<sup>-1</sup>) para taxa de cisalhamento e dyna/centímetro quadrado (D/cm<sup>2</sup>) para tensão de cisalhamento.

#### 4.10.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FT-IR

As análises espectroscópicas de infravermelho foram executadas na Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia. Amostras de xantana comercial e biopolímero obtidas a partir de condições otimizadas do consórcio microbiano foram analisadas em equipamento Shimadzu IRAffinity-1 FTIR Spectrophotometer, operando em janela espectral de 400 a 4000 ondas.cm<sup>-1</sup>. Foram preparadas em pastilhas de KBr seco (padrão cromatográfico, 100 mg) com aproximadamente 1 mg de amostra purificada. A mistura foi então prensada em uma prensa hidráulica (Bovenau, P15 ST) usando um molde (ICL, ICL's Macro/Micro KBr die) e 7 toneladas de pressão. Antes da análise de cada amostra o equipamento foi programado para realizar um espectro de background do ar, sendo este utilizado para descontar a influência dos componentes do ar no espectro.

Foram adquiridos sequencialmente três espectros para cada amostra, os quais foram processados e analisados com auxílio do Software do próprio equipamento.

#### 4.11 Análise Estatística

Os resultados da produção de biopolímero foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e submetidas a testes de comparação de média a 5% de

probabilidade. Todos os valores são apresentados em médias. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software Estatística 7.0.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

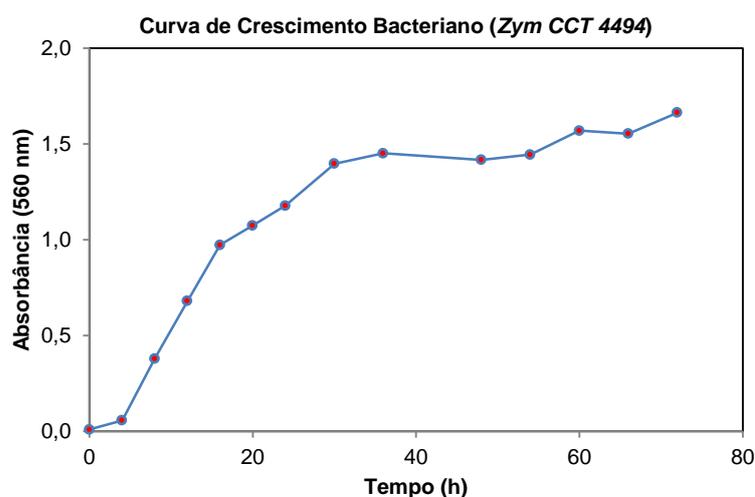
### 5.1. Curva de Crescimento

#### 5.1.1 Curva da *Zymomona mobilis* CCT 4494 (*Zym* 4494)

Esta etapa foi essencial para a padronização do inóculo resultando em maior confiabilidade e reprodutibilidade aos experimentos.

A curva de crescimento para a *Zym* 4494 pode ser observada na Figura 7, onde se verifica que a máxima velocidade de crescimento da fase logarítmica ocorreu em torno das 16 horas de incubação a uma temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com agitação de 120 rpm. Esta faixa de tempo de incubação corresponde a uma concentração celular média de  $10^9$  UFC/mL, sendo, portanto, essa concentração celular utilizada como inóculo. É possível, ainda, observar um segundo estágio da fase exponencial, ou seja, uma segunda inclinação da reta entre 16 e 36 horas, isso ocorre muito provavelmente pelo fato da bactéria iniciar a produção de biopolímero.

**Figura 7** - Curva de crescimento bacteriano da *Zym* 4494, em meio ZM,  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 120 rpm.



Os dados obtidos da curva de crescimento por contagem (UFC/mL) foi correlacionados com os dados de absorbâncias através da regressão linear

referente à fase log da curva de crescimento, plotando-se os valores absorvâncias *versus* log dos valores das contagens obteve-se a seguinte equação (Eq.1) e  $R^2$ :

$$y = 0,1039x + 6,7296 \quad \text{Eq. 1}$$

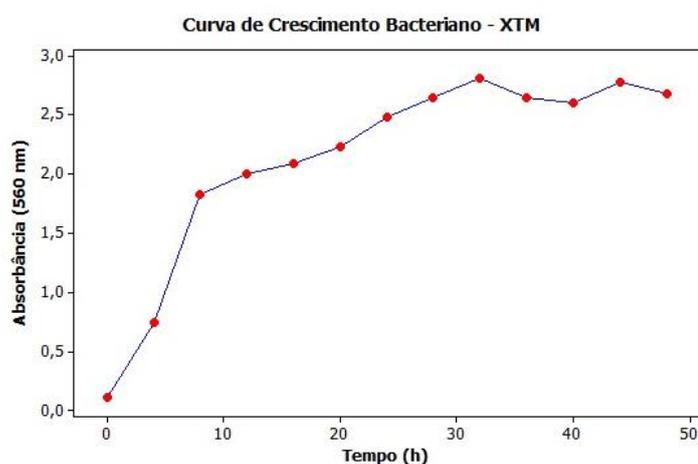
$$R^2 = 0,9444$$

Com esta equação é possível, dentro da fase exponencial, que ocorreu entre 4 e 16 horas, conhecendo-se a absorvância em 560 nm, estabelecer os valores médios de concentração celular (UFC/mL).

### 5.1.2 Curva da *Xanthomonas axonopodis* pv *manihot* 1182 (*Xax* 1182)

Os dados da concentração celular correspondente ao ótimo da fase exponencial da cepa *Xanthomonas* pv *manihot* 1182 (*Xax* 1182) pode ser observadas na figura 8, onde se verifica que a máxima velocidade de crescimento ocorre na fase logarítmica em torno das 12 horas de incubação à temperatura de 28°C, com agitação de 120 rpm. Esta faixa de tempo de incubação corresponde a uma concentração celular média de  $10^{10}$  UFC/mL, sendo, portanto esta concentração celular utilizada como inóculo. De mesmo modo que ocorre com a *Zym* 4494, é possível visualizar um segundo estágio na fase exponencial relacionado à produção de biopolímero.

**Figura 8** - Curva de crescimento bacteriano da *Xax* 1182, em meio YM, 28 °C ± 2 °C a 120 rpm.



Através da regressão linear referente à fase log, que ocorreu entre 4 e 12 horas da curva de crescimento, plotando-se a média das absorbâncias *versus* o log da média das contagens, obteve-se a seguinte equação (Eq. 2) e  $R^2$  para a *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihot* 1182:

$$y = 0,1446x + 0,5475 \quad \text{Eq. 2}$$
$$R^2 = 0,969$$

Com esta equação é possível, dentro da fase exponencial, conhecendo-se a absorbância em 560 nm, estabelecer os valores médios de concentração celular (UFC/ mL).

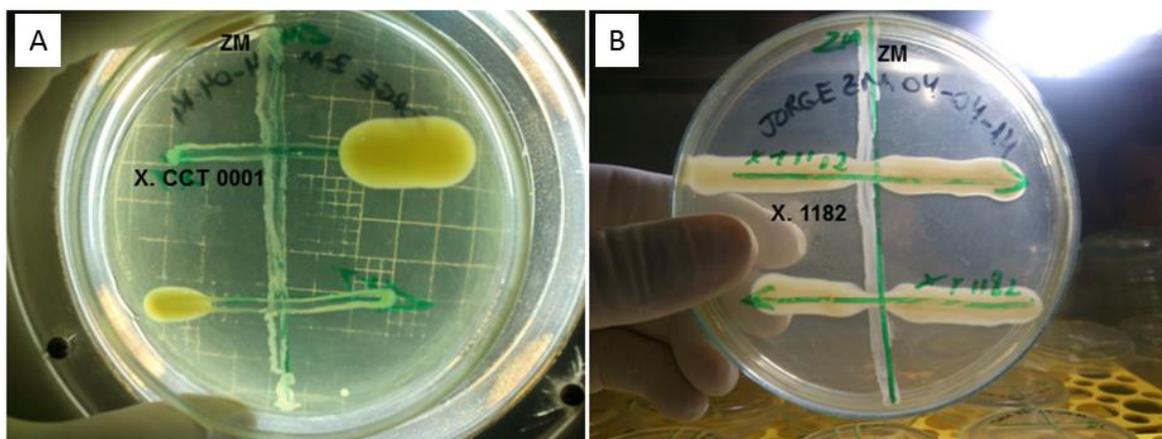
A fase log observada na curva da *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihot* 1182 nesse trabalho foi inferior ao observado por Rottava (2005), que avaliou o crescimento bacteriano do inóculo da mesma linhagem de *Xanthomonas* e mesmas condições iniciais de inóculo, e obteve ótimo da fase log entre 20 e 30 horas, com concentração celular de  $10^{11}$  UFC/mL.

Foi semelhante a Baiocco (1997), que ao realizar curva de crescimento bacteriano da linhagem *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihot* N° 280, encontrou o ápice da fase logarítmica em torno de 20h, numa rotação de 200 rpm, bem como a Mesomo (2007) que o ótimo da fase de crescimento ocorreu entre 8 e 20 horas de incubação com concentração celular média de  $10^8$  UFC/mL de *Xanthomonas* sp, sob as mesmas condições operacionais utilizadas nesse trabalho.

## 5.2 Teste de Compatibilidade entre as Cepas Seleccionadas

O resultado para o teste de compatibilidade entre as cepas de *Xanthomonas* candidatas ao consórcio, mostraram que a *Zym* 4494 inibiu o crescimento da cepa de *Xac* 0001 (Figura 9 A). Por outro lado, observa-se que a *Zym* 4494 exibiu boa compatibilidade com a cepa de *Xax* 1182 (Figura 9 B).

