

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO CASCA DE SOJA COMO
SUBSTRATO EM CULTIVO SUBMERSO E CULTIVO SEMI-SÓLIDO**

Willian José Varela

(Engenheiro de Alimentos – Fundação universidade Federal do Rio Grande/FURG)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos
como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de
Alimentos

Orientador: Plinho Francisco Hertz

Co-orientador: Julio Xandro Heck

Porto Alegre
Fevereiro 2008

Willian José Varela
(Engenheiro de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande)

PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO CASCA DE SOJA COMO
SUBSTRATO: CULTIVO SUBMERSO E CULTIVO SEMI-SÓLIDO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Plinho Francisco Hertz
Dr. em Ciência de Alimentos
Por:
Orientador- PPGCTA/UFRGS

Homologada em:

Julio Xandro Heck
Dr. em Ciências Bioquímicas
Co-orientador – UFRGS

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora

Profa. Dra. Erna Vogt de Jong
Coordenadora do PPGCTA - UFRGS

Dra. Claire Tondo Vendruscolo
Banca – UFPEL

Dr. David Alexander Mitchell
Banca – UFPR

Prof. Dr. Adriano Brandelli
Diretor do ICTA - UFRGS

Dr. Adriano Brandelli
Banca - UFRGS

Porto Alegre – RS
2008

V293 Varela, José Willian

Produção de goma xantana em cultivo submerso e cultivo semi-sólido utilizando casca de soja como substrato. / José Willian Varela – Porto Alegre: UFRGS, 2008.

70 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, RS – BR, 2008. Plinho Francisco Hertz, Orient.; Júlio Xandro Heck, Co-orient.

1. Casca de soja 2. Goma xantana 3. Cultivo submerso 4. Cultivo semi-sólido
I. Hertz, Plinho Francisco II. Heck, Júlio Xandro III. Título.

CDU: 664

AGRADECIMENTOS

Ao professor Plinho pela sabedoria transmitida, paciência e por não se limitar unicamente em ensinar.

Ao professor Júlio pelo conhecimento e co-orientação.

Aos professores e funcionários do ICTA pela disposição e solicitude.

Aos colegas de pós-graduação pelo companheirismo, descontração e apoio, especialmente à colega Kari.

A Aline Simonetti, bolsista voluntária, que incansavelmente contribuiu neste trabalho.

Aos amigos que sempre demonstraram interesse no andamento desta dissertação.

Ao Diego Groisman pela colaboração incondicional, estendendo esse agradecimento a toda sua família.

E por final, agradeço a toda minha família pela confiança, pelo investimento desde o início da minha graduação, principalmente a minha mãe Seusa pelo esforço de sempre.

PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA UTILIZANDO CASCA DE SOJA COMO SUBSTRATO: CULTIVO SUBMERSO E CULTIVO SEMI-SÓLIDO¹

Autor: Willian José Varela

Orientador: Prof. Plinho Francisco Hertz

RESUMO

A goma xantana continua sendo o polissacarídeo microbiano mais produzido no mundo. Características como aumento da viscosidade em soluções, agente de geleificação, estabilidade frente aos diversos tratamentos despertam um interesse especial para a indústria de alimentos, porém, a aplicação para fins não alimentícios vem crescendo significativamente, como é o caso da indústria petrolífera e têxtil. A utilização de substratos alternativos e baratos para a produção de biomoléculas de interesse comercial, como resíduos agroindústrias, vem sendo alvo de várias pesquisas na atualidade. Sendo assim, neste trabalho, produzimos goma xantana utilizando a casca de soja como substrato para a *Xanthomonas campestris*. Utilizou-se um planejamento experimental e da metodologia de superfície de resposta a fim de identificar as melhores condições de produção de goma xantana em cultivo semi-sólido em biorreatores estáticos (CSSE). As melhores condições para este cultivo foram: temperatura de 31.2° C, aeração de 467.5 L.min⁻¹ e densidade óptica do inóculo de 0,929 em 600 nm. Em paralelo, conduziu-se um estudo da produção de goma xantana em cultivo submerso (CSm) e em cultivo semi-sólido agitado (CSSA), fazendo-se um comparativo entre os três sistemas quanto à produção e a viscosidade do exopolissacarídeo. Quanto à conversão de casca de soja em goma, o CSSA foi o que mais converteu, chegando a 19% , seguido de 10 % no CS e 8% no SSE. A viscosidade da goma em solução chegou a 1550 cP na taxa de cisalhamento de 1 s⁻¹ para SSA. A utilização da casca de soja como substrato e suporte de crescimento microbiano, mostrou-se adequado nessas condições.

Palavras-chave: Casca de soja, goma xantana, cultivo submerso, cultivo semi-sólido

^{1/} Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área de concentração Bioquímica), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, fevereiro de 2008.

XANTHAN GUM PRODUCTION USING SOYBEAN HULL SUBSTRATE BY SUBMERGED AND SOLID-STATE CULTIVATIONS¹

Author: Willian José Varela

Supervisor: Prof. Plinho Francisco Hertz

ABSTRACT

The xanthan gum is still the most produced microbial polysaccharide in the world. Characteristics as the increase of viscosity in solutions, geleificant agent, stability in several treatments, bring a special interest for the food industry, however, the application for non-food applications has been increasing significantly, as the case of the textile and petroleum industry. The utilization of an alternative and non-expensive substrate for the biomolecules production of commercial interest, as agro-industry residues, has been the aim of some researches nowadays. Thus, in this work, we produce xanthan gum using soybean hull as substrate for the *Xanthomonas campestris*. An experimental factorial design and response surface methodology was used in order to identify the best conditions of production of xanthan gum in solid-state cultivation in static bioreactors (SSSC). The best conditions for this cultivation were temperature of 31.2° C, aeration of 467.5 L.min⁻¹ and optic density of inoculum of 0,929 in 600 nm. At the same time, a study of the production of xanthan gum in submerged cultivation (SmC) and solid-state agitated cultivation (ASSC) has been conducted, comparing the three systems in relation to the production and the viscosity of the exopolysaccharide. In relation to the conversion of the soybean hull into gum, the SSA was the one with the highest rate of conversion, reaching 19%, followed by 10 % in CS and 8% in the SSS. The viscosity of the gum in solution reached 1550 cP in the shear rate of 1 s⁻¹ for SSA. The use of the soybean hull as substrate and support of microbial growth has shown adequate in these conditions.

Key word: Soybean hull, xanthan gum, submerged cultivation, solid-state cultivation.

¹/ Master of science dissertation on Food Science and Technology (area of biochemistry), Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, February, 2008.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Exopolissacarídeos Microbianos	11
1.1.2 Goma Xantana.....	12
1.2 <i>Xanthomonas sp</i>	14
1.3 Produção de Goma Xantana.....	15
1.3.1 Produção de goma xantana por cultivos semi-sólidos e submersos	17
1.4 Aplicação de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta em bioprocessos	19
2. RESULTADOS.....	20
2.1 Xanthan gum production by submerged and solid-state cultivation using soybean hull as substrate	21
2.1 Optimization of xanthan gum production using soybean hull by solid-state cultivation as substrate	40
3. DISCUSSÃO GERAL	64
REFERÊNCIAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da goma xantana.....	13
Figura 2: Esquema da produção comercial de goma xantana	17

Xanthan gum production by submerged and solid-state cultivation using soybean hull as substrate

Figure 1: Scheme of the vertical packed-bed bioreactor.....	36
Figure 2: Scheme of the horizontal drum agitated bioreactor	37
Figure 3: Kinetics of xanthan gum production during seven days of cultivation in (▲) ASSC , (■) SSSC and (●) SmC.....	36
Figure 4: Viscosity of 3% aqueous solutions of xanthan gum at different shear rates at 25° C. (▲) ASSC, (■) SSSC and (●) SmC	37

Optimization of xanthan gum production using soybean hull by solid-state cultivation as substrate

Figure 1: Contour plot for the effects of temperature and aeration on Soybean hull conversion..	58
Figure 2: Contour plot for the effects of aeration and inoculum on Soybean hull conversion ...	59
Figure 3: Contour plot for the effects of temperature and inoculum on Soybean hull conversion..	60
Figure 4: Evaluation water activity during cultivations days.	61
Figure 5: Kinetic of soybean hull conversion optimized during six cultivations days.	62
Figure 6: Xanthan gum viscosity at different shear rates for the conditions optimized to SH nversion..	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Experimental design and results according to the 2 ³ factorial central composite design	54
Table 2: Analysis of variance (ANOVA) for the model regression for % SH conversion	55
Table 2: Effects significance and coefficient estimates by the regression model for optimization of xanthan gum production on SSC by <i>Xanthomonas campestris</i> DSM 1706.....	56

INTRODUÇÃO

Atualmente, o aumento da população mundial somado ao avanço tecnológico no campo faz com que a agroindústria mundial, em suas mais diversas atividades econômicas, produza anualmente milhares de toneladas de resíduos. Biomassa em excesso e resíduos provenientes da atividade agrícola sempre foram amplamente empregados na produção de energia, rações para animais, alimentos, entre outros produtos úteis. A utilização destes resíduos torna-se especialmente importante, pois estes representam uma das maiores fontes renováveis de energia disponível em nosso planeta e, quando indevidamente descartados ou utilizados, e que podem se tornar fontes adicionais de poluição. Procedimentos normalmente utilizados no manejo destes resíduos, podendo gerar problemas são a deposição em ambientes inadequados, o despejo em cursos de águas e a incineração ou combustão.

Segundo Anderson et al. (1989), estes resíduos lignocelulósicos são potencialmente uma valiosa fonte de nutrientes para serem utilizados na formulação de rações animais e, com a tecnologia apropriada de conversão, podem ser transformados em uma variedade de produtos úteis. A lignocelulose é um polímero complexo, consistindo de feixes fibrosos de celulose cristalina, revestidos por uma matriz polimérica de hemicelulose e lignina. Embora as composições possam variar, este material pode ser geralmente considerado como sendo composto por 50% celulose, 25% hemicelulose e 25% lignina.

Um exemplo de resíduo lignocelulósico abundante no mundo é a casca de soja. A soja é originária da China e é cultivada há milhares de anos. Somente no século 20 tornou-se conhecida no ocidente, quando os agricultores americanos iniciaram seu cultivo em larga escala; esta soja era utilizada principalmente como ração animal. Durante a Segunda Guerra Mundial, quando os óleos comestíveis e as fontes tradicionais de proteínas começaram a se tornar cada vez mais escassas, a soja pela primeira vez foi utilizada em larga escala em produtos destinados ao consumo humano.

De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), a produção mundial de soja na safra 2006/2007 alcançou 228 milhões de toneladas, e para o Brasil, segundo maior produtor mundial, atingiu-se a marca de 59 milhões de toneladas. A cada tonelada de soja que entra para ser processada, cerca de 2 % é transformada no resíduo casca de soja.

Segundo Anderson et al (1993) a casca de soja é um resíduo de alto valor nutricional, possuindo em sua composição 91 % de matéria seca, 15 % de proteína bruta, 57 % de fibra em detergente neutro, 42 % de fibra em detergente ácido, 2.1 % de extrato etéreo e 5.75 % de matéria mineral. Esta composição da casca de soja a torna um substrato em potencial para a sua bioconversão em moléculas de interesse comercial através de processos biotecnológicos específicos.

Pesquisas focam a triagem de fontes de carbono de baixo custo para a biossíntese de produtos por microrganismos capazes de utilizar resíduos lignocelulósicos como meio nutritivo, de forma a substituir os substratos normalmente utilizados. Frente a esta necessidade, este trabalho visa otimizar a produção de goma xantana em cultivo semi-sólido estático utilizando casca de soja como substrato para a *Xanthomonas campestris*, através de planejamento experimental fatorial. Numa segunda etapa, avaliar as condições ótimas de cultivo, propriedades físico-químicas do produto e produzir também em biorreator semi-sólido agitado e submerso, abrindo assim, perspectivas para a produção deste biopolímero em diversificados bioprocessos industriais.

1.1 Exopolissacarídeos Microbianos

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

Os polissacarídeos são constituintes normais das células microbianas, incluindo as de bactérias, fungos e leveduras. Estão divididos em três grupos de acordo com sua localização: intracelular, localizado no interior da célula ou como parte da membrana citoplasmática; parede celular, formado como parte estrutural das células; polissacarídeos extracelulares, produzidos no interior da célula e posteriormente secretados para o exterior (SUTHERLAND, 1992).

Os exopolissacarídeos (EPS) podem estar organizados de modo a formar uma camada aderente e coesiva, denominada “cápsula” ou consistir em um polissacarídeo livre e mucilaginoso (*slime*), com pouca ou nenhuma aderência celular. O termo EPS pode ser usado para denominar tanto polissacarídeo capsular ou mucilaginoso (PORTILHO, 2002).

Os EPS podem ser constituídos por um único tipo de monossacarídeo, sendo classificados como homopolissacarídeos, como as gomas dextrana e curdulana. Outros, como a goma xantana, possuem estruturas mais complexas, podendo conter além de diferentes monossacarídeos outros compostos químicos, estes então, são denominados heteropolissacarídeos (SUTHERLAND, 1994). Os EPS são geralmente considerados metabólitos secundários produzidos quando uma fonte de carboidratos está presente em excesso (PACE e RIGHELATO, 1980). Segundo DEMAIN (2000) os metabólitos secundários são definidos como compostos sintetizados por microrganismos quando as células crescem lentamente ou cessam seu crescimento.