**Figura 9** - Teste de compatibilidade entre *Zym* 4494 e *Xac* 0001 (A); e *Xax* 1182 (B).



Nas condições deste experimento a bactéria *Xax* 1182 apresentou maior potencial para o uso do consórcio microbiano com vistas à produção de biopolímero, apresentando melhor compatibilidade de crescimento junto a *Z. mobilis* (*Zym* 4494), exibindo uma discreta competição por substrato.

De acordo com Cherubin (2003), diferentes linhagens, tanto de levedura quanto de bactérias, podem afetar de maneira distinta o crescimento ou a viabilidade de outro micro-organismo presente no cultivo. Acredita-se que a competição por nutrientes é, realmente, um dos mecanismos de ação envolvido no antagonismo.

Lima (2002) investigou a capacidade de produção de compostos com atividade bacteriocinogênica em seis linhagens de *Z. mobilis* (CP4, Z1-86A, Z1-86B, Z1-87, Z1-88 e Z2-88) contra diferentes espécies de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, patogênicas ao homem (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*), onde foi observado que todas as linhagens de *Z. mobilis* testadas apresentaram atividade bacteriocinogênica em diferentes graus. Aquele autor ainda relata que o padrão de atividade das bacteriocinas pode variar de uma linhagem para outra e os halos de inibição produzidos também podem variar quando testados com diferentes linhagens.

O efeito antagônico de *Zymomonas mobilis* sobre *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas mobilis* e *Staphylococcus aureus* foi mostrado por Souza (1973), ao inocularem em pacientes portadores de colpíte e vulvovaginite.

### 5.3 Efeito da Adição de Etanol na Produção de Biopolímero (Goma Xantana) em Meio Convencional e Alternativo pela Cepa Xax 1182

A Tabela 6 apresenta as médias e desvio padrão dos resultados obtidos para a produção de goma xantana com a Xax 1182, adicionando diferentes concentrações de etanol ao longo do processo fermentativo em meio convencional e alternativo. Foi aplicado o teste de Tukey para comparação de média a 5% de probabilidade. A análise estatística dos resultados, através do teste de Tukey, foi realizada individualmente para cada tempo, considerando as diferentes concentrações de etanol utilizadas e os dois tipos de meios. Os resultados demonstraram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ), tanto para as diferentes concentrações de etanol utilizadas quanto em relação aos diferentes meios empregados para produção (meio convencional e alternativo).

**Tabela 6** - Médias e desvio padrão da produção de goma xantana adicionando diferentes concentrações de etanol ao longo do bioprocessamento em meio convencional (MRT) e alternativo à base de água produzida da indústria do petróleo (APD).

[etanol]%	Tempo (Horas)			
	24 Horas		72 Horas	
	Produção/Rendimento		Produção/Rendimento	
	Convencional	Alternativo	Convencional	Alternativo
<b>Controle</b>	3,14 ± 0,32Bb	5,92 ± 1,27Ba	3,93 ± 0,04Bb	6,37 ± 0,81Aa
<b>2%</b>	3,91 ± 0,60Bb	7,68 ± 0,31Aa	3,86 ± 0,17Bb	6,75 ± 0,78Aa
<b>3%</b>	3,81 ± 0,65Ba	3,64 ± 0,54Ca	4,08 ± 0,58Bb	6,79 ± 0,94Aa
<b>4%</b>	6,33 ± 0,16Aa	5,65 ± 1,20Ba	5,98 ± 0,81Ab	7,69 ± 0,42Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna e minúscula na mesma linha não diferenciam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, a melhor produção de biopolímero com meio convencional foi obtido quando adicionados 4% de etanol ao meio no tempo de 24 horas de fermentação, alcançando uma produção máxima de 6,33 g/L ( $p < 0,05$ ). Esta condição elevou a produção em aproximadamente 101,6% de formação de biopolímero a mais do que quando a fermentação seguiu

sem adição de etanol (tratamento controle), que obteve produção da ordem de 3,14 g/L.

É possível observar ainda que para o meio alternativo a maior concentração de biopolímero (7,69 g/L) foi obtido quando adicionados 4% de etanol ao longo do processo, com um aumento de 20,7% na quantidade de polímero recuperado no tempo de 72 horas em relação ao tratamento controle, sem adição de etanol. Contudo, o melhor resultado foi obtido quando adicionado 2% de etanol ao meio de produção no tempo de 24 horas, alcançando uma produção de 7,68 g/L, cerca de 1,76 vezes a mais que o tratamento sem adição de etanol, um aumento de aproximadamente 30%. Este incremento na produção em 24 horas evidencia um ganho substancial no tempo de fermentação, o que representa grande vantagem industrial no tempo de fornecimento do produto e na redução do custo de produção, com a possibilidade de redução da concentração de fonte de carbono, uma vez que ainda resta uma grande quantidade de substrato que ainda não foi metabolizado. Segundo Pradella (2006) os custos com a fonte de carbono exercem papel crucial na composição do custo de produção de polissacarídeos. Não houve, estatisticamente, diferenças significativas no meio alternativo entre os tratamentos com adição de etanol e o controle, sem adição de etanol, mas o aumento na produção de biopolímero é importante sob o ponto de vista de produção comercial.

Desconsiderando os efeitos da adição de etanol, avaliando apenas os tratamentos controles, é possível observar que o meio alternativo se mostrou mais favorável à produção de goma xantana, produzindo 88,5 e 62,1% a mais que o meio convencional nos tempos de 24 e 72 horas, respectivamente.

Os resultados obtidos neste trabalho com a produção de goma xantana utilizando o meio alternativo (APD) pode ter sido influenciado pela utilização de meio a base de água produzida da indústria de petróleo, visto que, a composição química da água pode variar bastante a depender do poço onde a mesma foi coletada. Essa ideia é corroborada pelos resultados encontrados por Ramos (2011), que utilizando meio a base de água produzida suplementada com sacarose e glicerina bruta, obteve uma variação entre 1,69 e 4,85 (g.L<sup>-1</sup>) na produção de goma xantana sintetizadas pela cepa de *Xanthomonas campestris* XC02.

O perfil químico da água produzida pode variar consideravelmente na sua composição e qualidade, sendo os dois principais fatores que influenciam nas suas características, a formação geológica e a localização geográfica do reservatório de petróleo (STEWART; ARNOLD, 2011). Compostos químicos como sulfatos, cloretos, nitratos e outros minerais presentes na água produzida, podem influenciar diretamente na sobrevivência dos micro-organismos e na produção de exopolissacarídeos. Sendo assim, a suplementação química requerida para a produção de biopolímeros com água produzida, pode variar de poço para poço.

Alguns trabalhos relacionados à produção de goma xantana usando resíduos agroindustriais foram relatados na literatura, dentre os quais, a produção de goma xantana a partir de glicerina residual do biodiesel e resíduo líquido do sisal foi realizada por Assis et al (2014), com produção que variou de 0,36 a 2,40 g.L<sup>-1</sup> de biopolímero a 28 °C, 250 rpm por 120 horas com as cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 1182 e 356. Resultados superiores aos de Assis et al. (2014) e semelhantes aos deste estudo foram encontrados por Brandão et al (2013), utilizando glicerina residual do biodiesel, onde foi possível obter uma produção de 7,23 g.L<sup>-1</sup> a 28 °C, 250 rpm por 120 horas, utilizando a cepa *X. campestris mangiferaeindicae* 2103. Brandão et al. (2010) estudando a produção de xantana por 4 cepas de *Xanthomonas campestris* incluindo a cepa 1182, sob as condições operacionais de 250 rpm, na temperatura de 28 ± 2°C por 120 horas, obtiveram uma produção que variou de 6,79 a 13,83 g.L<sup>-1</sup> em meio alternativo com soro de mandioca. Silva e colaboradores (2009) avaliando a produção por *X. campestris* 1230 e *X. campestris* 1182, em condições otimizadas por meio do planejamento composto central (CCD-*central composite design*), obtiveram uma produção máxima de aproximadamente 25 g.L<sup>-1</sup> no tempo de 72 horas a 28 °C e velocidade de agitação de 180 rpm. Segundo Costa et al. (2014) 2,64, 2,60 e 1,95 g.L<sup>-1</sup> de goma xantana foram obtidas a partir da fermentação de casca de camarão, utilizando as cepas *X. campestris* pv. *manihotis* 1182, *X. campestris* pv. *campestris* 254 e 629, respectivamente, fermentadas a 28 °C durante 120 horas sob agitação de 250 rpm. A partir da fermentação de casca de coco verde Nery et al. (2013) obteve uma produção de aproximadamente 10,0 e 2,0 g.L<sup>-1</sup> em biorreator e em shaker, respectivamente. A fermentação de suco de maçã resultou em 45 g.L<sup>-1</sup> de goma

xantana (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007), enquanto que da polpa de tapioca da indústria de sagu tratado com ácido sulfúrico, 7,1 g.L<sup>-1</sup> (GUNASEKAR et al. 2014) e resíduos agroindustriais de café, 5,8 g.L<sup>-1</sup> (WOICIECHOWSKI et al. 2000). São alguns dos estudos de bioconversões de resíduos agroindustriais.

#### 5.4 Produção de Biopolímero em Diferentes Meios de Produção por *Xax 1182* e *Zym 4494* em Cultivo Isolado e em Consórcio.

A Tabela 7 apresenta a média dos resultados obtidos para a produção de biopolímeros (g/L) entre os cultivos isolados das linhagens de *Xax 1182* e *Zym 4494* e do consórcio entre as duas cepas, em diferentes meios de produção. Foi aplicado um teste de comparação de médias (Tukey), para determinar diferença significativa entre os tratamentos. Os resultados mostraram diferença significativa entre si ( $p \leq 0,05$ ), indicando que tanto os meios quanto as bactérias inoculadas influenciaram na produção de biopolímero.

**Tabela 7** - Comparação de médias pelo teste de Tukey da produção de biopolímeros a partir de cultivos isolados e em consórcio das linhagens *Xax 1182* e *Zym 4494* em diferentes meios de produção.

Bactérias Inoculadas	Média da produção (g/L)			
	Meios utilizados			
	MBI	MBII	MBIII	MRT
<i>Xax 1182</i>	1,31Cb	1,55Bb	1,60Cb	4,16Ca
<i>Zym 4494</i>	4,45Ac	0,57Cd	10,51Aa	7,83Ab
Consórcio*	3,34Bc	4,03Abc	4,32Bb	6,56Ba

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna e minúscula na mesma linha não diferenciam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

\* O consórcio bacteriano constitui-se do co-cultivo a partir das linhagens de *X. axonopodis* 1182 e *Z. mobilis* CCT 4494.

Considerando a produção média de biopolímero nos diferentes meios, pode-se observar que houve diferença estatística entre os cultivos isolados e em

consórcio. Analisando individualmente cada meio, é verificado que a maior produção com o consórcio foi obtido no meio MRT, produzindo 6,56 g/L). Para o meio MBI, a maior produção de biopolímero foi encontrada a partir do cultivo com a *Zymomonas* (4,45 g/L). Já para o meio MBII o melhor resultado foi observado com a interação das duas cepas, produzindo 4,03 g/L. Para o meio MBIII a melhor média de produção foi obtida a partir do cultivo da *Zymomonas* (10,51 g/L).

O meio MRT apresenta uma maior carga orgânica de fonte de carbono quando comparada com os outros meios, apresenta também, uma melhor relação C:N, sendo este nitrogênio encontrado na forma de sulfato de amônia  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2]$ . O aumento da concentração de carbono no meio de fermentação pode ser relevante para aumentar a produção, particularmente se o produto for um polissacarídeo (GIAVASIS et al., 2000). Já o nitrogênio tem sido descrito como nutriente limitante, e bons rendimentos de polissacarídeos requerem valores adequados para a relação carbono/nitrogênio (SUTHERLAND, 1990). Desta forma, o meio MRT se mostrou o mais adequado para os planejamentos experimentais.

Comparando individualmente as bactérias inoculadas nos diferentes meios observou-se que para produção com *Xanthomonas* obteve-se o melhor resultado com o meio MRT (4,16 g/L), os demais meios não houve diferença estatística. Já para a produção a partir do cultivo com a bactéria *Zymomonas* pode-se observar diferença significativa entre os meios, sendo o meio MBIII (10,51 g/L) o melhor meio para a produção de biopolímero. Em relação ao cultivo consorciado das duas bactérias também pôde-se observar diferenças significativas, sendo que o meio MRT (6,56 g/L) obteve o resultado mais satisfatório quando comparado com os demais meios testados. Houve semelhança entre os meios MBI e MBII, e ainda entre o MBII e MBIII.

A baixa produção de levana encontrada para *Zymomonas* no meio MBII (0,57 g/L) pode ser atribuído ao uso da glicose como fonte de carbono, sendo esta, quando utilizada como única fonte de carbono, convertida quase exclusivamente a etanol e  $\text{CO}_2$ , gerando quantidades praticamente equimolares a partir do metabolismo da via Entner-Doudoroff (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009). Por outro lado, quando se utiliza a sacarose (ou a mistura de glicose e frutose) como fonte de carbono, a frutose, formada da hidrólise da sacarose, não é primariamente

transportada para o interior das células, mas sim utilizada na formação de levana e frutooligômeros pela ação da enzima levanasacarase (LOOS et al., 1994).

A Figura 10 apresenta aspecto dos biopolímeros após a secagem em estufa à 50 °C, produzida pelas bactérias *Xax* 1182 e *Zym* 4494 e o biopolímero obtido do cultivo em consórcio das mesmas.

**Figura 10** - Aspecto dos biopolímeros após secagem à 50 °C, produzidos por *Xax* 1182 e *Zym* 4494 e o consórcio microbiano (A, B e C, respectivamente) no meio MRT à 180 rpm, 28 °C em 72 h.



Observa-se diferenças no aspecto e coloração dos biopolímeros produzidos. A goma Xantana produzida pela *Xax* 1182 apresenta coloração creme claro com aspecto filamentososo de superfície irregular, enquanto o biopolímero produzido pela *Zym* 4494 possui coloração mais escura com aspecto semelhante a açúcar caramelizado, brilhante de superfície lisa. Já o biopolímero obtido com as duas bactérias crescidas juntas, aparenta-se ter características dos dois biopolímeros, apresentando uma maior quantidade semelhante a goma xantana, porém com uma pequena região contendo uma superfície mais lisa e brilhante com bordas mais escuras e aspecto caramelizado.

### 5.5 Estudo dos Efeitos da Temperatura e Agitação na Produção e Propriedades do Biopolímero Produzidos a partir do Consórcio Microbiano

Os resultados obtidos no estudo da influência da temperatura (X1) e agitação (X2) na produção (Y1) e viscosidade aparente (Y2) dos biopolímeros obtidos a partir das cepas *Xax 1182* e *Zym 4494* após 72 horas de fermentação estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** - Matriz do planejamento experimental composto por variáveis independentes (valores reais e codificados) e resposta de produção e propriedades dos biopolímeros purificados, obtidos em 72h através da fermentação por *Xax 1182* e *Zym 4494*.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
	X1	X2	Y1	Y2
	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Biopolímero (g/L)	Viscosidade (cP) a 1,0 s <sup>-1</sup>
N1	24 (-1)	120 (-1)	4,86	2,44
N2	24 (+1)	240 (-1)	4,54	1,38
N3	32 (-1)	120 (+1)	5,11	3,57
N4	32 (+1)	240 (+1)	6,90	4,27
N5	22 (-1,41)	180 (0)	9,03	1,83
N6	34 (+1,41)	180 (0)	7,70	2,03
N7	28 (0)	95 (-1,41)	8,73	2,63
N8	28 (0)	265 (+1,41)	8,00	0,65
N9	28 (0)	180 (0)	9,66	3,22
N10	28 (0)	180 (0)	10,13	4,38
N11	28 (0)	180 (0)	10,18	3,03

Para avaliar os efeitos dos fatores em cada variável exposta, ou seja, valores independentes e dependentes, respectivamente, foi utilizado o software *Statistica 7.0* através de regressão múltipla. Ao passo que o ajuste da capacidade preditiva dos modelos foram avaliados por meio da ANOVA.

### 5.5.1 Produção de Biopolímero (Y1)

Observando a variação das variáveis independentes X1 (temperatura em uma escala de 22 a 34 °C) e X2 (agitação de 95 a 265 rpm) pode-se perceber que as mesmas exercem uma grande influência na produção de biopolímero, variando em uma ordem de 4,54 a 10,18 g.L<sup>-1</sup>, dependendo das condições utilizadas no processo de produção (Tabela 8).

Para a resposta produção de biopolímero (Y1) (Tabela 8) foi calculado os coeficientes de regressão (Tabela 9) onde pode-se observar que os efeitos quadráticos da temperatura e da agitação bem como a interação dos dois fatores foram significativos ( $p < 0,05$ ). Os efeitos lineares apresentaram valor de  $p > 0,05$ .

**Tabela 9** - Estimativa de efeitos de X1 e X2 na produção de biopolímero (Y1).

<b>Termo</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>p-valor</b>
<b>Constante</b>	9,992	0,000
<b>X1</b>	0,126	0,109
<b>X1*X1</b>	-1,606	0,001
<b>X2</b>	0,054	0,347
<b>X2*x2</b>	-1,553	0,001
<b>X1*X2</b>	0,526	0,015

Os coeficientes expostos na Tabela 9 demonstram que tanto a temperatura quanto a agitação apresentaram efeito negativo sobre a produção do biopolímero, sendo o efeito da temperatura 1,03 vezes menor do que o da agitação, em valores absolutos. Nota-se que quando se manteve a temperatura em 24 °C, e variou a agitação do valor mínimo (120 rpm) para o máximo (240 rpm), obteve-se uma redução de 6,58% na produção. Porém quando se manteve a temperatura em 32 °C a produção aumentou em 25,94%. O mesmo comportamento aconteceu quando a agitação foi mantida a 120 rpm e a temperatura variou de 24 °C para 32 °C, resultando em um aumento de 4,89%, enquanto a mesma variação da temperatura à 240 rpm, aumentou a produção em 34,20%.

As análises estatísticas utilizando a técnica da superfície de resposta confirmam um ponto ótimo em torno do ponto central.

A ANOVA, apresentada na Tabela 10, mostra que um modelo polinomial de segunda ordem (Equação 3) foi ajustado para a variável Y1 (produção de polímero) com 95% de confiança, logo, considerado não preditivo. A não predição do modelo se deu pelo fato do F calculado ter sido inferior ao valor de F tabelado. De acordo com Barros Neto; Scarminio; Bruns (2010), o valor de F calculado deve ser de 4 a 5 vezes maior que o F tabelado para o modelo ser preditivo.

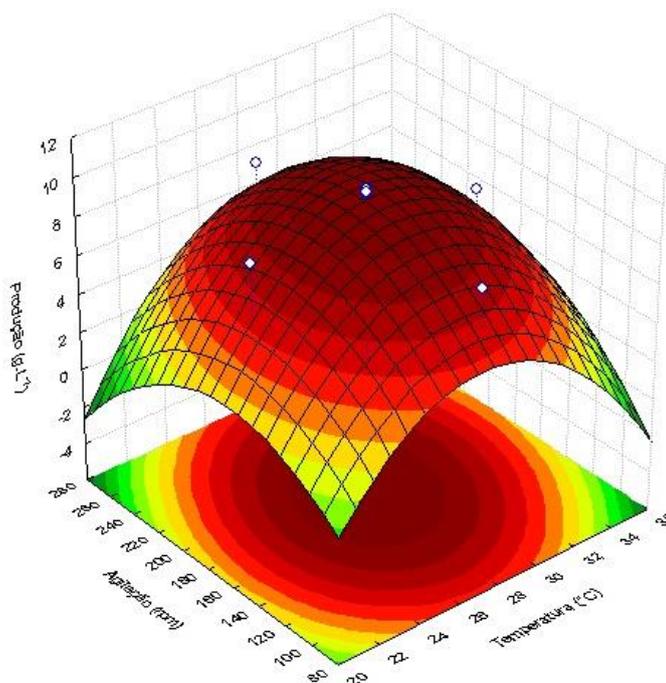
**Tabela 10** - Análise de variância para avaliação estatística do modelo de produção de Biopolímero (Y1) obtidas a partir da fermentação das cepas *Xax 1182* e *Zym 4494*.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F Calculado	F Tabelado
Regressão	23,043	5	7,681	0,747	5,05
Resíduo	20,567	5	10,283		
Falta de ajuste	20,53	3	6,844	415,407	19,16
Erro puro	0,033	2	0,016		
Total	43,611	10			
$R^2$			0,53		

A análise da Tabela 10, ainda permite concluir que o modelo (Equação 3) apresenta  $F$  calculado  $>$   $F$  tabelado da falta de ajuste. Além disso, o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo foi 0,53, mostrando um ajuste não satisfatório, significando que 47% dos dados experimentais de produção de biopolímero pelo consórcio microbiano não são explicados pelo modelo proposto.