A biossíntese de EPS está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas do meio ambiente, desempenhando diferentes papéis que

inclui: proteger o microrganismo contra desidratações, servir de barreira impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos na parede celular, acoplar ou neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos, atuar como fonte de carbono e energia, interagir com células de animais e plantas em relações específicas simbióticas ou patogênicas (MOREIRA, 2002).

As áreas de interesse para os EPS microbianos são bastante variadas como: indústria de alimentos, agroquímica, recuperação de óleos brutos, médica e farmacêutica, química fina e cosmética (VANDAMME et al., 1996).

As gomas podem ser entendidas como polissacarídeos de cadeia longa, que podem ser muito, pouco ou nada ramificados, devendo interagir com água. Uma goma pode ser definida em sentido amplo, como qualquer polissacarídeo solúvel em água, que pode ser extraído a partir de vegetais terrestres ou marinhos ou de microrganismos e possuir a capacidade, em solução, de formar géis ou incrementar a viscosidade (PASQUEL, 1999). A preferência por polímeros microbianos se deve às suas propriedades funcionais, somadas às vantagens de sua produção ser independente de condições climáticas (BOZA, 2002).

1.1.2 Goma Xantana

A goma xantana foi descoberta no final dos anos cinquenta por cientistas americanos sendo o primeiro biopolímero produzido industrialmente. A fonte natural deste polissacarídeo é uma bactéria que coloniza plantas de repolho, conhecida como *Xanthomonas campestris* (ROSALAM e ENGLAND, 2006). Em 1964, a divisão Kelco da Merck e Co., Inc., Califórnia iniciou a produção comercial da goma xantana sob o nome KELZAN enquanto que a produção de KELTROL (grau alimentício) foi iniciada em 1969. Os estudos extensivos indicaram que a goma xantana era inócua para consumo sendo então regulamentado o seu uso como aditivo alimentício pelo F.D.A. (Food and Drug Administration) em 1969 (COTTRELL e KANG, 1978; GARCÍA-OCHOA et al. 2000).

A goma xantana é um heteropolissacarídeo extracelular produzida em cultivo aeróbico por *Xanthomonas campestris*. A xantana é composta por unidades repetidas de pentassacarídeos, contendo D-glicose, D-manose, D-ácido glicurônico (na proporção 2:2:1), ácido pirúvico e grupos acetato (PSOMAS et al, 2007). A cadeia principal é constituída de unidades de D-Glicose com ligação β 1-4. A cadeia lateral consiste de uma unidade terminal de β -D-manose ligada por ponte osídica à posição 4 do ácido β -D-glicurônico, que também se liga por ponte osídica à posição 2 da α -D-manose (Figura 1). Esta cadeia lateral de três açúcares está ligada alternadamente à posição 3 dos resíduos de glicose da cadeia principal. Aproximadamente metade dos resíduos de D-manose terminal possuem uma molécula de ácido pirúvico ligado por ligação cetál às posições 4 e 6. O primeiro resíduo de manose (ligado à cadeia principal) contém

grupos acetil na posição 6 (KENNEDY e BRADSHAW, 1984; GARCÍA-OCHOA et al. 2000; LEE et al. 2002).

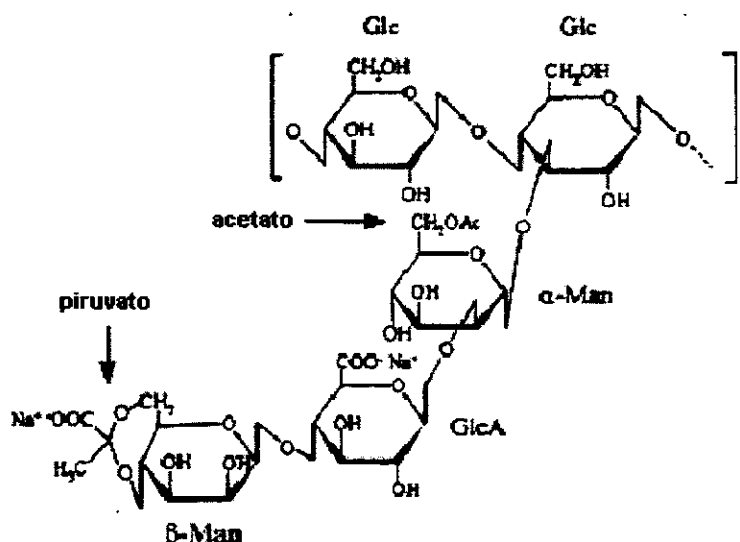


Figura 1: Estrutura química da goma xantana

Fonte: Hamcerencu; Desbrieres; Popa; Khoukh; Riess (2007).

Conforme Lima (2001) a goma xantana tem a capacidade de formar soluções viscosas mesmo em baixas concentrações. O sucesso comercial da goma xantana resulta de suas propriedades reológicas únicas, sendo a indústria de alimentos uma das principais consumidoras deste polissacarídeo que o utiliza como: agente de suspensão, gelificante, emulsificante e espessante. As soluções de xantana possuem alto grau de pseudoplasticidade, tolerância a sais (15% de NaCl e 25% CaCl₂), ácidos, bases, alta estabilidade a extremos de pH (1 a 11 quando adicionada de sais), força iônica e estabilidade na presença de outros ingredientes do alimento.

A goma apresenta solubilidade tanto em água quente como em água fria, e este comportamento está relacionado aos polieletrólitos naturais da molécula. Porém a propriedade mais relevante da xantana é o seu sinergismo com galactomonas promovendo formação de géis termoreversíveis. A viscosidade final da união das duas gomas é maior do que a viscosidade individual de cada uma delas (SYMES, 1980; LIMA, 2001).

A goma xantana também é usada em alimentos produzidos com teores menores de açúcar e gordura, para manter as características físicas do produto (FIGUEIREDO, 1997), formar complexos polissacarídeo-proteína em associação com gelatina (Lii, 2002) e, em massas e farinhas para pão, no controle das propriedades reológicas, aumentando assim a qualidade do pão fresco e tempo de estocagem do pão (ROSELL, 2001).

Psomas et al (2007) destacam os principais usos em: formulações de pesticidas, abrasivos, polidores, cerâmicas, pigmentos e corantes, tintas, detergente, explosivos, dentifrícios, extração de minérios, na indústria têxtil e de papel, produtos farmacêuticos e

cosméticos. Porém, a aplicação mais extensiva da goma xantana está na indústria petrolífera, mais especificamente na recuperação melhorada do petróleo, na qual grandes quantidades do polissacarídeo são requeridas para aumentar a viscosidade da água injetada nos reservatórios subterrâneos para arrastar o óleo residual que permanece nos interstícios das rochas.

Também na indústria de petróleo, a goma xantana é utilizada na perfuração de poços, limpando e lubrificando os dutos e, ainda, o gel de xantana é aplicado para impedir e remover a ferrugem e outros contaminantes das tubulações de gás em perfurações (ROSALAM, 2006).

1.2 *Xanthomonas sp*

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

Existe um grande interesse econômico pelo gênero *Xanthomonas*, uma vez que é uma bactéria fitopatogênica, agente causal de numerosas doenças em plantas, entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Dentro do gênero *Xanthomonas*, *Xanthomonas campestris* é a espécie mais dominante dentro da classificação taxonômica, incluindo em torno de 141 patovares (CHAN e GOODWIN, 1999; VAUTERIN, 1997).

Silva et al (2002) compararam os genomas entre duas *Xanthomonas* patogênicas com diferentes hospedeiros específicos: *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (xcc) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (xac). Verificaram que ambas as cepas codificam genes para as enzimas com atividades celulolíticas, pectinolíticas e hemicelulolíticas. A xcc tem mais genes envolvidos na degradação da pectina e celulose que a xac. Em resumo, a xcc tem duas 1,4 β -celobiosidades e duas pectinaesterases, as quais não são encontradas em xac. A falta dessas enzimas não inibe necessariamente a degradação da celulose e da pectina por xac. Por exemplo, o cancro cítrico provoca a maceração localizada no tecido, enquanto que a podridão negra provoca a maceração degenerativa dos tecidos da planta. Estas diferenças nos sintomas podem estar relacionadas nos diferentes genes para a degradação da parede celular.

As bactérias colonizam a superfície dos vegetais pela adesão a certas estruturas, o exopolissacarídeo, parece regular esse processo. Após invadirem os espaços intercelulares, desenvolvem microcolônias rodeadas de material fibrilar, provavelmente o EPS xantana. Passadas 24 horas, encontram-se abundantemente rodeadas pelo EPS que preenche os espaços intercelulares. Como o muco secretado pela bactéria apresenta alta capacidade de retenção de água, os espaços tornam-se congestionados, este fenômeno é conhecido como *water soaking*. Isso causa uma contínua desintegração tecidual e é o primeiro sintoma da infecção e pré-requisito para a efetiva colonização bacteriana (RUDOLPH, 1993). Como o congestionamento é

progressivo, os danos vão se agravando. A fotossíntese é reduzida e a permeabilidade da membrana celular aumenta ocasionando o murchamento da planta. A bactéria utiliza como substrato o tecido necrosado, uma vez que é capaz de secretar enzimas que degradam os polissacarídeos estruturais como a celulose e as pectinas (SUTHERLAND, 1993). A eficiência da capacidade de formação do *water soaking* está relacionada à virulência da cepa: correlaciona-se virulência com a quantidade e qualidade do EPS produzido *in vitro* quando diferentes cepas são comparadas (RUDOLPH, 1993).

A *Xanthomonas campestris* pertence ao gênero *Xanthomonas* da família Pseudomonaceae, são bastonetes gram-negativos tendo em média 0,4-0,7 μ m por 0,7-1,8 μ m ocorrendo predominantemente na forma isolada. São móveis por flagelação polar (geralmente monotríqueos), aeróbio obrigatório. O metabolismo é oxidativo, quimiorganotrófico, catalase positiva. A temperatura ótima de crescimento está entre 25-30° C. As colônias são normalmente lisas, circulares, inteiras, convexas e mucóides (se o meio contiver açúcar). Quando velhas podem apresentar estrias na superfície ou tornam-se lobadas. A coloração é amarela, porém varia de intensidade de acordo com a espécie e com o meio de cultura utilizado (BRADBURY, 1984; GARCÍA-OCHOA et al, 2000).

O pigmento amarelo característico do gênero *Xanthomonas* é quimicamente aril-polieno brominado chamado de xanthomonadina. Sendo este pigmento importante para a identificação, não se deve excluir a possibilidade de sua ausência nos microrganismos do gênero *Xanthomonas* (BRADBURY, 1984). A xanthomonadina atua contra danos fotobiológicos (POPLAWSKY, 2000).

1.3 Produção de Goma Xantana

A produção do heteropolissacarídeo acontece em cultivos aeróbios, a 28° C aproximadamente, mediados por culturas de *Xanthomonas campestris*, normalmente pelo patovar *campestris* (MAUGERI, 2001; LIMA et al, 2001; HERALD, 2006). O meio industrial (cultivo submerso) consiste geralmente de 2-4 % de glicose ou sacarose como fonte de carbono, 0,05-0,1 % de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio ou uréia), fósforo e traços de outros minerais. O pH deve ser mantido próximo da neutralidade. O polímero é sintetizado, principalmente, ao cessar o crescimento microbiano. Geralmente, a concentração final atinge 20-30 g/L⁻¹, com rendimento de 50-70 % e produtividade típica de 0,5 gL⁻¹h⁻¹ (LIMA et al., 2001; AHMED, 2004).

Shu e Yang (1990) citam que a temperatura de produção de goma xantana pode variar entre 25-34° C, dependendo do meio utilizado. Garcia-ochoa et al., (2000), concluíram que a temperatura ótima de produção é de 28° C para o meio otimizado sintético comercial, estudado por eles composto por glicose, extrato de levedura e sais minerais.

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

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

No processo de biossíntese, dois processos foram identificados na rota do metabolismo da glicose em *X. campestris*, um periplásmico e oxidativo, e um segundo, intracelular e fosforilativo, proposto como um desvio da rota de *Entner-Doudoroff*. A glicose-6-fosfato (Glc-6-P) com derivados intermediários do fosfoenolpiruvato (PEP) e acetilcoenzima A (Acetil-CoA), a síntese de xantana requer uma proporção significativa de cofatores, nicotinamida e ATP (LETISSE et al., 2001; HSU e LO, 2003). Em *X. campestris*, a rota de *Entner-Doudoroff* em conjunto com a rota do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, é o mecanismo predominante do catabolismo da glicose (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Estudos in vitro têm indicado que a biossíntese da goma ocorre em dois estágios no mínimo: primeiramente a unidade pentassacarídica é seqüencialmente montada ligando-se ao poliprenol através de uma ligação difosfato, num segundo estágio, as unidades repetitivas são excretadas para o meio de crescimento (IELPI et al., 1993; VOJNOV et al., 1998).

Rosalam e England (2006) relatam que a síntese da goma xantana é similar a síntese de exopolissacarídeos de outras bactérias gram-negativas e que a rota metabólica pode ser dividida em três grandes partes: captura de açúcares simples e conversão a derivados uridil, formação das subunidades de pentassacarídeos e carregamento de isopentilpirofosfato e a polimerização das unidades repetidas de pentassacarídeos com a seqüente excreção.

A goma xantana comercializada atualmente é produzida por processos de cultivos submersos. Em contrapartida, Stredansky e Conti (1999a) produziram a goma com as mesmas propriedades da goma xantana comercial por processos de cultivos em estado sólido utilizando fontes alternativas de substratos.

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

1.3.1 Produção de goma xantana por cultivos semi-sólidos e submersos

Polissacarídeos de plantas e algas ainda dominam o mercado de gomas naturais devido ao seu baixo custo de produção. Em EPS microbianos, os custos com substratos, bioprocessos e recuperação aumentam o preço final do produto e, para serem competitivos é preciso moderar os custos de produção (STREDANKY et al., 1999).

Na indústria, para produzir goma xantana, utiliza-se na maioria das vezes, glicose ou açúcar invertido, preferindo-se também, o processo em batelada ao contínuo (CHEVALLEREAU, 2001). A Fig. 2 mostra que na produção tradicional, o cultivo começa pela *X. campestris* inoculada partindo de adequados cultivos sob agitação mecânica. Depois do estágio de fermentação, por volta de 100 horas, outros processos acontecem como: a pasteurização do meio para inativação de enzimas e células, podendo ser substituído pelo processo de precipitação da goma que faz uso de etanol.

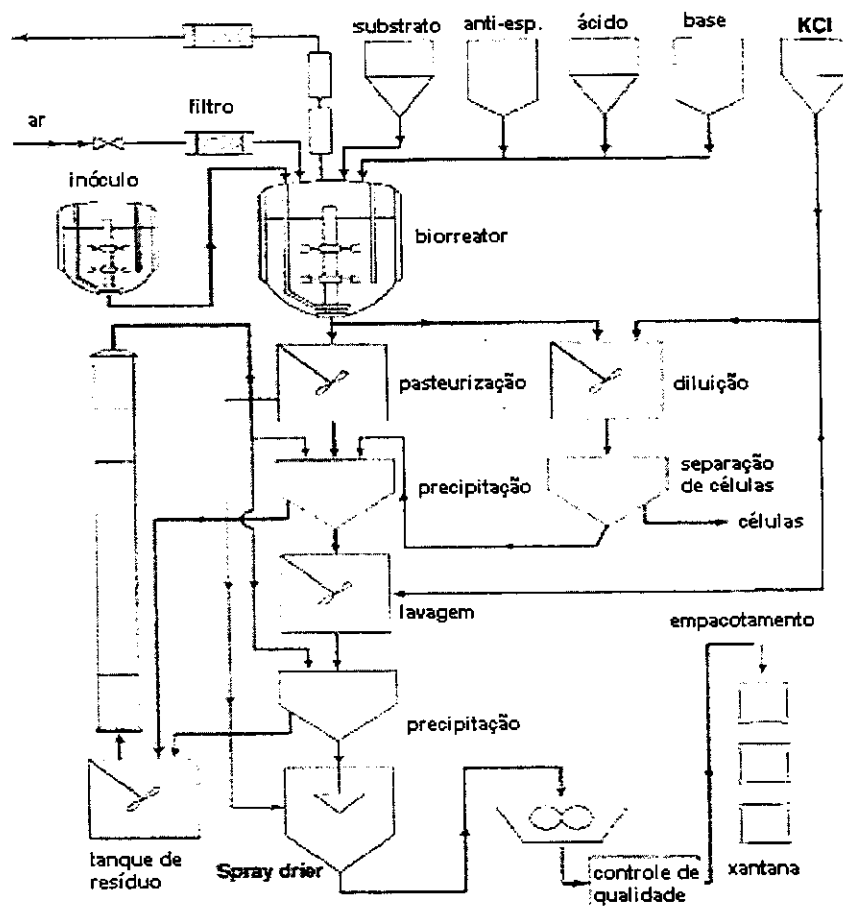


Figura 2: Esquema da produção comercial de goma xantana.

Fonte: Rosalam e England (2006).

Quando células livres de *X. campestris* são requeridas, diluições do meio de cultivo colaboram para facilitar a centrifugação. A separação de células por processos de diluição do

meio de cultivo sob altas viscosidades, é o custo mais alto do processo (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Há poucos anos, houve um aumento da utilização de membranas filtrantes no processo de recuperação da goma em meios de viscosidade elevada (ROSALAM e ENGLAND, 2006). Processos de ultrafiltração também são utilizados diminuindo em até 80% os custos com a energia requerida no processo de recuperação (LO et al., 1997).

A produção de EPS microbiano em cultivos submersos é freqüentemente acompanhada por um aumento na viscosidade do meio, prejudicando a distribuição do ar. Sob essas condições, o metabolismo celular pode ser afetado diminuindo assim a síntese e a qualidade do EPS (PETER et al., 1989). Desta forma, os sistemas de agitação em meios de alta viscosidade são muito mais caros no que diz respeito ao custo de equipamentos e energia, quando comparados a meios de viscosidade baixa (GALINDO, 1994).

O cultivo em estado-sólido ou cultivo semi-sólido (CSS) é sugerido como um substituto alternativo em potencial para o cultivo submerso em relação aos problemas de aumento da viscosidade do meio. Outra vantagem do CSS é que podem ser utilizados substratos mais baratos como subprodutos da agroindústria. Vários processos baseados no CSS têm sido desenvolvidos para a produção de enzimas, ácidos orgânicos, álcool, metabólitos secundários e outros produtos microbianos (ROLZ, 1992; BESSON et al., 1997; STREDANSKY et al., 1999b). Anselmo et al. (1992) produziu goma xantana em CSS utilizando cubos de vegetais como substrato. Stredansky e Conti (1999a) produziram o polissacarídeo utilizando resíduos de grãos de malte, maçã, uva e casca de citros.

CSS tem emergido como uma tecnologia potencial para a produção de moléculas microbianas como alimentos, combustíveis, produtos químicos e farmacêuticos. Atualmente, com o aumento do conhecimento da engenharia bioquímica relacionado a modelos matemáticos e design de biorreatores tornou-se possível o aumento da escala de produção e a comercialização (PANDEY, 2003). Modelagens de biorreatores empregados em CSS desenvolvem um papel fundamental na bioengenharia atual, visando à produção de enzimas e o tratamento de resíduos agroindustriais minimizando problemas com poluição (SAHIR, 2007).

Stredansky e Conti (1999a) em estudos de produção de goma xantana por CSS concluem que as características estruturais da goma foram mantidas. Stredansky et al. (1999b) concluem que a produção de exopolissacarídeos de vários microrganismos foi favorecida em CSS em relação ao cultivo submerso em escala laboratorial.

1.4 Aplicação de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta em bioprocessos

A utilização de ferramentas de otimização em bioprocessos tem aumentado com o decorrer dos anos frente à necessidade de otimizar processos e produtos, minimizando tempo e custo bem como maximizando o rendimento, a produtividade e qualidade dos mesmos (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais que foi introduzida por Box na década de cinquenta. Estas técnicas permitem considerar diferentes variáveis e as interações entre elas, utilizando um menor número de experimentos com a possibilidade de detectar o erro experimental, podendo otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo (NETO et al., 2001). Para tanto, deve-se: identificar os parâmetros que serão otimizados e as respostas que serão medidas, formular o plano experimental, ajustar o modelo matemático e finalmente estabelecer uma solução ótima (MONTEIRO, 1984).

Entre as estratégias utilizadas para aumentar a bioprodução pelos microrganismos, a otimização das condições de cultivo destaca-se, sendo muitas vezes realizada pelo método tradicional de fixar diversas variáveis enquanto estuda-se a outra (OH et al., 1995). Este método além de demandar um excessivo número de experimentos não verifica se existem interações entre as variáveis estudadas. Por isso, o planejamento experimental traz melhoria na qualidade da informação obtida através dos resultados uma vez que leva em consideração as variáveis estudadas individualmente bem como suas interações, diminuindo o número de experimentos, tempo e custo final do processo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Para a produção de goma xantana, Psomas et al. (2007) utilizou-se da técnica de superfície de resposta para a otimização do processo no qual o modelo predisse a equação do para as quatro respostas estudadas: produção de goma, biomassa, concentração de glicose na molécula e pH.

2 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na forma de artigos científicos a serem submetidos para publicação em revistas científicas. Cada subtítulo deste capítulo corresponde a um destes artigos já formatados de acordo com as normas das respectivas revistas.

2.1 Optimization of xanthan gum production by solid-state cultivation using soybean hull as substrate

**Optimization of xanthan gum production by solid-state cultivation using
soybean hull as substrate**

Willian José Varela¹, Júlio Xandro Heck², Marco Antônio Záchia Ayub¹,

Plinho Francisco Hertz^{1*}

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2777, CEP 90035-007 Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

Soybean hull, a rich residue in cellulosic materials, is generated in great amounts in the world. Because of the composition and the fact that it is a renewable carbon source, it was used as substrate in solid-state cultivations for the *Xanthomonas campestris*, with the purpose to convert into xanthan gum, a exopolysaccharide very consumed in the food industry and also in expansion for non-food applications. A 2³ factorial design was used to evaluate the best condition of temperature, aeration and optical density of the inoculum. A second ordered polynomial model was fitted and optimum conditions were estimated. These conditions for yield of 8.63 % were: temperature 31 °C, aeration 467 mL.min⁻¹ and OD_{600nm} 0.93 in a reliable level of 95 %. For viscosity in the levels of the variables, there was statistical difference for the generated response. The experimental viscosity satisfied the characteristics of microbial gums and the soybean hull showed to be adequate for the utilization as substrate in solid-state cultivations.

Key words: Xanthan gum, solid-state cultivation, soybean hull, experimental design

* Corresponding author. E-mail: plinho@ufrgs.br

1. Introduction

Xanthan gum was discovered in the late 1950s by US Scientists and is the first biopolymer produced industrially. The natural source of the polysaccharide came from a cabbage plant bacterium, known as *Xanthomonas campestris*. It was not until 1969 that the FDA issued the final approval for the use of xanthan gum in food products [1]. Xanthan gum is an extracellular hetero-polysaccharide, which is produced by the cultivations of *Xanthomonas campestris*. Xanthan is composed of pentasaccharide repeating units, containing D-glucose, D-mannose, D-glucuronic acid (at a ratio 2:2:1), acetal-linked pyruvic acid and D-acetyl groups [2, 3]. Due to its excellent rheological properties, xanthan gum is used in many applications, mainly in food industry as thickening, suspending and stabilizing agent [3]. Its use for non-food application has been increasing significantly. In the agriculture industry, xanthan has been used to improve flow-ability in fungicides, herbicides, and insecticides formulations by uniformly suspending the solid component. In the petroleum industry, xanthan gum is used in oil drilling, fracturing, pipeline cleaning, and work-over and completion. Due to xanthan gum is excellent compatibility with salt, and resistance to thermal degradation, it also useful as an additive in drilling fluids [4].

Commercial production of xanthan gum uses glucose as the substrate, and generally batch production instead of continuous production due to the batch process having been proven to work successfully. However, increasing market price and demand suggests that glucose may no longer economic for the raw material, while using batch processes may also limit the capacity [1].

Agro-industrial residues may be a viable alternative to substitute the conventional substrate. The soybean hull generated in great amounts and wasted in its majority may become an example of this. Its composition, 90-91 % of dry mass, 9-11 %

of crude protein, 4-5 % of ash, 42-43 % of crude fiber, 68-69 % of fiber detergent neutral, 42-43 % of fiber detergent acid and 8-9% of lignin [5,6] , offers energy as renewable carbon source for the bioconversion mediated for specific microorganisms. In this work we use response surface methodology (RSM) and experimental factorial design to optimize the production of xanthan gum in solid-state cultivation using of rational form, the soybean hull as substrate for the *Xanthomonas campestris*. The variable of the process were temperature, aeration rate and optical density of inoculum and, the response were exopolysaccharide viscosity in solution and conversion of soybean hull into xanthan gum.

2. Materials and Methods

2.1. Microorganism

Xanthomonas campestris DSM 1706 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – Germany) was used in this study. Stock cultures were maintained in suspension frozen in 25 % glycerol.

2.2 Substrate, medium and pre-inoculum

Soybean hull (SH) were used as solid substratum for the cultivation, then, according to the volume of the bioreactors, 100 mL of water and 40 g of SH (mesh 40) formed substrate columns that varied from 13 to 15 cm. The liquid medium used for the microbial growth in the pre-inoculum had the following composition (gL⁻¹): malt extract 3, yeast extract 3, peptone 5, glucose 10, according preliminary studies [7, 8]. The pre-inoculum was prepared in 500 mL Erlenmeyer flasks, containing 200 mL of medium, incubated at 30 ° C, for 24 h under agitation at 125 rpm. After the growth, the adjustment of the optical density in 600 nm was made from successive dilutions with the medium and 10 % (v/v) of this adjusted medium were mixed in each bioreactor.

2.3 Bioreactor and cultivation condition

500 mL packed-bed bioreactors with 60 mm of diameter and 170 mm of height were used as basis for solid-substrate cultures, designed in our laboratory [9]. Sterilized wet air was forced into the interior with different taxes. After sterilization of the solid media and inoculation, bioreactors were taken to a chamber under controlled temperature. For all cultivations, the incubation times were of 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 hours and for each described time, two substrate columns had been removed for the gum quantification.