O modelo permitiu a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 11, onde a máxima produção de biopolímero foi encontrada no ponto central do planejamento (28 °C e 180 rpm), no qual obteve-se em média 9,99 g.L<sup>-1</sup> de biopolímero purificado.

**Figura 11** - Superfície de resposta mostrando a variação de produção de biopolímero purificado (Y1) em função da variação da temperatura (X1) e da agitação (X2) para a fermentação a partir das cepas *Xax 1182* e *Zym 4494*.



A Equação 3 representa a superfície de resposta ajustada na forma canônica.

$$Z = 72,68 + 5,26*x - 0,10*x^2 + 0,09*y - 0,00*y^2 + 0,002*x*y \quad \text{Eq. 3}$$

A análise do gráfico de superfície mostrado na Figura 11 e confirmados pelos dados experimentais apresentados na Tabela 8, traz informações importantes com relação ao ponto central das variáveis, X1 (28 °C) e X2 (180 rpm), representado em triplicata pelos ensaios 9, 10 e 11, sendo a melhor condição obtida para a resposta Y1 (9,99 g/L<sup>-1</sup> de biopolímero). As análises estatísticas utilizando a técnica de superfície de resposta confirmaram um ponto ótimo em torno do ponto central. Resultados diferentes foram encontrados por BERWANNER (2005), avaliando a produção de biopolímero por *Sphingomonas capsulata* por meio do método de superfície de resposta, obteve uma melhor condição para a produção no ponto axial superior a 28 °C sob agitação de 208 rpm no meio contendo 4% de sacarose, alcançando uma produtividade de 0,038 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, cerca de 2,74 g/L<sup>-1</sup> de polímero formado após 72 horas de fermentação.

A análise da Tabela 8 mostra que as mínimas produções de biopolímero estão associadas ao ensaio conduzido a 24 °C e 240 rpm, apresentando um decréscimo de 53,65% na produção de biopolímero, quando comparado com a produção obtida no ponto central a 28 °C e 180 rpm (valor médio dos ensaios N9, N10 e N11). Respostas similares foram verificadas na fermentação a 24 °C e 120 rpm (Ensaio N1), podendo ser observado uma redução da ordem de 51,35% na produção em relação à resposta obtida com as condições do ponto central.

Faria (2009), após otimizar a produção de goma xantana através da análise de diferentes concentrações de sacarose, extrato de levedura e nitrato de amônio, por meio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), empregou um segundo planejamento experimental com o objetivo de estimar a redução dos níveis de agitação e aeração empregados no processo fermentativo da *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* NRRL B-1459. Para isso investigou a variação da agitação em uma faixa de 500 a 1000 rpm e a aeração a uma faixa de 0,25 a 0,75 vvm. Os resultados mostraram que as melhores concentrações de goma xantana final foram encontradas quando se aplicou uma rotação de 700 rpm e uma aeração de 0,50 vvm, obtendo uma produção média de 17,2 g/L. De mesmo modo, os resultados encontrados por Assis et al (2014), investigando os efeitos das mesmas variáveis (aeração variando de 0,3 a 1,7 vvm e agitação variando de 217 a 783 rpm) estudadas por Faria (2009), sobre a formação da biomassa, na produção e propriedades das gomas xantana obtidas a partir da fermentação de glicerina residual do biodiesel por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103, mostraram que os melhores resultados para a produção de xantana foram obtidos utilizando aeração de 1,0 vvm e agitação a 500 rpm, alcançando a máxima produção de goma em 6,07 g/L<sup>-1</sup>. Essas condições corresponderam ao ponto central do planejamento experimental.

Chaves (2000), avaliando a produção e caracterização de biopolímero formado a partir da fermentação de *Rhizobium tropici* CIAT 899, obteve os melhores resultados quando fornecia as condições de temperatura a 28 °C, aeração de 1,0 vvm e uma agitação de 800 rpm. A produção máxima de biopolímero alcançado nestas condições foi de 6,1 g/L.

### 5.5.2 Viscosidade Aparente (Y2)

A variação das variáveis independentes X1 (temperatura em uma escala de 22 a 34 °C) e X2 (agitação de 95 a 265 rpm) exercem grande influência na viscosidade aparente (Y2) das soluções aquosas de biopolímero a 1,0% (m/v) a 1,0 s<sup>-1</sup>, com variação de 1,38 a 4,38 cP, dependendo das condições utilizadas no processo fermentativo (Tabela 8).

Para verificar a qualidade dos biopolímeros produzidos, foram preparadas soluções aquosas a 1,0% (m/v) de biopolímero e medidas as viscosidades aparentes (Y2), em cP a 25°C e taxa de cisalhamento de 25 s<sup>-1</sup> (Tabela 8). Os tratamentos estatísticos foram realizados com 95% de confiança e os coeficientes calculados para a viscosidade aparente das soluções do biopolímero (cP) estão expostos na Tabela 11. Verifica-se que tanto os parâmetros quadráticos e lineares da temperatura e agitação apresentaram valor de  $p > 0,05$ , por tanto não significativos. Tanto a temperatura quanto a agitação apresentaram efeito negativo sobre a viscosidade aparente do biopolímero, sendo o efeito da agitação 1,28 vezes maior do que o da temperatura.

**Tabela 11** - Estimativa de efeitos de X1 e X2 na viscosidade aparente das soluções a 1,0% de biopolímero (Y2) medidas a 25°C e taxa de cisalhamento de 25s<sup>-1</sup>.

<b>Termo</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>p-valor</b>
<b>Constante</b>	3,543	0,014
<b>X1</b>	0,538	0,173
<b>X1*X1</b>	-0,524	0,230
<b>X2</b>	-0,395	0,266
<b>X2*x2</b>	-0,669	0,162
<b>X1*X2</b>	0,440	0,352

As viscosidades aparentes medidas estão apresentadas na Tabela 8. Ao fixar a temperatura em 24 °C e alterar a agitação de 120 rpm (Ensaio 1) para 240 rpm (Ensaio 2) constata-se uma redução de 43,44% na viscosidade. O contrário ocorre

ao manter a temperatura a 32 °C e alterar a agitação de 120 (Ensaio 3) 240 rpm (Ensaio 4), obtendo um aumento de 16,39% na viscosidade. O mesmo comportamento ocorre quando a velocidade de agitação é mantida a 120 rpm, o aumento na temperatura de 24 °C (Ensaio 1) para 32 °C (Ensaio 3) promove um acréscimo na 31,65% na viscosidade. De mesmo modo ocorre nos ensaios a 240 rpm com mudança da temperatura de 24 °C (Ensaio 2) para 32 °C (Ensaio 4) porém com uma melhora de 67,68% na viscosidade. Portanto, o aumento individual de ambas variáveis temperatura e agitação resultam na diminuição da viscosidade. Por outro lado, o efeito da interação da temperatura e agitação quando elevados aumenta a viscosidade aparente das soluções de biopolímero.

É possível observar que os maiores valores de viscosidade aparente foram alcançados para as soluções de biopolímero a 1,0% sob 28 °C de temperatura, sendo a máxima (4,38 cP), obtida à 180 rpm (Ensaio 10), que é 58,22% e 53,65% maior do que as obtidas à 22 °C (Ensaio 5) e 34 °C (Ensaio 6), respectivamente. As menores viscosidades (1,38 e 0,65 cP) foram obtidas em condições de máxima agitação (240 e 265 rpm).

A ANOVA para os dados da viscosidade (Y2), apresentados na Tabela 12, mostrou que o modelo codificado proposto (Equação 4) apresentou  $F$  calculado  $<$   $F$  tabelado da falta de ajuste, sendo, portanto, bem ajustado aos dados experimentais.

**Tabela 12** - Análise de variância para avaliação estatística do modelo para viscosidade aparente das soluções de biopolímero (Y2).

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F Calculado	F Tabelado
Regressão	7,526	5	2,509	0,821	5,05
Resíduo	6,109	5	3,055		
Falta de ajuste	5,042	3	1,681	3,147	19,16
Erro puro	1,068	2	0,534		
Total	13,634	10			
$R^2$			0,552		

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) do modelo foi 0,552, sendo assim aproximadamente 45% do total de variações não são explicadas pelo modelo proposto. Além disso, a análise ainda permite concluir que o modelo não é preditivo, uma vez que o valor de F calculado da regressão foi aproximadamente 6,1 vezes menor do que o valor de F tabelado.