2.4 Xanthan recovery

When the cultivation time was finished, 300 mL (ratio 1:3, initial volume) of water was added to the cultivated mass for the process of extraction of the exopolysaccharide. This mixture was taken for agitation for 20 min with rotation of 150 rpm. After this process, the liquid medium was centrifuged (15000 g - 20 min) in order to separate cells and soybean hull from the cultivated broth. To the supernatant, three parts of ethanol 96 % were added for the precipitation of the gum and another centrifugation (15000 g - 20 min) was done. The precipitated xanthan gum (XG) was dry in plates at 50 ± 2 °C until constant weight. The amount of XG produced, in relation the initial amount of SH, was calculated according to Equation (1):

$$\%_{XG/SH} = \frac{\text{Xanthan Gum (dry mass)} \times 100}{\text{Initial Soybean Hull (dry mass)}} \quad (1)$$

2.5 Analysis of viscosity

Aqueous solutions of 3 % (w/v) from produced dried xantana gum in SSC were made and submitted to the analysis of viscosity with the aid of a Rheometer Brookfield model LVDV III+. The measures in P were calculated using Equation (2) following the model of Ostwald-of-Waele or power-law.

$$\mu_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K (\dot{\gamma})^{n-1} \quad (2)$$

With the values of τ (shear rate) and $\dot{\gamma}$ (deformation rates) statically evaluated for a not linear estimative, K (consistency index) and n (behavior index) are obtained for all the solutions [10,11]. Thus, absolute viscosity for a "power-law" fluid was determined using spindle 31 in a temperature of 25° C.

2.6. Water activity

In parallel to the cultivations of the factorially designed experiment, the profile of the water activity during the seven days of cultivation was determined and it was evaluated the influence in relation to the production of biopolymer. For this analysis, it was used the equipment Aqualab 3TE-Decagon, Pullman, WA, at 25° C.

2.7. Experimental methodology

To evaluate the influence of the variables on the production of xanthan gum in SSC, it was used a central composite design (CCD), with $k = 3$ and response surface methodology (RSM), generating 17 combinations of treatments [12]. The studied independent variables were temperature of culture, aeration rate and optical density of inoculum. Five levels for each variable were studied and the responses for the treatments were percentages of SH conversion into XG and viscosity.

Data were analysed by ANOVA procedure and means were compared using Tukey's test [12]. Table 1 shows the actual levels corresponding to the coded settings, the treatment combinations and responses. This design is represented by a second order polynomial regression model, Equation (3), which can be used to generate contour plots:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_1x_1^2 + b_2x_2^2 + b_3x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 \quad (3)$$

The test factors were coded according to the following regression Equation (4):

$$x_i = (X_i - X_0) / (\Delta X_i) \quad (4)$$

where x_i is the coded value and X_i the actual value of the independent variable, X_0 the actual value at the centre point, and ΔX_i is the step change value. Statistic 6.0 software (Statsoft, USA) was used for regression and graphical analysis of the data. The significance of the regression coefficients was determined by Student's t-test; the second-order model equation was determined by Fisher's test. The variance explained by the model is given by the multiple coefficient of determination, R^2 .

3. Results e discussion

3.1 Preliminary experiments

Solid-state cultivation (SSC) is defined as the cultivation involving solids in absence (or near absence) of free water; however, substrate must possess enough moisture to support growth and metabolism of microorganisms [13]. So, in order to satisfy this condition, we evaluated the capacity of water retention for the SH. Several proportions of SH/water were tested (data not shown) until obtaining the best proportion of 1:2.5. In this ratio, the water requirements of cells are satisfied and there was not water draining throughout 144 h of culture.

For definition of the cultivation time, it was made a kinetic of production of all 17 described treatments in Table 1. Through this kinetic, we verified that in 120 h of cultivation the maximum production was reached and after this time, there was a reduction of the amount of xanthan gum for all treatments. For all treatment, two bioreactors (total substrate column) in intervals of 24 h had been removed (totalizing 144 h) and sacrificed for the posterior gum quantification.

3.2. Xanthan gum production

For this analysis, the percentage of conversion of the substrate into product (both dry mass) during the culture was taken in consideration. Stredansky e Conti [14]

produced xanthana gum in SSC and expressed the produced amount in accordance with the xanthan yield in grams per 1 Kg of dry apple pomace.

In accordance with the CCD and RSM used to evaluate the best conditions of culture, the temperature and aeration influenced significantly the amount of the converted soybean hull to xanthan gum and the inoculum concentration did not influence the conversion, as show the Figures 1, 2 and 3. According to Table 1, in treatments 2 and 6 (temperatures of 37 °C) and in treatment 10 (temperature of 40.4°C) *Xanthomonas campestris* produced less compared to the other temperatures, directly influencing the production. In other studies, the optimum temperature of culture for *X. campestris* was reported as being from 28 to 32 °C, being the best 30 °C [17, 19]. Psomas et al. [3] produced xanthan gum using response surface methodology with temperatures from 25 to 35 °C, the optimum temperature reported was 30 °C. In our study using SH as substrate, temperature and aeration had been statistical significant according Table 3.

The aeration ratio forced into the bioreactors had significant influence on the conversion. In low levels with aeration of 0 and 200 mL.min⁻¹, the humidity that entered in the bioreactors was insufficient to keep the mixture wet after four days of cultivation. In a similar way, when the aeration ratio was of 800 and 1000 mL.min⁻¹, the initial humidity of the cultivations was dragged out from the bioreactors, and in a short period of time (72 h), the mixture became dried. In accordance with Daza et al [15], the substrate with activity water (Aw) below 0.60 is assured against microbial growth. From Aw 0.65 it starts to appear the proliferation of specific microorganisms and with an Aw below 0.75, only some halophilic bacteria, osmophilic yeast and xerophilic fungus (of development in dry environment) can be developed. The behavior of the activity of water can be observed in Figure 4. *Xanthomonas campestris* does not belong above to cited classification, therefore, when the amount of present humidity in the

substrate column diminished, the conditions of growth and cellular metabolism were harmed, influencing directly in the production of biopolymer.

Due to these characteristics, the interaction between temperature and aeration was significant. In low levels of temperature and high aeration it was converted less gums and, in high temperatures and independently from the aeration ratio, the conversion was also harmed. The statistical model showed that the interaction between the inoculum and the aeration was significant, this data are shown in Table 3. It is known that *X. campestris* is a strict aerobic microorganism; therefore the amount of available aeration influences its growth [16]. When the aeration ratio was zero (treatment 11), the conversion into gum was less than 7 %, probably the microorganism, also used the available oxygen in the void spaces in the substrate column. Oxygen transfer in solid-state cultivation is not necessarily simple. For example, is likely that for all non-zero aeration rates the concentration of O₂ in the void spaces is quite high (although one would need to monitor the O₂ concentration to be sure). There is than the question of transfer of O₂ from the void spaces to the microorganisms. If the microorganisms grows as a biofilm at the surface of the particle, than it is quite easy for [O₂] to become limiting at biofilm depths.

The computed *F*-value for SH converted into xanthan gum (20.85) was 6.47-fold higher than the *F*-value in statistic tables [12], indicating that the model was significant at high confidence level (95 %), as shown in Table 2. The coefficient of determination R² of the model was calculated to be 0.93 indicating that the model is able to explain 93 % of the variability in the response. The significance of each coefficient was determined by Student's *t*-test and *p*-values. At 95 % probability level, the linear and quadratic coefficients of x_1 (temperature), x_2 (aeration), interaction $x_1.x_2$ and $x_2.x_3$ were to be significant (Table 3). The second order polynomial model representing the conversion

percentage of SH into XG (Y) in the experimental region studied can be expressed by Eq. (5).

$$Y = 8.58 - 0.41x_1 - 0.14x_2 - 1.78x_1^2 - 0.96x_2^2 + 0.87x_1x_2 - 0.28x_2x_3 \quad (4)$$

Figure 1, 2 and 3 shows contour plot for the independent variables (x_1 , x_2 and x_3). Contour plot indicates that better conversion was obtained with temperatures between 29 -34 ° C and aeration between 250 – 650 mL.min⁻¹. The optimized values of selected variables were obtained by solving the regression equation 4. The optimized values of the test variables in coded units are as follows: $x_1 = -0.148$, $x_2 = -0.108$ and $x_3 = -0.237$. The influence of the variable x_3 in the conversion was only significant when it interacted with the aeration, when alone, independently from the level, the conversion was the same, then, the reduction of the growth time of the microorganism in the pre-inoculum can diminish costs of consumption of energy.

The real values obtained by substituting the respective optimized values in equation 3 are: temperature 31 ° C, aeration 467 mL.min⁻¹ and OD_{600nm} 0.93. The model predicts that the maximum pure soybean hull conversion that can be obtained using the above values of variable is 8.63 %. The maximum conversion obtained experimentally was 8.65 %, which is in close agreement with the model prediction. The optimized profile of conversion of the SH in gum is represented in Figure 5.

Stredansky and Conti [14] produced xanthan gum in solid-state cultivation reaching a yield of 32.5 % for a substrate composed of a mixture of apple pomace, spent malt grains and further sources like salt, carbon and nitrogen. They also used agitated bioreactors for the cultivation, which favors the oxygen transference, heat and a higher contact of the substrate with the microorganism.

In other work, Stredansky et al. [18] using *Xanthomonas campestris* DSM 1706, the same strain of this study, reached the yield of xanthan gum from spent malt grain of 10.4%.

3.3. Viscosity of produced xanthan gum.

The level of pyruvate (not available in this study) in the molecule of xanthan gum is an indicative of good quality of the exopolysaccharide. The higher its content is the better its rheological properties are in solution [17]. This content may have been influenced by the cultivation conditions. It is possible that the metabolic pathway of xanthan gum production has been modified by the amount of oxygen in the medium diminishing the amount of pyruvate [1].

The amount of pyruvate was not available in this study, however, the characteristic to promote viscosity, when the xanthan gum are in solution was studied. The behavior of the viscosity observed in Figure 6 suggests a thixotropic and pseudoplastic behavior, in which, the viscosity decreases with the increase of the shear rate. This behavior is expected for polymeric solutions of microbial polysaccharide [19,20]. In this figure, it is also possible to observe the same behavior of the commercial xanthan gum used for the comparison.

The levels of temperature, aeration and inoculum and their interactions studied in this paper have not influenced the viscosity response. Independently from the varied level, the viscosities were maintained similar, not presenting significant differences.

4. Conclusions

In this work, it was possible to determine the best condition of temperature, aeration and inoculum for the cultivations production of xanthan gum in static solid-state cultivation, through the conversion of soybean hull into product. The soybean hull

in solid-state cultivation satisfied the characteristics of this cultivation, showing to be a potential substrate in the production of other biomolecules. Further studies must be conducted in order to enrich the medium and increase the conversion of the substrate into product and increase the production rate. The viscosity of the produced gum fulfilled typical characteristics of microbial gums. Then, the soybean hull may be used as non-expensive and environmental-friendly substrate.

References

- [1] S.Rosalam,R.England, Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp., Enzime and Microb. Technol. 39 (2006) 197-207.
- [2] B.Katzbauer, Proprieties and application of xanthan gum, Polymer Degradation and Stability 59 (1998) 81-84.
- [3] S.K.Psomas,M.Liakopoulou-Kyriakides,D.A.Kyriakidis, Optimization study of xanthan gum production using response surface methodology. Biochem. Engin. J. 35 (2007) 273-180.
- [4] F.Letisse,N.D.Lindley,G.Roux, Development of a phenomenogical modeling approach for prediction of growth and xanthan gum production using *Xanthomonas campestris*. Biotechnol. Progress 19 (2003) 822-827;
- [5] T.Nakamura,F.G.Owen, High amounts of soyhulls for pelleted concentrate diets. J. Dairy Sci. 72 (1989) 988-1003.
- [6] S.W.Anderson,J.K.Merril,T.J.K.lopfenstein, Soybean hulls as energy supplement for grazing ruminant. J. of Animal Science 66 (1988) 2959-2964.
- [7] A.Jeanes,P.Rogovin,M.C.Cadmus,R.W.Silman,C.A.Knutson, Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures of culture

maintenance and polysaccharide production purification and analysis. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture ARS-NC-51 1976.

[8] J.A.Casas,F.García-Ochoa, Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixture, J. Science Food Agricul. 79 (1999) 25-31.

[9] J.X.Heck,P.F.Hertz,M.A.Z.Ayub, Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. Braz. J. Microbiol. 33 (2002) 213-218.

[10] R.P.Chhabra,J.F.Richardson, Non-Newtonian flow in the process industries fundamentals and engineering applications. Butterworth Heinemann (1999) 436 p.

[11] C.J.L.Flores,W.D.Deckwer, Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan, Biotechnol. Progress 15 (1999) 446-452.

[12] R.H.Myers,D.C.Montgomery, Response surface methodology, 2nd ed., John Wiley and Sons Inc. (2002).

[13] A.Pandey, Solid-state fermentation, Biochem, Engin. J. 13 (2003) 81-84.

[14] M.Stredansky,E.Conti, Xanthan production by solid-state fermentation, Process Biochem. 34 (1999) 581-587.

[15] M.S.Daza,Y.Villegas,A.Martinex, Minimal water activity for growth of *Listeria monocytogenes* as affected by solute and temperature, International J. Microbiol. 14 (1991) 333-337.

[16] F.García-Ochoa,V.E.Santos,A.Alcon, Structure kinetic for *Xanthomonas campestris* growth, Enzyne and Microbial Technol. 34 (2004) 583-594.

[17] J.A.Casas,V.E.Santos,F.García-Ochoa, Xantham gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological proprieties, Enzyme and Microbial Technol. 26 (2000) 282-291.

- [18] M. Stredanski, E. Conti, L. Navarini, C. Bertochi, Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation, *Process Biochem.* 34 (1999) 11-16.
- [19] F. Cacik, R.G. Dondo, D. Marqués, Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum, *Computers and Chem. Engin.* 25 (2001) 409-418.
- [20] Y.M. Rao, A.K. Suresh, G.K. Suraishkumar, Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy, *Process Biochem.* 38 (2003) 1301-1310.

Table 1: Experimental design and results according to the 2^3 factorial central composite design

Treatment	Coded setting levels			Actual levels			Xanthan gum Yield _{XG/SH} (%)
	$(x_1=T; x_2= \text{aeration};$ $x_3 = OD_{600nm})$			$(X_1=T; X_2= \text{aeration}$ $x_3 = OD_{600nm})$			
	x_1	X_2	x_3	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	-1	27	200	0.7	6.57
2	1	-1	-1	37	200	0.7	4.02
3	-1	1	-1	27	800	0.7	4.98
4	1	1	-1	37	800	0.7	5.92
5	-1	-1	1	27	200	1.3	7.21
6	1	-1	1	37	200	1.3	3.8
7	-1	1	1	27	800	1.3	4.51
8	1	1	1	37	800	1.3	5.8
9	-1.68	0	0	24	500	1.0	4.03
10	1.68	0	0	40.4	500	1.0	3.61
11	0	-1.68	0	32	0	1.0	6.98
12	0	1.68	0	32	1000	1.0	5.33
13	0	0	-1.68	32	500	0.48	8.39
14	0	0	1.68	32	500	1.52	8.51
15	0	0	0	32	500	1.0	8.43
16	0	0	0	32	500	1.0	8.67
17	0	0	0	32	500	1.0	8.55

Table 2: Analysis of variance (ANOVA) for the model regression for %_{XG/SH} conversion

Source	Sum of Squares	d.f.	Mean Square	<i>F</i> -value	<i>F</i> -value in statistic table
Model	50.19	6	189745	20.85	3.22
Residual	4.01	10	17844.25		
Lack of fit	3.98	8	23673		
Pure error	0.028	2	358		
Total	54.20	16			

$R^2 = 0.93329$; Standard error of estimate = 0.005, d.f., degrees of freedom; Significance level = 95 %

Table 3: Effects significance and coefficient estimates by the regression model for optimization of xanthan gum production on SSC by *Xanthomonas campestris* DSM 1706

Independent variables (parameter)	Effect	Coefficient (β)	Standard error (β)	t-Value	P-value
Intercept (β_0)	8.58259	8.58259	0.069139	124.1397	0.000065
x_1	-0.82604	-0.41302	0.032486	-12.7138	0.006130
x_1^2	-3.56991	-1.78496	0.035789	-49.8742	0.000402
x_2	-0.28758	-0.14379	0.032486	-4.4262	0.047440
x_2^2	-1.91529	-0.95765	0.035789	-26.7580	0.001394
x_3	-0.17126	-0.08563	0.032486	-2.6359	0.118817
x_3^2	-0.28902	-0.14451	0.035789	-4.0378	0.056214
$x_1.x_2$	1.74750	0.87355	0.042426	20.5945	0.002349
$x_1.x_3$	0.17250	-0.08625	0.042426	2.0329	0.179095
$x_2.x_3$	-0.55250	-0.27625	0.042426	-6.5113	0.022784

x_1 , x_2 and x_3 are the coded values of variables temperature ($^{\circ}\text{C}$), aeration (mL min^{-1}), and inoculum ($\text{OD}_{600\text{nm}}$), respectively.

Figure 1: Contour plot for the effects of temperature and aeration on Soybean hull conversion.

Figure 2: Contour plot for the effects of aeration and inoculum on Soybean hull conversion.

Figure 3: Contour plot for the effects of temperature and inoculum on Soybean hull conversion.

Figure 4: Evaluation water activity during cultivations times in treatments (□) 2, (○) 4, (●) 5, (▲) 7 and (■) 15 according to Table 1. Results are the mean of two repetitions.

Figure 5: Validation kinetic of %_{XG/SH} during 144 h of cultivations. Results are the mean of two repetitions.

Figure 6: Xanthan gum viscosity at different shear rates. (●) Experimental gum for the conditions optimized and (■) commercial gum.