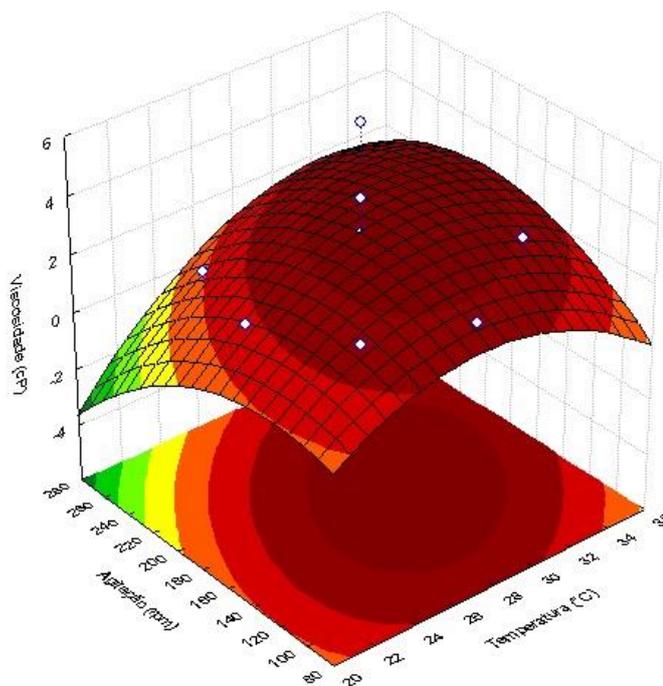
De mesmo modo que ocorreu para a resposta Y1, sucede para a resposta Y2, onde as máximas viscosidades aparentes das soluções de biopolímero foram obtidas no ponto central (28 °C e 180 rpm) (Figura 12). Esta combinação de variáveis no ponto ótimo prevê uma produção de biopolímero com viscosidade aparente de 3,53 cP.

Barreto et al. (2011) avaliando a produção e o comportamento reológico de biopolímeros produzidos por nove estirpes de *Rhizobium*, obteve viscosidades que variaram de 0,3 a 0,05 Pa.s sob condições de cultivo de 28 °C e 200 rpm durante 96 e 168 horas de fermentação.

Faria (2009) ao analisar a influência da agitação e aeração na produção e viscosidade da xantana produzida através de planejamento fatorial, obteve uma viscosidade máxima de 24500 cP, quando utilizou uma velocidade de agitação de 750 rpm a uma aeração de 0,50 vvm. O processo de fermentação em biorreator em sistema de batelada parece favorecer melhores condições de produção e qualidade da goma, por proporcionar um correto sistema de transferência de oxigênio. Já Assis e seus colaboradores (2014) avaliando os efeitos da aeração e agitação na viscosidade das xantanas obtidas com os ensaios do delineamento composto central rotacional (DCCR), encontraram uma viscosidade que variou de 76,60 a 262,20 mPa.s, sendo a maior viscosidade encontrada nos ensaios correspondentes ao ponto central, sob agitação de 500 rpm e aeração de 1,0 vvm.

Borges et al. (2008) avaliaram a influencia da agitação (200 e 300 rpm) e aeração (2,0 e 3,0 vvm) sobre a viscosidade aparente da xatana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* 101, e observaram que a maior viscosidade da solução a 3,0 % (m/v) de xantana foi obtida com a máxima aeração e agitação (300 rpm e 3,0 vvm) alcançando uma viscosidade de 2.070 mPa.s.

**Figura 12** - Superfície de resposta para viscosidade aparente (Y2) em função da temperatura (X1) e da velocidade de agitação (X2).



A Equação 4 representa a superfície de resposta ajustada na forma canônica.

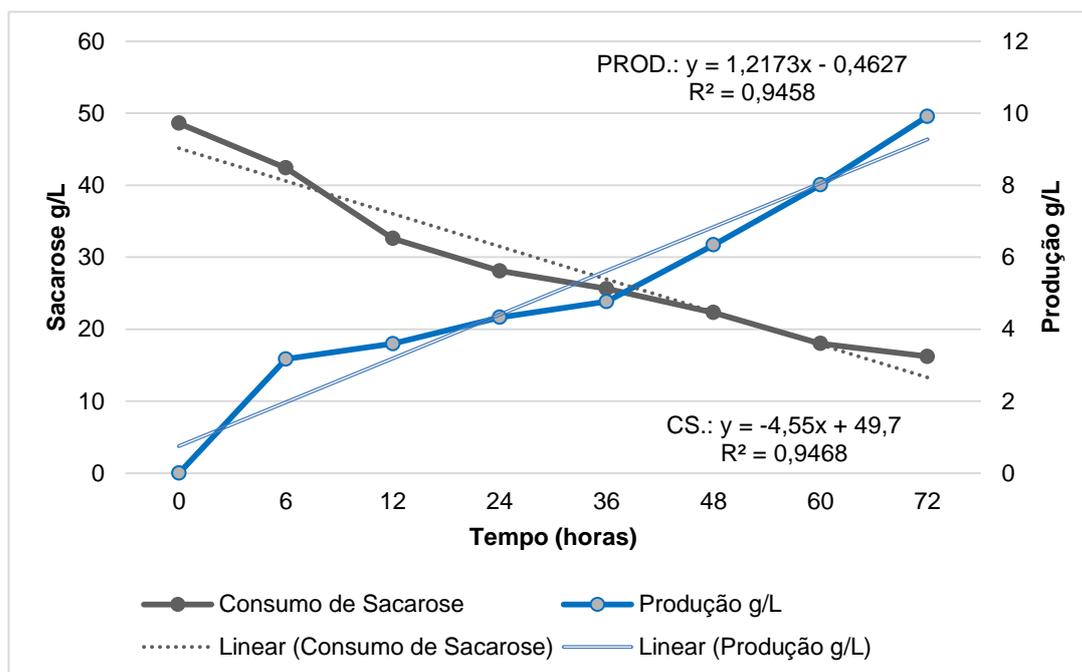
$$Z=21,505+1,639*x-0,033*x^2+0,009*y-0,000*y^2+0,002*x*y \quad \text{Eq. 4}$$

### 5.6 Avaliação do Consumo de Substrato e Formação de Produto do Ótimo da Produção do Consórcio Microbiano ao Longo das 72 Horas de Fermentação

Para verificar o desempenho no consumo de substrato e a produção de biopolímero pelo consórcio microbiano composto pelas estirpes *Xax* 1182 e *Zym* 4494, foi realizado uma produção com o meio selecionado no item 5.4., meio MRT, suplementado com 5% de sacarose durante 72 horas. As amostras foram retiradas a partir do tempo 0 a cada 6 horas e, a partir das 12 horas de fermentação, a cada 12 horas.

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos da produção de biopolímero e consumo de substrato em  $\text{g/L}^{-1}$  ao longo das 72 horas de fermentação.

**Figura 13** - Taxa de consumo de sacarose e produção de biopolímero pelas cepas Xax 1181 e Zym 4494 no período de 72 horas.



**PROD.** – Produtividade; **CS.** – Consumo de Substrato

Os resultados mostram que a máxima produção obtida de biopolímero foi de  $9,9 \text{ g/L}^{-1}$  alcançados no tempo de 72h, entretanto o tempo utilizado neste trabalho foi insuficiente para atingir a produção máxima deste produto, já que não houve queda da produtividade ao final das 72 horas e ainda restou fonte de carbono disponível.

Analisando a eficiência de conversão substrato/produto, verifica-se que houve um aumento de mais de 50% na produção no intervalo entre 36 e 72h ( $4,7$  e  $9,9 \text{ g/L}^{-1}$  de biopolímero, respectivamente).

A relação de produtividade e taxa de consumo de substrato (YP/S) obtida neste trabalho nas 72h de fermentação ( $0,273$ ), foi superior ao encontrado por Ramos (2011) que obteve taxa máxima de  $0,262$  com goma xantana produzida com meio a base de água produzida suplementado com fonte de carbono convencional (sacarose) e alternativa (glicerina bruta).

Com relação à proporção de substrato consumido *versus* produto formado o consórcio microbiano apresentou um rendimento de 29%, resultado superior à média obtida por Rottava (2005), que obteve 23% de conversão, estudando linhagens de *Xanthomonas* sp. para a produção de goma xantana. A baixa conversão de substrato à produto observado pode ter ocorrido devido a utilização da fonte de carbono para a manutenção do metabolismo celular das cepas envolvidas no consórcio microbiano. Outro fator que pode influenciar na baixa conversão de substrato em produto é que a *Z. mobilis* pode estar direcionando parte deste substrato para a produção de álcool, pois, as condições do meio favoreceram a via de produção do etanol (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

Gilani et al. (2011) obtiveram a maior quantidade de goma xantana formada com a fermentação da *Xanthomonas campestris* PTCC 1473 após 72h, de 17,1 g/L<sup>-1</sup>, quando toda a sacarose, fornecida do melaço, foi consumida (concentração inicial de 30 g/L<sup>-1</sup>). Valores diferentes foram encontrados por Brandão et al. (2013), avaliando a cinética da *X. campestris mangiferaeindicae* 2103, onde o consumo total da fonte de carbono se deu após 120 horas de fermentação que culminou com a máxima produção de goma xantana, aproximadamente 7,0 g/L<sup>-1</sup>.

## 5.7 Análise Espectroscópica (FT-IR)

O Espectro de infravermelho com transformada de Fourier consiste numa metodologia que pode ser utilizada para comparar os espectros de uma substância desconhecida ao de um composto padrão. Através da análise cuidadosa dos picos é possível detectar similaridades ou diferenças na estrutura química de diversos compostos.

A Tabela 13 contém as regiões de absorbância do espectro do infravermelho (Figura 14) nas quais se encontram as bandas de intensidade de absorção obtidas pela análise dos biopolímeros produzidos pelas cepas *Xax* 1182 e *Zym* 4494 em cultivo consorciado e xantana comercial.

**Tabela 13** - Resumo das bandas nas quais se encontram os picos de intensidade de absorção presentes nos espectros, por análise de FT-IR, dos biopolímeros produzidos pelas linhagens *Xax 1182* e *Zym 4494* em cultivo consorciado e nos espectros da xantana comercial.