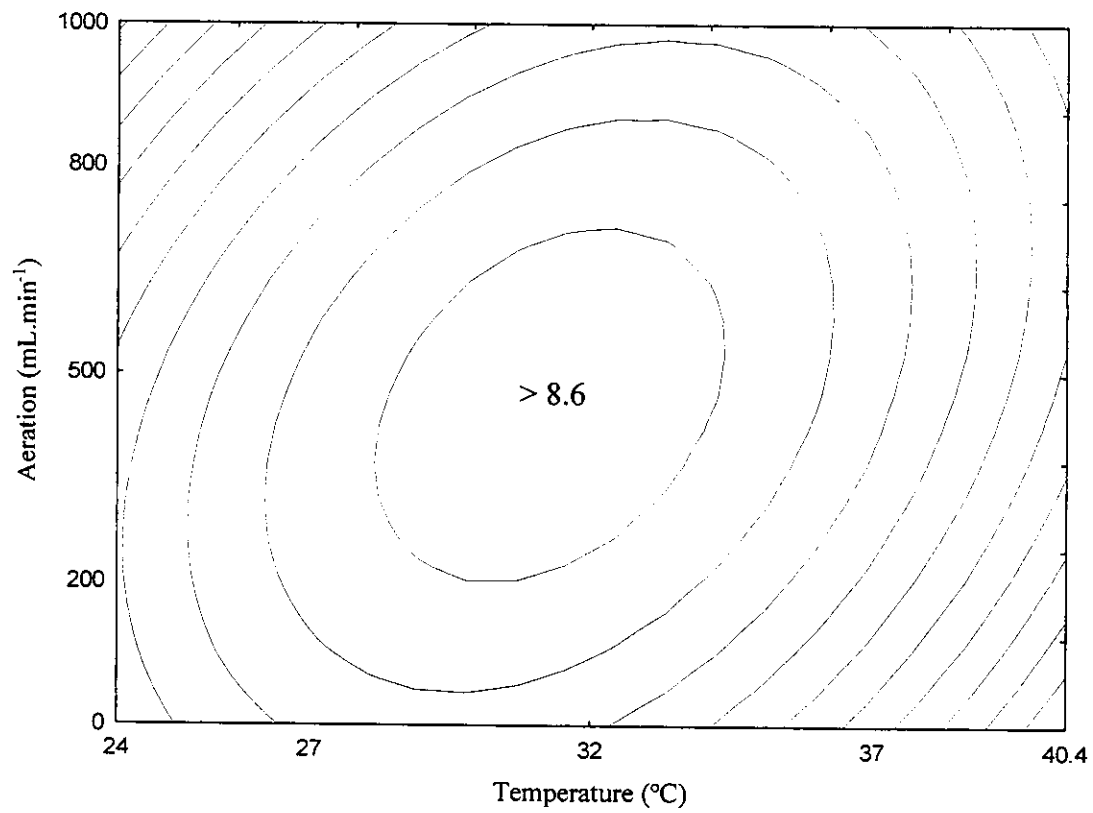


Figure 1

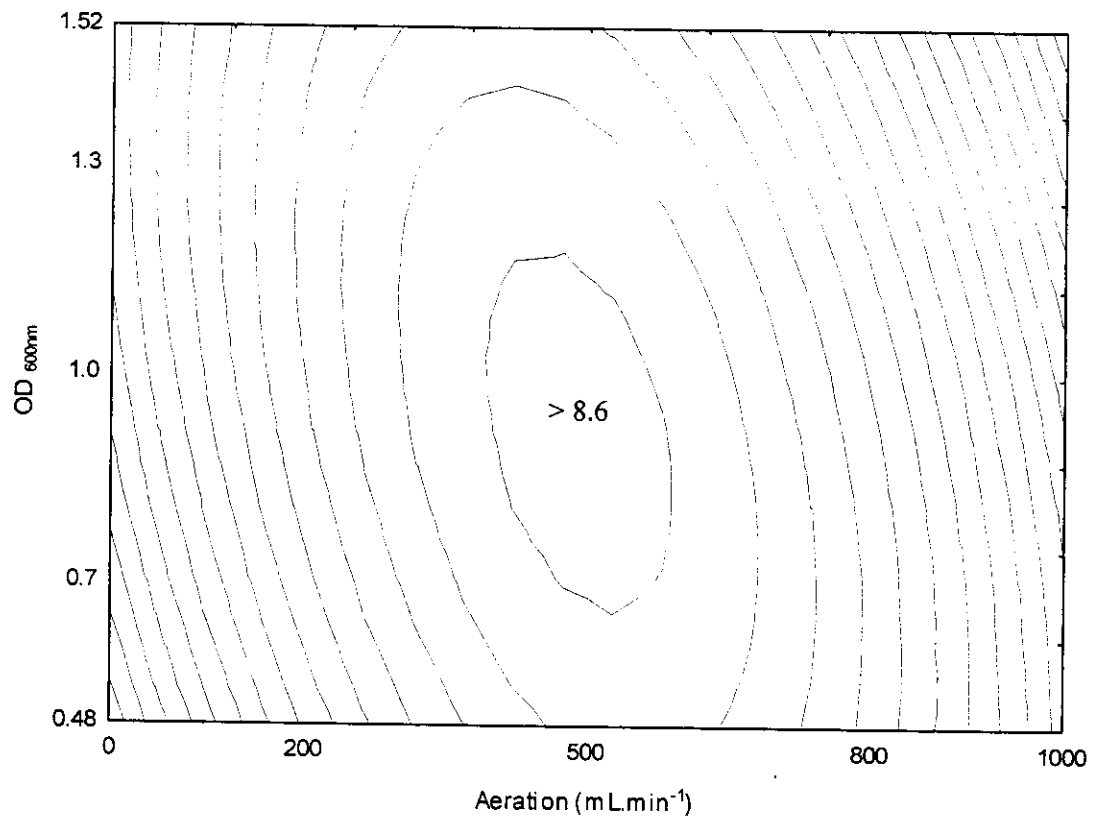


Figure 2

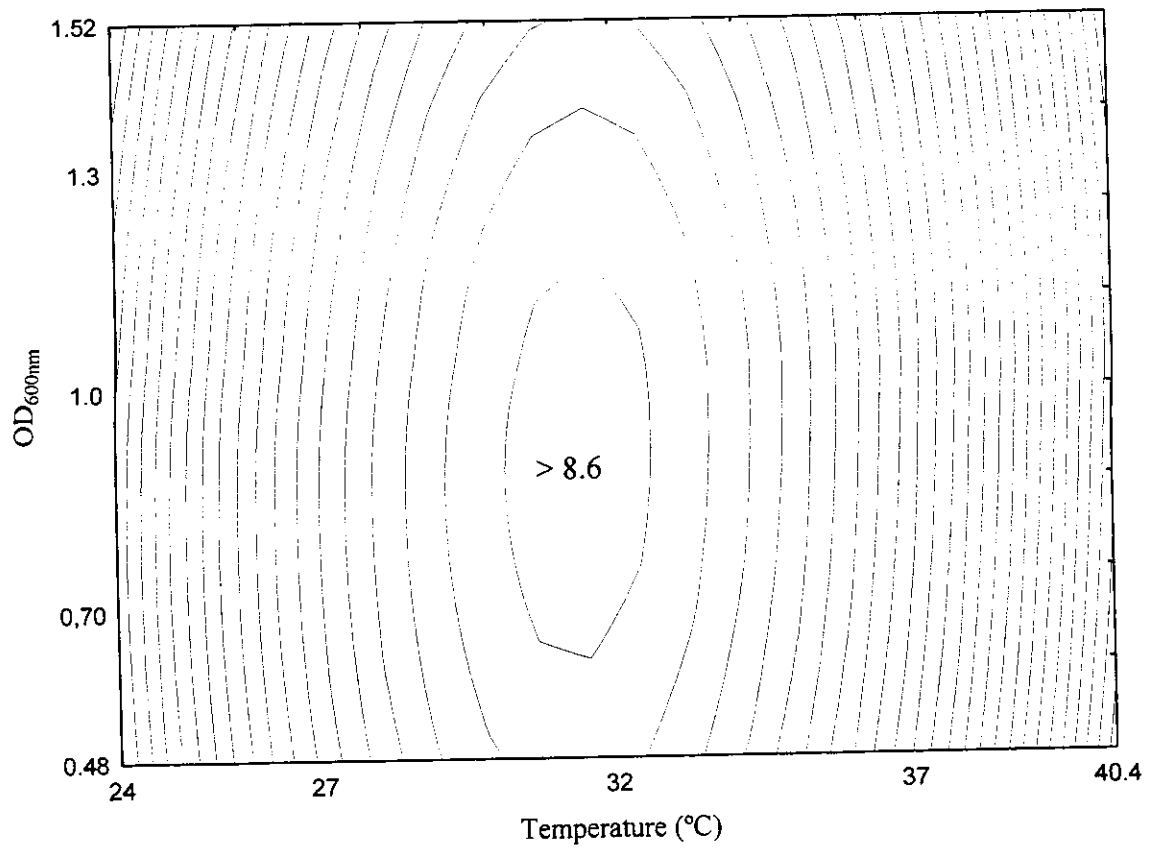


Figure 3

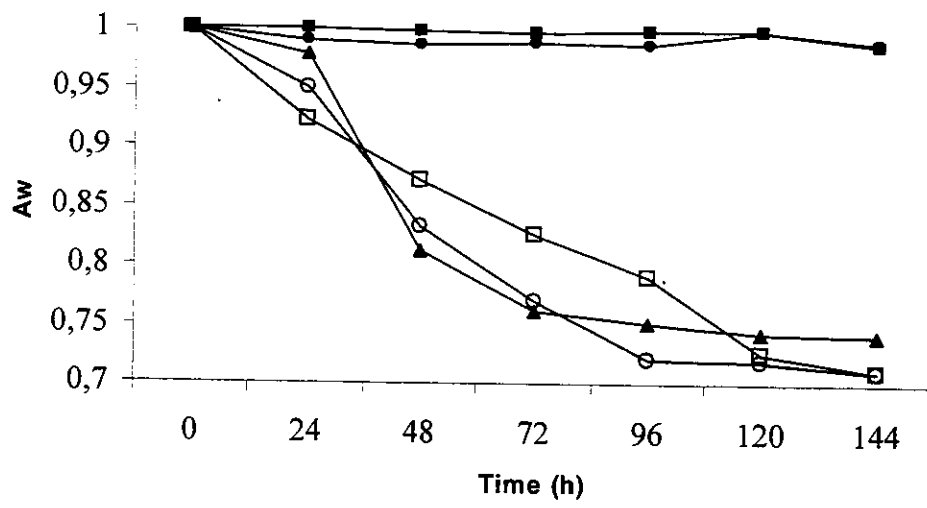


Figure 4

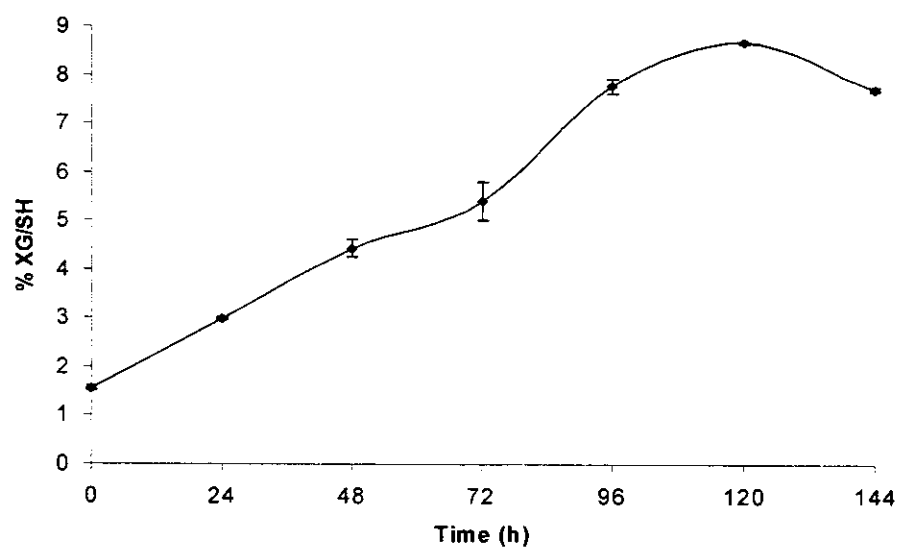


Figure 5

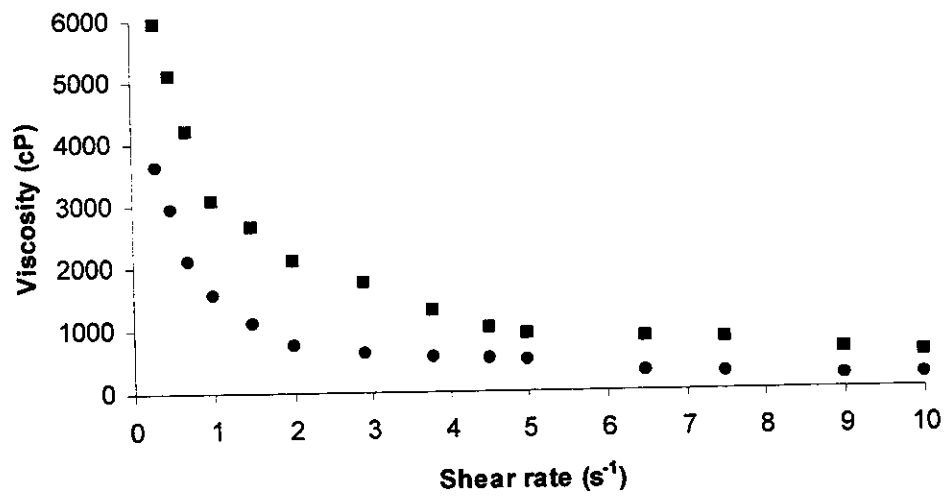


Figure 6

2.2 Xanthan gum production by submerged and solid-state cultivation using soybean hull as substrate

Xanthan gum production by submerged and solid-state cultivation using soybean hull as substrate

Willian José Varela¹, Júlio Xandro Heck², Marco Antônio Záchia Ayub¹,

Plinho Francisco Hertz^{1*}

¹ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Escola Técnica da Universidade Federal do Rio Grande do sul, Rua Ramiro Barcelos, 2777, CEP 90035-007 Porto Alegre, RS, Brazil.

ABSTRACT

Xanthan gum is a microbial polysaccharide widely used in the food industry. Also its use for non-food applications has increased significantly, as it is the case of the petroleum industry. In this study, we consider the use of the soy hull (SH), residue produced in great quantity in the world, as substrate for *Xanthomonas campestris* in three different systems of cultivations for the production of xanthan gum: submerged (SmC), static solid-state (SSSC) and agitated solid-state (ASSC), comparing the SH conversion and the apparent viscosity of the exopolysaccharide among the cultivations. The highest soybean hull conversion into xanthan gum occurred in the ASSC with 19 % in five days cultivations, followed by the SmC 10 % in four days cultivations and SSSC 8 % in five days cultivations. In the comparison among apparent viscosities, it had an exchange in relation to the production, ASSC had 1550 cP, SSSC 1228 cP and SmC 935 cP for the same shear rate of 1 s^{-1} at 25°C . Soybean hull showed to be a support in potential for the microbial growth and an alternative of non-expensive substrate for production of biomolecules.

Keywords: Soybean hull; submerged cultivation; solid-state cultivation; xanthan gum.

* Corresponding author. E-mail: plinho@ufrgs.br

1. Introduction

Xanthan gum is a microbial heteropolysaccharide composed of a 1-4-linked β -D-glucose backbone substituted with trisaccharide side chains that is composed of two mannoses and one glucuronic acid at every second residue [1]. Xanthan is a water-soluble polysaccharide that is produced industrially from sucrose or glucose by fermentation using the Gram-negative bacterium *Xanthomonas campestris* [1, 2].

Xanthan is employed as a thickener in many industries, stabilizing the suspensions and the emulsions in the paper mill, textile industries and in enhanced oil recovery [3]. It is also frequently employed in the food industry because of its solubility in hot or cold water, high viscosity at low concentrations, little variation in viscosity with changes in temperature, and stability in acid systems [4]. Xanthan is the most important microbial polysaccharide from the commercial point of view, with a worldwide production of about 30000 tons per year. It has widespread commercial application as a viscosity enhancer and stabilizer in the food, pharmaceutical and petrochemical industries [5]. The petrochemical industry uses other plant-derived polysaccharides and synthetic polymers instead of xanthan gum based on the relative costs of xanthan gum to the other polymers [2, 6, 7].

Commercially-available xanthan gum is relatively expensive due to glucose or sucrose being used as the sole carbon source and the very stringent purity standards of the Food and Drug Administration for foods. For food-grade xanthan gum, up to 50 % of the production costs are related to downstream purification steps, many of which would not be necessary for non-food applications. Another cost reduction could be achieved by using less expensive substrates, such as waste agricultural products [2]. An example of increasing agro-industrial residue in the world is the soy hull. According to FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation), the world-wide

production of soy in the harvest of 2006/2007 reached 228 million tons, and each ton of soy that is processed, about 2 % of the soybean is transformed into the residue, currently with little exploitation [29]. The soy hull is composed for 91% of dry mass, 15 % of crude protein, 57 % of fiber in neutral detergent, 42 % of fiber in acid detergent, 2,1 % of lipid and 5,75 % of mineral substance, what makes it a substrate potential for bioconversion [19, 29].

A rational form of exploitation of residues is to transform them into biomolecules of commercial interest through biotechnological processes as the solid-state and the submerged cultivations. The aim of this study was, first, to produce xanthan gum using only soybean hull as substrate for *Xanthomonas campestris* in the solid state (static and agitated) and submerged cultivations, comparing the percentage of soybean hull conversion into xanthan gum related to each cited system, and still, to evaluate the rheology of biopolymer produced.

2. Material and methods

2.1. Microorganism

Xanthomonas campestris DSM 1706 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH – Germany) was used in this study. Stock cultures were maintained in suspension frozen in 25 % glycerol.

2.2 Media and inoculum

2.2.1 Pre-inoculum

For the cultivations, *Xanthomonas campestris* were raised in YM Broth with the following composition (g.L^{-1}): malt extract 3.0, yeast extract 3.0, peptone 5.0, glucose 10.0 [8, 9]. The pre-inoculum for all experiments was prepared in 500 mL Erlenmeyer flasks with 200 mL of YM medium. The cultures were grown at 30° C in rotatory

shaker, 150 rpm, for 24 h and OD_{600nm} 1.0 and these cultures were used as inoculum for submerged cultivation and for the solid-state (with agitation and static). After the pre-inoculum growth for 24 hour, successive dilutions with broth YM were made to adjust the optical density of 1 ± 0.05 in 600 nm.

2.2.2 Submerged cultivations

The medium used for this culture was composed of 10 g of soybean hull (mesh 40) with 200 mL of water, prepared in Erlenmayer of 500 mL, taken to the agitated shaker (150 rpm), 30° C at 4, 48, 72, 96, 120 and 144 h. The inoculum was of 10 % (v/v) and for each cited time three repetitions have been made.

2.2.3 Solid-state cultivations

The substrate was prepared with soybean hull (mesh 40) and water in ratio 1:2.5. This way, the culture static-vertical line (SSSC) was made with 40 g of soybean hull and 100 mL of water, forming columns that varied from 13 to 15 cm of height in each bioreactor. The cultivation took place in a heating with controlled temperature of $30 \pm 1^\circ$ C during 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h. For the agitate-horizontal line (ASSC), 1 kg of soybean hull and 2.5 L water were mixed inside the bioreactors under agitation of 10 rpm (same agitation of the seven days cultivations). During 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h, samples in three repetitions were removed for posterior analysis. In both cultivations, 10 % (v/v) were inoculated in each bioreactor. Either for the submerged or for the solid-state, initial pH has been maintained around 6.8 and 7.2, not being necessary any corrections. All experiments were conducted in triplicates.

2.2.3.1 Solid-state bioreactors

In the SSSC, it was used 500 mL packed-bed bioreactors, with base for solid substrate of 60 mm of diameter and 170 mm of height, designed in our laboratory [10]. In each bioreactor, wet and sterilized air ($500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) was forced into the interior.

After the sterilization of the mediums, the inoculums were made, being the mixture taken to each bioreactor. For ASSC, the bioreactor was 12 L, horizontal drum, with rotation (20 cm diameter; 40 cm height) also designed and constructed in our laboratory [13]. During cultivation, wet sterile air was supplied at a constant flow of $3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. The schemes representing the two bioreactors are shown in Figure 1 and Figure 2, respectively.

2.3 Xanthan recovery

In SC, pellet of cells and soybean hull were separated from the cultivated broth for centrifugation (15000 g 20 min). To the cultivated broth, it was added three parts of ethanol 95 % for the precipitation, followed by another centrifugation [2, 11, 12]. The exopolysaccharide precipitated was collected in plates and dried in a heating at a temperature of 50°C until constant weight. In SSSC and ASSC, previously to the process described above, the soybean hull cultivated was submitted to an extraction of the EPS in which, three parts of the initial volume of water were added (300 mL for static and 7.5 L for the agitated) and a 150 rpm agitation for 20 min was made.

2.4 Rheological analysis

After the complete drying of the EPS, it was prepared aqueous solutions with concentration of 3 %. The rheology of the solutions was determined in a Brookfield reometer model LVDV III+. For this, the data of shear rate was used (τ), measured from deformation rates (γ), following the model of Ostwald-de-Waele or power-law [14, 15, 16]. With the values of τ and γ statistically evaluated for a non-linear estimative, it is possible to obtain K (consistency index) and n (behavior index) for all solutions. Thus, absolute viscosity for a "power-law" fluid was determined from the Equation (1) using spindles 31 at a temperature of 25°C .

$$\mu_a = \frac{\tau}{\gamma} = K (\gamma)^{n-1} \quad (1)$$

3. Results and discussion

3.1 Xanthan gum production

Before starting the culture processes, a study to evaluate the capacity of water retention for the substrate soybean hull was made, with the purpose of getting an excellent ratio SH/water for the two cultivations. Since solid-state cultivation is defined as the culture involving solids in absence (or near absence) or free water; however, substrate must possess enough moisture to support growth and metabolism of microorganisms [17]. Therefore, the best ratio obtained was 1 (SH) for 2.5 (water) w/v.

For the SmC, in Erlenmayer flasks, 10 % (w/v) was the condition that best satisfied the characteristics of the liquid culture.

The choice of the temperature for the cultivation was based on the excellent growth of the *Xanthomonas campestris*, already studied in SC and SSC. This temperature varies from 28 to 32° C [2, 18].

The results related to the cultivation are grouped in Figure 3 where it is observed the profile of xanthan gum production throughout six days. The three forms of culture were conducted until six days due to the fact that the solid-state cultivation agitated stabilizes the production in five days and diminishes significantly in the sixth day. The data related to the percentage of conversion were obtained from the amount of substrate which was converted into xanthan gum (both in dry mass) during the cultivation.

The amount of gum that precipitated in day zero of the cultivation was the one produced in the inoculum, added to the one contained in the soybean hull. Previous studies with washed soybean hull demonstrated a decrease of 50 % (date not shown) in the production of EPS, this indicates that the *Xanthomonas campestris* first makes use

of these soluble carbohydrates to convert them, and uses the soybean hull when the availability of these carbohydrates ceases in the medium.

When we compare the soybean hull conversion, the ASSC was the one that produced the highest quantity of gum: in five days of cultivation, 19 % of the initial amount of soybean hull was converted into gum and the production reached 168.5 g. For the SSSC, the maximum production also occurred in five days, conversion of 8 % of soybean hull from the total. On the other hand, for the SmC, the peak of conversion occurred in four days, converting 10 % of the soybean hull. When Yoo and Harcum produced xanthan gum using waste sugar beet pulp, the conversion reached 80 %, however, the substrate was enriched with sucrose and when the substrate was only sucrose, the conversion reached 50 % [2]. Stredansky and Conti produced xanthan gum in solid-state cultivation using citrus peels, the substrate conversion was 13 % and when spent malt grains was added, 24 % was obtained [11]. Kennedy et al. [12] produced xanthan gum using spent malt grains in submerged and solid-state cultivation and a conversion of 1,6 % and 10 % was reached, respectively. In the study of Stredansky et al, the medium was also enriched with mineral salts and carbohydrates. Thus, the utilization of pure soybean hull as substrate is pertinent and comparable to other studies.

In the SSSC, the 500 mL min⁻¹ outflows and 3 L min⁻¹ were observed as being the ones that did not promote the drying of the substrate throughout the six days of cultivation. For the SmC, the cellular growth might have been harmed due to a lack of oxygen renewal in the Erlenmayer flasks.

3.2 Rheology of the Gum

For the industrial project of biopolymers production, the rheological properties influence directly in the sizing of equipments. Therefore, it was evaluated the apparent viscosity of the aqueous solutions of xanthan gum produced in three forms of

cultivation in a 3 % (w/v). These solutions are relative to the points of maximum production in each cultivation. The evaluated results can be observed in Figure 4, in which the analyzed solutions evidence a pseudoplastic behavior, that is, apparent viscosity decreases with the increase of the shear rate. This behavior is expected in polymeric solutions of microbial polysaccharides [20, 21, 22]. It is also observed a thixotropic behavior that suggests the content of pyruvate found in the xanthan. Gums with high quantity of pyruvate showed a thixotropic behavior, while gums with low quantity of pyruvate did not demonstrate the same behavior. It is known that the pyruvate content is an indicative of the quality of the xanthan gum [16].

The existence of residual tension has been object of controversy in the publication of works showing that this value disappears when the shear rate is around zero. The existence of residual tension is desirable in some situations. Therefore, it is important to evaluate its existence and intensity. The measures in low taxes of shear rate are extremely important to verify the possibility of application in some systems in which they are necessary [23,24].

Analyzing individually the transcriptions of the samples using a shear rate of 1 s^{-1} (common rate to all cultivations), it is observed that the solution made from the gum produced in ASSC presented a higher apparent viscosity when compared to the other two processes of cultivation. In relation to the SmC, the production of xanthan gum was higher than in the SSSC, however when the viscosities were compared, it demonstrated to produce gums less viscose. This difference probably is associated to the molecular weight of xanthan gum and also to the levels of pyruvic acid and acetal substitutions influenced by the conditions of bacterial growth [4].

Comparing the viscosity of the gums produced in this study that were of 1550 cP for ASSC, 1228 cP for SSSC and 935 cP for SmC, to gums of other works, our values

are lower. However, the concentration of biopolymer in solution and the shear rate are different. For example, for a shear rate of approximately 10 s^{-1} , Navarrete and Shah [25] obtained an apparent viscosity of approximately 100 cP, for a solution of $1,4 \times 10^{-4}$ % of diutan at 24° C and Ashtaputre and Shah [26] had an apparent viscosity of approximately 200 cP in solutions of 0,5 % of the biopolymer at 30° C .

The properties of the polysaccharides in solution do not depend only on the concentration of the analyzed aqueous solution, but also on its intrinsic physical and chemical characteristics, such as molecular weight, polydispersivity and degree of substitution. In the case of the microbial polysaccharides, these properties, as well as the efficiency of the production, are related to the fermentative process, bacterial strains, composition of the medium, pH, temperature and other ambient parameters of the cultivation [27].

Some gums in aqueous solutions form solutions highly viscose or weak gels, that can become rigid and fragile in presence of several positive ions, when they are desacetylated with alkali [26, 28]. The presented results indicate that it must be investigated other systems of dispersion, able to be added ions to the solutions, increasing this way the viscosities obtained so far. The interaction of the xanthans produced here with other polymeric systems can also modify the viscosity of the solutions and also must be studied.

4. Conclusions

In this work, it was possible to produce xanthan gum in the three systems of cultivation: submerged, static and agitated solid-state cultivation using pure soybean hull as substrate. In the agitated one, taking in consideration the biotransformation of soybean hull into gum, the production and the apparent viscosity were higher than the

others (SmC and SSSC). The soybean hull demonstrated to be a support for the proper microbial growth in the studied conditions, being able to be tested to produce other biomolecules for other microorganisms. Due to the advantages of the production in SSC, it is necessary a study of technologies that might promote the scale-up of the equipments, since this system seems to be adequate for the use of alternative substrate as it is the case of the agro-industrial residues, soybean hull in particular, produced in abundance in the whole world.

5. References

1. Higiroy J, Herald TJ, Alavi S (2006) Rheological study of xanthan and locust bean gum interaction in dilute solution. *Food Research International* 39:165-175.
2. Yoo SD, Harcum SW (1999) Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. *Bioresource Technology* 70:105-109.
3. Kennedy JF, Bradshaw IJ (1984) Production, properties and application of xanthan. *Progress Ind. Microbiol.* 19:319-371.
4. Casas JA, Santos VE, García-Ochoa F (2000) Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme and Microbial Technology* 26:282-291.
5. Stredansky M, Conti E, Navarini L, Bertochi C (1999) Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. *Process Biochemistry* 34:11-16.
6. Cotrell WI, Kang SK (1978) Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food application. *Dev. Ind. Microbiol.* 19:177.
7. Katzbauer B (1998) Properties and application of xanthan gum. *Polymer Degradation and Stability* 59:81:84.

8. Jeanes A, Rogovin P, Cadmus MC, Silman RW, Knutson CA (1976) Polysaccharide (xanthan) of *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: procedures of culture maintenance and polysaccharide production purification and analysis. Agricultural Research Service, US Department of Agriculture ARS-NC-51.
9. Casas JA, García-Ochoa F (1999) Viscosity of solutions of xanthan/locust bean gum mixture, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:25-31.
10. Heck JX, Hertz PF, Ayub MAZ (2002) Cellulase and xylanase production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. *Braz. J. Microbiol.* 33:213-218.
11. Stredansky M, Conti E (1999) Xanthan production by solid-state fermentation. *Process Biochemistry* 34:581-587.
12. Kennedy JF, Jones P, Barker SA (1982) Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. *Enzyme Microb. Technology* 4:39-43.
13. Heck JX, Hertz PF, Ayub MAZ (2005) Extraction optimization of xylanases obtained by solid-state cultivation of *Bacillus circulans* BL53. *Process Biochemistry* 40:2891-2895.
14. Chhabra RP, Richardson JF (1999) Non-Newtonian Flow in the Process Industries Fundamentals and Engineering Applications. Butterworth Heinemann 436 p.
15. Weiss RM, Ollis DF (1980) Extracellular microbial polysaccharide. *Biotechnology Bioeng.* 22:859-873.
16. Flores CJL, Deckwer WD (1999) Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. *Biotechnology Progress* 15:446-452.
17. Pandey A (2003) Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:81-84.

18. García-Ochoa F, Santos VE, Alcon A (2004) Structure kinetic for *Xanthomonas campestris* growth. *Enzyme and Microbial Technology* 34:583-594.
19. Nakamura T, Owen FG (1989) High amounts of soyhulls for pelleted concentrate diets. *Journal. Dairy Sci.* 72:988-1003.
20. Cacik F, Dondo RG, Marqués D (2001) Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. *Computers and Chemical Engineering* 25:409-418.
21. Rao YM, Suresh AK, Suraishkumar GK (2003) Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. *Process Biochemistry* 38:1301-1310.
22. Pace GW, Righelato RC (1980) Production of extracellular microbial polysaccharides. *Advances in Biochemical Engineering* 15:41-70.
23. Sutherland IW (1994) Structure-function relationship in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 12:393-448.
24. Navarro RF (2002) Aplicação de um modelo reológico não-linear em sistemas poliméricos dilatantes. *Polímeros: Ciência e Tecnologia* 12:41-47.
25. Navarrete RC, Shah SN (2001) New biopolymer for coiled tubing application. *Society of Petroleum Engineers* 68487:1-10.
26. Ashtaputre AA, Shah AK (1995) Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11:219-222.
27. Banik RN, Kanari B, Upadhyay SN (2000) Exopolysaccharide of the gellan family: prospect end potencial. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16:407-414.
28. Sutherland IA (2002) Microbial polysaccharides: currents products and future trends. *Microbiology Today* 29:70-71.

29. Anderson SW, Merrill JK, Klopfenstein TJ (1988) Soybean hulls as energy supplement for grazing ruminant. *Journal of Animal Science* 66:2959-2964, 1988.

Figure 1: Scheme of the vertical packed-bed bioreactor.

Figure 2: Scheme of the horizontal drum agitated bioreactor.

Figure 3: Kinetics of xanthan gum production during seven days of cultivation in (▲) ASSC, (■) SSSC and (●) SmC. Average of three repetitions.

Figure 4: Viscosity of 3% aqueous solutions of xanthan gum at different shear rates at 25° C. (▲) ASSC, (■) SSSC and (●) SmC.

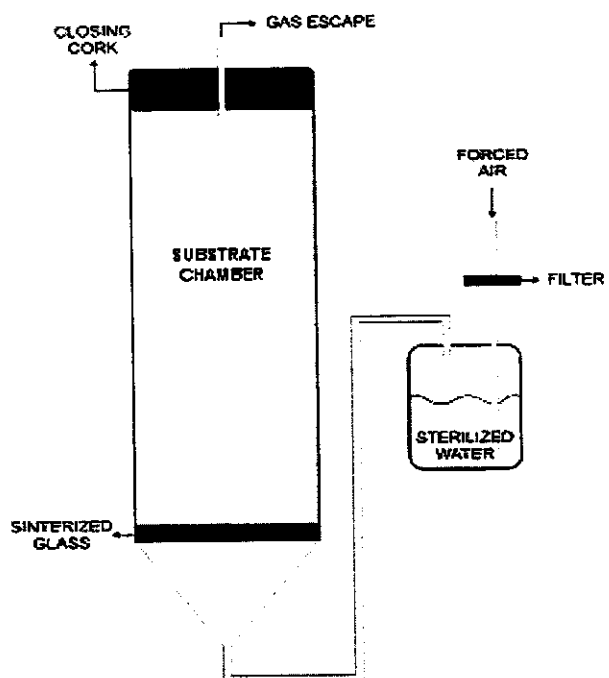


Figure 1: Scheme of the vertical packed-bed bioreactor.

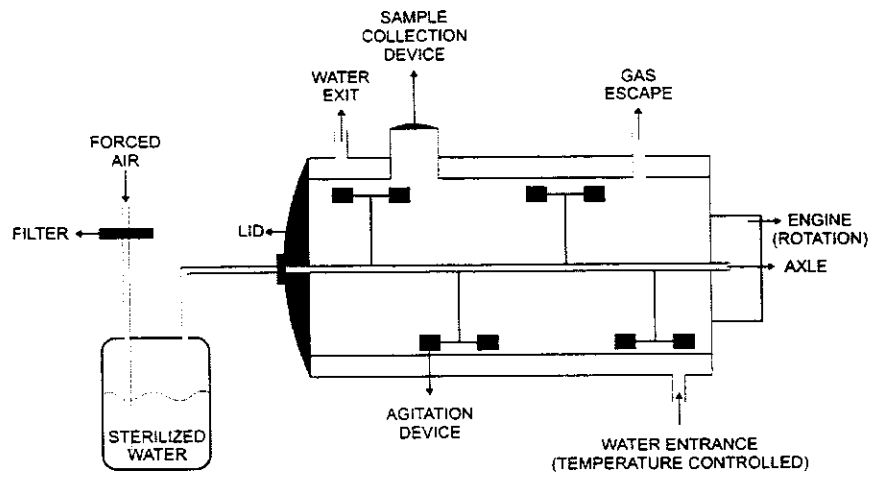


Figure 2: Scheme of the horizontal drum agitated bioreactor.