---

### Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FT-IR

---

#### Biopolímero produzido a partir do Consórcio

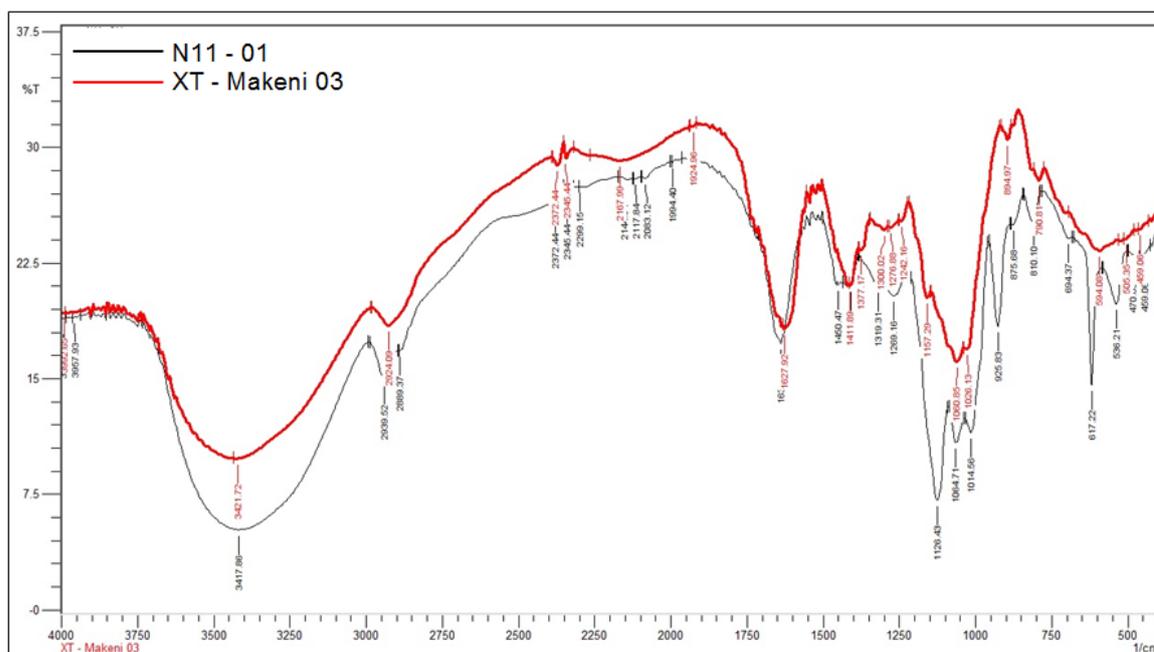
Observação	Atribuição/comentário
Pico forte e largo em 3417 cm <sup>-1</sup>	Estiramento do grupo hidroxila
Pico médio em 2939 e 2889 cm <sup>-1</sup>	Ligação C–H de grupos metil e metileno
Pico forte em 1639 cm <sup>-1</sup>	Estiramento do grupo carbonila
Banda de absorção de 1200 a 1020 cm <sup>-1</sup>	Grupos acetais ou cetais
Combinação de picos de absorção médio em 2939 e 1639 cm <sup>-1</sup>	Indica a presença de grupos $\sigma$ -hidróxi-aril-cetona
Combinações dos Picos de absorção 2939, 1639, 1450, 1408, 1319, 1269 e 875 cm <sup>-1</sup>	Grupos de ácidos carboxílicos
Pico de absorção médio/forte em 617 cm <sup>-1</sup>	Presença de grupamento Haletos
Banda de absorção entre 925-810 cm <sup>-1</sup>	Ligações $\beta$ -glicosídica

#### Xantana Comercial

Observação	Atribuição/comentário
Pico forte e largo em 3421 cm <sup>-1</sup>	Estiramento do grupo hidroxila
Pico médio em 2924cm <sup>-1</sup>	Ligação C–H de grupos metil e metileno
Pico forte em 1627 cm <sup>-1</sup>	Estiramento do grupo carbonila
Banda de absorção de 1060 a 1020 cm <sup>-1</sup>	Grupos acetais ou cetais
Combinações dos Picos de absorção 1627 e 1411 cm <sup>-1</sup>	Íons carboxilatos
Combinação de picos de absorção médio em 2924 e 1627 cm <sup>-1</sup>	Indica a presença de grupos $\sigma$ -hidróxi-aril-cetona
Banda de absorção entre 894-790 cm <sup>-1</sup>	Ligações $\beta$ -glicosídica

---

**Figura 14** - Espectro FT-IR das amostras de biopolímeros em *pastilhas* de KBr: Xantana comercial (XT – Makeni 03) e biopolímero produzido a partir do consórcio das linhagens *Xax 1182* e *Zym 4494* (N11 – 01).



Avaliando os espectros adquiridos, as bandas mais importantes registradas no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  foram: 3417 $\text{cm}^{-1}$ , deformação axial de –OH; 2924 $\text{cm}^{-1}$ , deformação axial de C–H (possivelmente devido a absorções de estiramento simétrico e assimétrico de grupos metil ( $\text{CH}_3$ ), bem como de grupos metileno ( $\text{CH}_2$ ) e CHO; 1870-1540  $\text{cm}^{-1}$ , deformação axial de C=O de ésteres, ác. carboxílicos, aldeídos e cetonas; 1200-1020  $\text{cm}^{-1}$ , deformação axial de grupos acetais; 1375-1450, deformação angular de C–H; 1050-1150  $\text{cm}^{-1}$ , deformação axial de C–O.

De acordo Silverstein et al. (2006) a ausência de absorção na região de 1850 a 1540 exclui estruturas que contém carbonila, assim como, Lopes e Fascio (2004) resumiram um esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho, onde inicia a partir da análise desta banda de absorção, distinguindo dois caminhos no esquema montado: um a partir da presença do grupo carbonila e o outro na ausência deste grupo. Logo, os espectros apresentados na Figura 14 indicam fortemente a presença do grupo carbonila, característico nas funções orgânicas aldeídos e cetonas dos açúcares presentes nos

exopolissacarídeos (EPS). Os EPS microbianos são polímeros constituídos de carboidratos, dentre estes a glicose, manose e frutose. As unidades monoméricas dos carboidratos consistem, principalmente, em um poliidroxialdeído ou poliidroxiacetona, ou seja, são aldeídos ou cetonas que contêm um ou mais grupos hidroxila (NELSON; COX, 2002).

Analisando o espectro do FT-IR do polímero produzido a partir do consórcio das duas cepas, o polímero apresentou-se muito semelhante à goma xantana comercial, se distinguindo na intensidade de algumas bandas e na presença de alguns picos como é o caso da presença de um pico forte em  $627\text{ cm}^{-1}$  característico de estiramento de grupos haletos. Possivelmente, estas distinções podem estar relacionadas à produção concomitante de levana. Foi possível observar uma alta similaridade entre os espectros dos biopolímeros “XT – Makeni 03” e “N11” seja na região indicativa dos principais grupos orgânicos (acima de  $1200\text{cm}^{-1}$ ), assim como na região específica ( $1200\text{-}720\text{cm}^{-1}$  - impressão digital). Também foi possível comparar o perfil do espectro adquirido da análise desse polímero produzido com o consórcio microbiano de *Xax* 1182 e *Zym* 4494 (N11) e identificar grande similaridade com o espectrograma do FT-IR de polímeros comerciais de goma xantana e os produzido por fermentação de *Xanthomonas* ssp. nos trabalhos dos autores: Gilani et al. (2011a, 2011b); Gunasekar et al. (2014); Ahuja et al. (2012); Mudoj et al. (2013); Faria (2009); Ramos (2011); Moitinho (2012); assim como de levana produzidos por *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002 (ZANG et al., 2014).

Entretanto, a espectroscopia de infravermelho isoladamente não pode fornecer dados conclusivos sobre a estrutura química dos polissacarídeos de interesse, assim, é recomendado o uso de outras técnicas complementares como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, em inglês: High Performance Liquid Chromatography, HPLC), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dentre outras.

## 6. CONCLUSÕES

- A adição de etanol ao meio convencional (MRT) e alternativo a base de água produzida da indústria do petróleo (APD), melhora o rendimento da síntese de biopolímero por *Xax 1182*.
- O tempo de fermentação para a produção de biopolímero por *Xax 1182* em ambos os meios convencional e alternativo pode ser reduzido para 24 horas, que comumente é de 72 horas, quando adicionados 4% e 2% de etanol aos meios de produção, respectivamente.
- A avaliação da produção nos meios MBI, MBII, MBIII e MRT demonstraram que o meio MRT proporciona as melhores condições para a produção de biopolímero com o uso do consórcio microbiano.
- Os resultados da avaliação dos efeitos das variáveis independentes, temperatura (28 °C – 34 °C) e agitação (95 – 265 rpm), sobre a fermentação do meio MRT por *Xax 1182* e *Zym 4494*, permitiram concluir que:
  - As melhores condições encontradas para a produção de biopolímero com o consórcio microbiano foram obtidas a 28 °C e 180 rpm, que representam o ponto central do planejamento, nestas condições obteve-se a melhor resposta tanto para a formação de biopolímero quanto em suas propriedades de viscosidade aparente, alcançando uma produção máxima de 10,13 g/L<sup>-1</sup> e máxima viscosidade aparente das soluções de biopolímero a 1% (m/v) de 4,38 cP, medidas a 25°C e 25s<sup>-1</sup>.
  - Portanto, as variações de temperatura e agitação em processos fermentativos por uso consorciado de *Xax 1182* e *Zym 4494*, exerce grande influência na produção e nas propriedades de viscosidade aparente dos biopolímeros sintetizados.
- A análise do espectro de FT-IR dos biopolímeros sintetizados com o consórcio microbiano, mostraram grande similaridade com diversos grupos funcionais de xantana comercial.

- Os biopolímeros sintetizados apresentaram comportamento reológico pseudoplástico, característico de soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos.

## 7. 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.
- AMANULLAH, A.; SERRANO, L. C.; GALINDO, E.; NIENOW, A. W. Reproducibility of pilot scale xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, New York, v. 12, n. 4, p. 466-473, jul./ago. 1996.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Optimization of levan production by *Zymomonas mobilis*. **Braz. arch. biol. technol.** v. 42, n. 3, p. 291-298, 1999.
- ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Studies on a viscous, gel-forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 3, p. 1159-162, 1995.
- ASSIS D. J., et al. Influência da Natureza do Rejeito Agroindustrial Fermentado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* nas Propriedades das Gomas Xantana Resultantes. **Polímeros**, v.24, n.2, p.176-183, 2014b.
- BAIOCCO, L. M. **Estudo de parâmetros para a produção de inóculos liofilizados de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis***. 1997. 166p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1997.
- BARATTI, J. C.; BU'LOCK, J. D. *Zymomonas mobilis*: A bacterium for ethanol production, **Biotechnology Advances**, v. 4, n. 1, p. 95-115, 1986.
- BARRETO, M. C. S; et al. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. **Revista Brasileira de Agrociência**. v. 17, n. 2-4, p.221-227, 2011.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, p.414, 2010.
- BARROS, M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Synthesis of sorbitol by *Zymomonas mobilis* under high osmotic pressure. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 324-328, 2006.
- BERWANNGER, A. L. S. **Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata***. 2005. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Urechim, RS, 2005.

BORGES, C. D. **Estudo das condições operacionais na produção de xantana por *X. arboricola* pv *pruni* para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo.** 2007. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola da Universidade Federal de Pelotas, 2007.

BORGES, C. D.; MOREIRA, A. DA 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.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 2, p.171-188, jul./dez. 2008.

BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. Comportamento Reológico de Xantana Produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *prunipara* Aplicação em Fluido de Perfuração de Poços de Petróleo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 2, p.160-165, 2009.

BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: STEINBÜCHEL, A.; VANDAMME, E. J.; DE BAETS, S. **Biopolymers**. Weinheim: Wiley-VCH. v. 5, p. 259-291, 2002.

BRADBURY, J. F. *Xanthomonas* dowson. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, v. 1, 1984.

BRANDÃO, L. V. et al. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: xanthan production and characterization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 30, n. 04, p. 737-746, 2013.

BRANDÃO, L. V. ; et al. Utilização do Soro de Mandioca como Substrato Fermentativo para a Biossíntese de Goma Xantana: Viscosidade Aparente e Produção. **Polímeros**, vol. 20, n. 3, p. 175-180, 2010.

BRANDÃO, L. V., et al. Bioconversion from crude glycerin by *Xanthomonas campestris* 2103: Xanthan production and characterization. **Brazilian Journal of Chemical Engineering** . v.30, n.04, p.737-746, 2013.

CALAZANS, G. M. T.; et al. Molecular weight and antitumor activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 27, p. 245-247, 2000.

CANUTO, A. P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais.** 2006. 105p. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, 2006.

CARIGNATTO, C. R. R. et al. New Culture Medium to Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Indian Journal of Microbiology**. v. 51, n. 3, p. 283-288, Jul./Set. 2011.

CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 26, n. 2-4, p. 282-291, 2000.

CAVALCANTI, D. R. **Alteração Proteômica em *Zymomonas mobilis* durante a Produção de Levana**. 2013. 70p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

CHAVES, N. A. **Produção e Caracterização do Exopolissacarídeo sintetizado por *Rhizobium tropici* CIAT 899**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2000. 128 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000.

CHENG, R.; LIN, L.; ZHANG, Y. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) supply significantly improves xanthan gum production mediated by *Xanthomonas campestris* in vitro. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 39 p. 799-803, 2012.

CHERUBIN, R. A. **Efeito da viabilidade de levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHUN, W. W. C. Xanthomonadins, Unique Yellow Pigments of the Genus *Xanthomonas*. **The Plant Health Instructor**. 2002. DOI: 10.1094/PHI-A-2000-0824-01.

COPLIN, D. L.; COOK, D. Molecular Genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, n. 5, p. 271-279, 1990.

COSTA, L. A. S., et al. Biosynthesis of Xanthan Gum from Fermenting Shrimp Shell: Yield and Apparent Viscosity. **International Journal of Polymer Science**. v.2014, ID.273650, 8 p. 2014.

COTTRELL, I. W.; KANG, K. S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food application. **Developments in Industrial Microbiology**. v. 19. p. 117-131, 1978.

DARLEY, H. C. H.; GRAY, G. R. **Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids**. 5. Ed., Gulf Publishing Company, Houston, Texas, 1988.

DE SOUZA, A. M.; SUTHERLAND, I. W. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, p. 463-468, 1994.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de Xantana: uma Revisão sobre a Influência de Eletrólitos na Viscosidade de Soluções Aquosas de Gomas Xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 25, n. 1, p.15-28, jan./jun. 2004.

DOELLE H. W; KIRK, L.; CRITTENDEN, R. H. T. *Zymomonas mobilis*-Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnol** v. 13, n. 1, p. 57-98, 1993.

DOLS, M. et al. Characterization of the Different Dextranucrase Activities Excreted in Glucose, Fructose, or Sucrose Medium by *Leuconostoc mesenteroides* Nrrl B-1299. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1298-1302, 1998.

DRUZIAM, J. I. e PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.27 n.1, p.26-31, 2007.

DRUZIAN, J. I.; PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 26-31, Campinas, jan./mar. 2007.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 71-82, jan./mar. 2005.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Nutritional requirements of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 for levan production. **Braz. arch. biol. technol.**, v. 54, n. 3, p. 589-600, 2011.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 2, p. 361-380, abr./jun. 2009.

ERNST; YOUNG. **Enhanced oil recovery (EOR) methods in Russia: time is of the essence**. Dez. 2013, Disponível em: <[http://www.ey.com/Publication/vwLUAssets/EY\\_-\\_Enhanced\\_oil\\_recovery\\_\(EOR\)\\_methods\\_in\\_Russia:\\_time\\_is\\_of\\_the\\_essence/\\$FILE/EY-Enhanced-Oil-Recovery.pdf](http://www.ey.com/Publication/vwLUAssets/EY_-_Enhanced_oil_recovery_(EOR)_methods_in_Russia:_time_is_of_the_essence/$FILE/EY-Enhanced-Oil-Recovery.pdf)>. Acesso em: 05 de julho de 2014.

ESGALHADO, M. E., ROSEIRO, J. C. e COLLAGO, M. T. A. Interactive Effects of pH and Temperature on Cell Growth and Polymer Production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochrmivoy**, v. 30, n. 1, p.667-671, 1995 .

ESGALHADO, M. E.; ROSEIRO, J. C.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris*. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 7, p. 667-671, 1995.

FARIA, S. **Otimização da Produção e Caracterização de Goma Xantana Empregando Caldo de Cana**. 2009. 162 p. Tese (doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

GALINDO, E; SALCEDO, G. Detergents improve xanthan yield and polymer quality in cultures of *Xanthomonas campestris*. **Enzyme Microbial Technology**, 1996, v. 19, New York, 1996.

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.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry**. Sanders College Publishing, 1997.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. Gellan gum. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 3, n. 20, p.177-211, 2000.

GILANI, S. L. et al. Effect of Preparation Conditions on Xanthan Gum Production and Rheological Behavior using Cheese Whey by *Xanthomonas Campestris*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n.10, p. 855-859, 2011.

GILANI, S. L. et al. Kinetic models for xanthan gum production using *Xanthomonas campestris* from molasses. **Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly**. v. 17, n. 2, p. 179-187, 2011.

GOWDY, J.; JULIA, R. **Technology and Petroleum Exhaustion: Evidence from Two Mega-Oilfields**. In: Rensselaer Working Papers in Economics, New York: Rensselaer Polytechnic Institute, nº. 0512, 2005.

GRUBE, M. et al. IR-spectroscopic studies of *Zymomonas mobilis* and levan precipitate. **Vibrational Spectroscopy**, v. 28, n. 2, p. 277-285, 2002.

GUNASEKAR, V. et al. Xanthan from sulphuric acid treated tapioca pulp: Influence of acid concentration on xanthan fermentation. **Carbohydrate Polymers**. v.102, p.669–673, 2014.

GUNASEKAR, V. et al. Xanthan from sulphuric acid treated tapioca pulp: Influence of acid concentration on xanthan fermentation. **Carbohydrate Polymers**. v. 102, p. 669-673, 2014.

HOGNESS, D.S. e SIMMONS, J.R. Breakage of  $\lambda$ dg DNA: chemical and genetic characterization of each isolated half-molecule. **Journal of Molecular Biology**. v. 9, p. 411-438, 1964.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 9. Ed., London: Williams & Williams, 1993. 787p.

HORNBAEK, T. et al. The effect of inoculum age and solid versus liquid propagation on inoculum quality of an industrial *Bacillus licheniformis* strain. **FEMS Microbiology Letters**. v. 236, p. 145-151, 2004.

JUNGBUNZLAUER. **Xanthan Gum**. 2013. Disponível em: <[http://www.jungbunzlauer.com/fileadmin/content/\\_PDF/Xanthan\\_Gum\\_2013-081FO.pdf](http://www.jungbunzlauer.com/fileadmin/content/_PDF/Xanthan_Gum_2013-081FO.pdf)>. Acesso em: 05 de Julho de 2014.

LEIGH D.; SCOPES, R. K.; ROGERS, P. L. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, p. 413-415, 1984.

LEMOS, E. G. M. e STRADIOTTO, N. R. **Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. 1072 p.

LIEPA, V. et al. Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiates mice, and enhances the antitumor activity of leukocytes. **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences**. v. 5, p. 59-64, Baltimore, 1993.

LIMA, G. M. S. **Ocorrência de bacteriocinas e caracterização molecular de linhagens de *Zymomonas mobilis***. 2002. 85p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. 2001.

LOOS, H.; KRÄMER, R.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: Evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 7688-7693, Washington, 1994.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**. v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004

LUBI, N. C.; SATO, M. E. O.; GAENSLY, F. Desenvolvimento de forma farmacêutica líquida de uso oral, isenta de substâncias glicogênicas, com extrato fluido de *Mikania glomerata Sprengel* - Asteraceae (guaco). **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 13, supl., p. 43-46, 2003.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A. R. P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos**. v. 5, n. 1, p. 50-67, jan./abr. 2009.

- LUVIELMO, M. M.; VENDRUSCOLO, C. T.; SCAMPARINI, A. R. P. Seleção de linhagens de *Xanthomonas campestris* para a produção de goma xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**. v.28, n.2, p.161-172, Londrina, jul./dez. 2007.
- LYNESS, E. W.; DOELLE, H. W. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v. 2, p. 549-554, 1980.
- MARCOTTE, M.; HOSHAHILI, A. R. T.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, v. 34, n. 8, p. 695-703, Barking, 2001.
- MARGARITIS, A., ZAJIC, J. E. Biotechnology review: mixing mass transfer and scale-up of polysaccharide fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 20, p. 939-1001, 1978.
- MAUGERI, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo. Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001.
- MAYO, N. N. **Polímeros capsulares bacterianos en *E. coli* K92: ácido colánico y ácido polisiálico**. 2009. 234p. Tese (doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Faculdade de Veterinária, Universidad de León, León, 2009.
- MENESES, J. D. S. **Produção de goma xantana a partir da bioconversão de resíduos de malte e cervejaria por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* IBSBF 1866**. 2013, 119p. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2013.
- MESOMO, M. C. **Produção de Goma Xantana em Biorreator Utilizando Meio à Base de Soro de Queijo** - Erechim, RS - Brasil. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI, Erechim - RS. 2007.
- MOITINHO, B. M. **Análise da expressão diferencial de genes relacionados à produção de xantana**. 2012. 89p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Ciências da Biointeração, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.
- MOORHOUSE, R.; WALKINSHAW, M. D.; ARNOTT, S. Xanthan gum – molecular conformation and interactions. **American Chemical Society**, p.90-102, 1977.
- MOREIRA, Â. N. et al. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através de inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 23, n. 2, p. 300-305, 2003.
- MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação do biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. Pelotas, 2002. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

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

MUDOI, P. BHARALI, P.; KONWAR, B. K. Study on the Effect of pH, Temperature and Aeration on the Cellular Growth and Xanthan Production by *Xanthomonas campestris* Using Waste Residual Molasses. **Journal of Bioprocessing & Biotechnology**. v. 3., n. 3, 2013.

MULCHANDANI, A.; LUONG, J. H. T.; LEDUY, A. Batch Kinetics of microbial polysaccharide biosynthesis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 639-646, 1988.

MURO, A. C.; RODRIGUEZ, E.; ABATE, C. M.; SIÑERIZ, F. Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 20, p. 1639-1642, Netherlands, 2000.

NASCIMENTO, R. C. A. M.; AMORIM, L. V.; SANTANA, L. N. L. Desenvolvimento de fluidos aquosos com bentonita para perfuração de poços de petróleo *onshore*. **Cerâmica**. v. 56, p. 179-187, 2010.

NAVARRETE, R. C. New Biopolymer for coiled tubing applications. In: International Symposium on Oilfield Chemistry SPE 68487. Houston, 2001. **Anais...Houston**, 2001, p.1-10.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger – Princípios de Bioquímica**. 3. Ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NERY, T. B. R., CRUZ, A. J. G. e DRUZIAN, J. I. Use of Green Coconut Shells as an Alternative Substrate for the Production of Xanthan Gum on Different Scales of Fermentation. **Polímeros**, v.23, n.5, p.602-607, 2013.

OLIVEIRA, M. R. et al. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**. v. 37, p. 177-183, 2007.

PACE, G. W. **Polímeros Microbianos**. In: BU'LOCK, J. e KRISTIANSEN, B. *Biotechnology Básica*. Zaragoza: Editorial Acribia S. A. 1991.

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

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

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

- PAN, A.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Efeito da concentração inicial do inóculo no crescimento celular e qualidade de biopolímeros de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* cepa 06. **Rev. Bras. de Agrociência**, v. 6 n. 3, p. 273-277, 2000.
- PAROLIS, H. et al. The structure of the exopolysaccharide produced by the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei* strain R4 (ATCC 33500). **Carbohydr. Res.**, v. 295, p.147-156, 1996.
- PAVIA, D. L. et al. **Introduction to Spectroscopy**. 4. Ed. United States of America: Brooks/Cole Cengage Learning, 2010.
- PEGORARO, R. T. **Escoamento trifásico em meios porosos: Permeabilidade relativa óleo-gás-água**. 2012. 98p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2012.
- PETTITT, D. J. Xanthan gum. In: GLICKSMAN, M.(ed) **Food Hydrocolloids**, v.1, p.128-149, 1982.
- PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo. 2006.
- PSOMAS, S. K.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A. Optimixation study of xanthan gum production using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 273-280, 2007.
- RAMOS, B. F. M. **Produção de Goma Xantana em Água Produzida da Indústria de Petróleo**. 2011. 85p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Industrial) - Escola Politécnica, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, Bahia, 2011.
- REHM, B. H. A., Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology** v. 8, p. 578-592, ago. 2010.
- REISS, M.; HARTMEIER, W. Levan production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Food Biotechnology**, New York, v. 4, p. 69-75, 1990.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 39, n. 2, p. 197-207, 2006.
- ROSSETTI, A. G. Precisão experimental e tamanho da área de experimentos de campo com fruteiras e outras plantas perenes arbóreas em função da unidade experimental e do número de repetições. **Rev. Bras. Frutic.** v. 23, n. 3, p. 704-708, 2001.
- ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana**. 2005. 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) –

Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Arechim, RS, 2005.

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

SEABRA JUNIOR, S. et al. Reação de híbridos de brócolis 'tipo cabeça única' à podridão negra. **Summa phytopathol.** v. 34, n. 1, p. 76-77, 2008.

SENTHIKUMAR, V.; GUNASEKARAN, P. Influence of fermentation conditions on levan production by *Zymomonas mobilis* CT2. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 4, p. 491-496, 2005.

SHAW, D. J. **Introdução à química dos colóides e de superfícies**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975.

SILVA, M. F. et al. Production and characterization of xantham gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, n. 90, p.119-123, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Livros Técnicos e Científicos. 2006.

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.

SOUZA, C.; SOUZA, L. A. G. Colpitis and vulvovaginitis treatment using *Zymomonas mobilis* var. *recifensis*. **Rev Inst Antib.** v. 13, n. 10, p. 35-87, 1973.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, out./dez. 2004.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, v.145, p.301-307, Amsterdam, 1996.

STEWART, M.; ARNOLD, K. Produced Water Treatment Field Manual. **Produced Water Treating Systems**, p. 1-13, 2011.

STREDANSKY, M. et al. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 11-16, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**. v. 23, p. 80-142, 1982.

SUTHERLAND, I. W. Biotechnology of microbial exopolysaccharides. Cambridge: **Cambridge University Press**, 163 p, 1990.

SUTHERLAND, I. W. Microbial exopolysaccharides: structural subtleties and their consequences. **Pure & Applied Chemistry**, v. 69, n. 9, p. 1911-1917, Oxford, 1997.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends In Biotechnology**. v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W.; TAIT, M. Biopolymers. In: **Encyclopedia of Microbiology**. v.1, 1992.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas mobilis*. **Bacteriological Reviews**. v. 41, n. 41, p. 1-46, 1977.

THACHENKO, A. A.; SEVRYUGINA, T. V. Biosynthesis of levan by *Bacillus polymyxa*. **Translated from Microbiology**, v. 58, p. 457-461, Leningrad, 1989.

THOMAS R. J. Microbial enhancement of oil recovery, **Current Opinion in Biotechnology**. v. 2, n. 3, p. 444-449, jun. 1991.

TONELI, J. T. C. L.; MURR, F. E. X.; PARK, K. J. Estudo da Reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 181-204, Campina Grande, 2005.

VAUTERIN, L., RADEMAKER, J., and SWINGS, J. Synopsis on the Taxonomy of the Genus *Xanthomonas*. **The American Phytopathological Society**, v. 90, n. 7, p.677-682, 2000.

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

VIIKARI, L.; LINKO, M. Rate and yield limiting factors in continuous fermentation the sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 1397-144, 1986.

WEBB C., KAMAT S.P. Improving fermentation consistency through better inoculum preparation. **World J. Microb. Biotechnol.** n. 9, p. 308–312, 1993.

WOICIECHOWSKI, A. L., SOCCOL, C. R., CAMARGO, F. e PANDEY, A. Produção de goma xantana a partir de resíduos da agroindústria do café. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 5, Poços de Caldas, 2000. **Anais...** Poços de Caldas, 2000, p.677. Disponível em: <[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:G3pJKIY\\_3oAJ:www.sapc.embrapa.br/antigo/index.php/view-details/i-simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil/183-producao-de-goma-xantana-a-partir-de-residuos-da-agroindustria-do-cafe+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:G3pJKIY_3oAJ:www.sapc.embrapa.br/antigo/index.php/view-details/i-simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil/183-producao-de-goma-xantana-a-partir-de-residuos-da-agroindustria-do-cafe+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br)> Acesso em: 10 de outubro de 2015.

XIE, W.; LECOURTIER, J. Xanthan behaviour in water-based drilling fluids. **Polymer Degradation and Stability**. v. 38, n. 2, p. 155-164, 1992.

YOO, S. et al. Antitumor activity of levan polysaccharides from selected microorganisms, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1-2, p. 37-41, 2004.

ZHANG et al. Biosynthesis of levan by levansucrase from *Bacillus methylotrophicus* SK 21.002. **Carbohydrate Polymers**. v. 101. p. 975-981, 2014.

ZHANG, X. et al. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 27, p. 203-209, 1996.