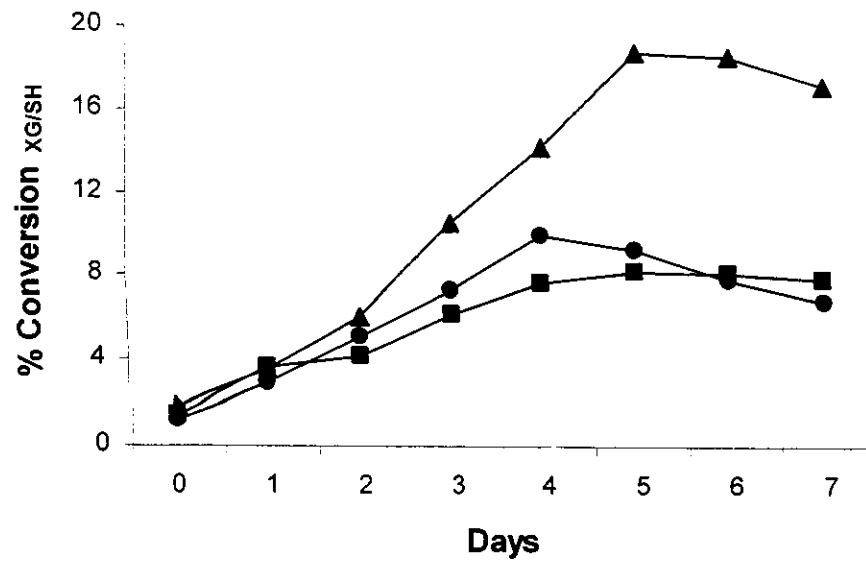


Figure 3: Kinetics of xanthan gum production using soybean hull as substrate during six days of cultivation in (▲) ASSC, (■) SSSC and (●) SmC. Average of three repetitions.

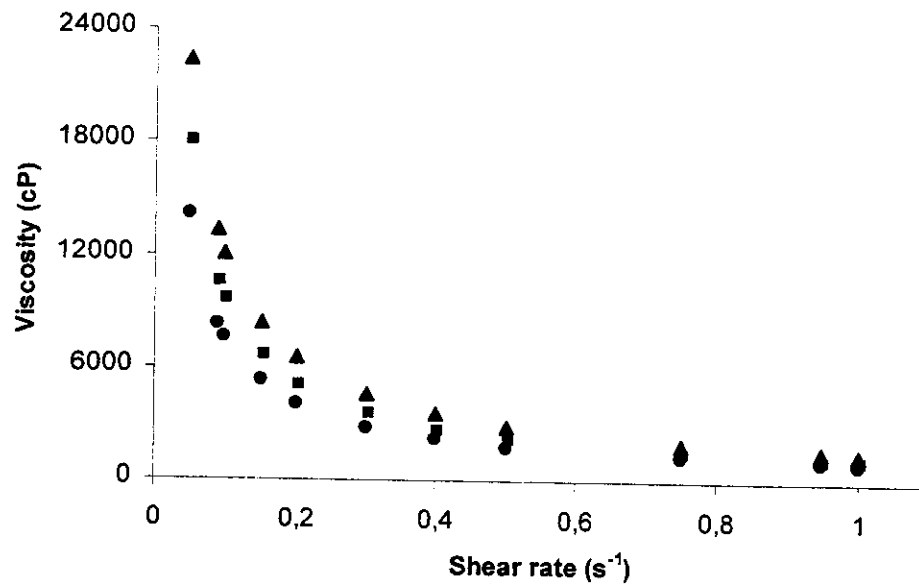


Figure 4: Viscosity of 3% aqueous solutions of xanthan gum at different shear rates at 25° C. (\blacktriangle) ASSC, (\blacksquare) SSSC and (\bullet) SmC.

3. DISCUSSÃO GERAL

Para atender as características do cultivo semi-sólido o qual Pandey (2003) define como cultivo onde o substrato deve estar na forma sólida, ou com aspecto sólido, não perdendo água ou não apresentando água na forma livre, antes de iniciar os cultivos referentes ao planejamento experimental, conduziu-se um estudo para avaliar a capacidade de retenção de água pelo substrato e a granulometria de moagem a ser utilizado (dados não mostrados). Desta maneira, quando utilizamos granulometria menor que mesh 40, a casca absorvia mais água que em granulometrias maiores, porém, quando a mistura casca-água foi levada aos biorreatores ficava compactada dificultando a difusão de oxigênio pelos espaços nas colunas de substrato. No mesh 40, casca de soja absorvia o máximo de água possível para atender as essas características e ao longo dos cultivos, essa água não era desprendida, mantendo as tubulações condutoras de ar úmido desobstruídas para os biorreatores. A característica ótima de substrato nessa situação, seria a proporção casca-água que obtivesse uma maior coluna de substrato e menos compactação. Com mesh 40 e proporção 1:2.5 (casca:água) as colunas de substrato variaram de 13-15 cm, quando o mesh era menor, essas colunas variaram de 8 – 10 cm. Em granulometrias maiores, ocorria uma diminuição na absorção de água pela casca, e desta maneira, a umidade do cultivo era prejudicada logo nos primeiros dias, influenciando diretamente na produção de goma. A moagem da casca, além de melhorar a questão de absorção de água, altura das colunas e proporcionar espaços vazios no meio das colunas, serviu para aumentar a área de superfície de contato entre o microrganismo e o substrato.

A cada cultivo realizado, foi quantificada a goma produzida no tempo zero, ou seja, logo após o inoculo, os processos de extração e precipitação eram feitos. Polissacarídeos originários da casca da soja precipitavam em quantidades consideráveis, chegando a aproximadamente 2 % do total de casca em base seca inicialmente cultivada. Esse precipitado poderia influenciar diretamente na viscosidade final do produto. Sabe-se que uma das características da goma xantana é formar soluções viscosas em baixas concentrações (PSOMAS, 2007), essa mistura com o polissacarídeo da casca, diminuiria a viscosidade final da goma em solução. Assim, sucessivas lavagens da casca foram feitas para que a água lixiviasse esses açúcares até que não precipitasse essa goma da casca, então, o precipitado ao final dos cultivos seria a goma produzida unicamente durante o cultivo. No entanto, foi feita a quantificação final da goma, foi observada uma diminuição de mais de 50 % na conversão de substrato em goma. Provavelmente, a *X. campestris* utiliza esses açúcares solúveis para a conversão, num primeiro momento, e depois de exauridos, o microrganismo recorre à casca de soja propriamente dita. Sutherland (1993) relata que a *X. campestris* é capaz de secretar enzimas que degradam os polissacarídeos estruturais como a celulose e as pectinas para a produção de

goma xantana. Em vista disso, resolveu-se utilizar a casca, sem tratamento prévio nenhum, como substrato. Além disso, a lavagem da casca gera mais efluentes contrariando uma das grandes vantagens do cultivo semi-sólido em relação ao submerso que é justamente a diminuição da quantidade de efluentes.

Ao concluir esses testes preliminares, definiram definiu as variáveis do processo bem como os níveis a serem variados. Optou-se em variar a temperatura de cultivo, taxa de aeração e tamanho do inoculo. A temperatura e aeração foram testadas por influenciarem no desenvolvimento e metabolismo microbiano, uma vez que, Rosalam e England (2006) relatam que *X. campestris* é um microrganismo estritamente aeróbio que cresce em temperaturas entre 28-34° C. Relatam ainda que a goma xantana é um exopolissacarídeo excretado que fica envolto à parede celular a fim de evitar danos como desidratação, ataque por vírus e aumenta a proteção à fotossensibilidade formando redes mucilaginosas intercelulares e que, a produção de goma xantana é diretamente proporcional à quantidade de biomassa no meio, portanto, utilizamos o inoculo como variável do processo

De acordo com as três variáveis escolhidas e as respostas que foram conversão da casca em goma e viscosidade da goma em solução, escolheu-se o planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais gerando 17 combinação de tratamentos e cinco níveis para cada variável. A temperatura variou de 24-40.4° C, a aeração de 0-1000 mL min⁻¹ e inoculo de 0.48 – 1.52 (DO_{600nm}).

Nestas condições, para a conversão da casca em goma, a temperatura ótima de cultivo foi de 31.2 ° C, aeração de 467 mL.min⁻¹ e para o inoculo 0.93. Matematicamente, o modelo estatístico fornece um ótimo para o inoculo, porém, se observarmos as superfícies de respostas, verifica-se que independente do inoculo utilizado, a conversão mantêm-se a mesma. O modelo estatístico apresentou como ótimo 8.63 % de conversão, experimentalmente obtivemos 8.65 %, uma diferença menor que 2 %.

Para a resposta viscosidade, o modelo não foi significativo. Os níveis ótimos foram maiores que os estudados neste trabalhos. Portanto, a viscosidade experimental, foi analisada de acordo com as condições ótimas de conversão. A característica de pseudoplasticidade e tixotropia da goma em solução, foram observadas na validação do processo, características essas típicas de gomas microbianas.

Em paralelo a este estudo, avaliou-se a produção de goma xantana em outros dois sistemas de cultivo: o submerso (*shaker*) e o semi-sólido agitado. Para o submerso, a conversão da casca em goma se aproximou de 10 %, no semi-sólido, essa conversão chegou a 19 %. A agitação do sistema proporcionou um maior contato do microrganismo com o substrato, uma melhor distribuição de oxigênio e temperatura no interior do biorreator..

Quando comparamos as viscosidade dos três sistemas, o submerso produziu gomas menos viscosas. García-Ochoa (2000), relaciona a qualidade das gomas à quantidade de

piruvato na molécula, então provavelmente, as condições do cultivo submerso, desfavoreceram a produção de piruvato, e as gomas produzidas apresentaram-se menos viscosas quando em soluções.

Ao longo dos cultivos, observamos um ressecamento do substrato dentro dos biorreatores estáticos quando os tratamentos eram em extremos de temperatura e aeração. As aerações baixas combinadas com temperaturas altas eram insuficientes para deixar o substrato úmido ao longo de todo o tempo de cultivo e em aerações elevadas independentes de temperatura, a umidade inicial do substrato era arrastada para fora dos biorreatores. Desta maneira, medimos a atividade de água durante seis dias de cultivo e constatamos que alguns cultivos chegaram ao limite de 0.75 para desenvolvimentos bacterianos, repercutindo na produção de goma xantana. Os cultivos que permaneceram com a atividade de água constante converteram mais casca de soja em goma.

Nos três sistemas citados, a casca de soja demonstrou ser um substrato adequado para a bioconversão, especialmente quando consideramos as características do cultivo semi-sólido. A casca, um resíduo com pouca utilidade na atualidade, pode ser usado para produção de biomoléculas de interesse comercial, diminuindo problemas relacionados à poluição e como uma alternativa para os convencionais que aumentam o valor final dos produtos.

4 REFERÊNCIAS

- AHMED, J.; RAMASWAMY, H.S. Effect of high-hydrostatic pressure and concentration on rheological characteristics of xanthan gum. **Food Hydrocolloids**, v. 18 p. 367-373, 2004.
- AMANULLAH, A.; SATTI, S.; NIENOW, A.W. Enhancing xanthan fermentations by different modes of glucose feeding. **Biotechnol Prog.** V. 14 p.265–269, 1998.
- ANDERSON, S.W.; MERRIL, J.K.; KLOPFENSTEIN, T.J.; Soybean hulls as energy supplement for grazing ruminant. **Journal of Animal Science** v. 66 p.2959-2964, 1988.
- ANSELMO, R.J.; VIORA, S.; CARLETTI, S. Producción de goma xántica em cultivos inmovilizados de *Xanthomonas campestris*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 24 p. 86-90, 1992.
- BESSON, I.; CREULY, C.; GROS, J.B.; LARROCHE, C. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans. **Applied Microbiology biotechnology**, v. 17 p. 489-495, 1997.
- BOZA, Y.; NETO, L.P.; COSTA, F.A.A.; SCAMPARINI, A.R.P. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures. **Process Biochemistry**, v. 39 p. 1201-1209, 2004.
- BRADBURY, J.F. *Xanthomonas dowson*. Bergey's. **Manual of Systematic Bacteriology**, v. 1, 1994.
- CHAN, J.W.Y.F.; GOODWIN, P.H. The molecular genetics of virulence of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 489-508, 1999.
- DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: the economic power of microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18 p. 499-514, 2000.
- FIGUEIREDO, I. Açúcar e gordura: Substitutos à altura. **Engenharia de Alimentos**, v. 14, 1997.
- GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. **TransICHemE**, v. 72 p. 227-237, 1994.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**. Canadá v. 18 p. 549-579, 2000.
- HAMCERENCU, M.; DESBRIERES, J.; POPA, M.; KHOUKH, A.; RIESS, G. New unsaturated derivatives of Xanthan gum: Synthesis and characterization. **Polymer**, Beijing v. 48 p. 1921-1929, 2007.
- HERALD, T.J.; HIGIRO, J.; ALAVI, S. Rheological study of xanthan gum and locust bean interaction in dilute solutions. **Food Research International**, v. 39 p. 165-175, 2006.
- HSU, S.H.; LO, Y.M. Characterization of *Xanthan gum* biosynthesis ina centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. **Process Biochemistry**, v, 13 p. 1-9, 2003.
- IELPI, L.; COUSO, R.O.; DANKERT, M.A. **Journal of Bacteriology**, v. 175 p. 2490-2500, 1993.

- KENNEDY, J.F.; JONES, P.; BARKER S.A. Factors affecting microbial growth and polysaccharide production during the fermentation of *Xanthomonas campestris* cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York v. 4 p. 39-43, 1984.
- LEE, H.C.; BRANDT, D.A. *Macromolecules*, v. 35 p. 2223-2234, 2002.
- LETISSE, F.; CHEVALLEREAU, P.; SIMON, J.L.; LINDLEY, N.D. Kinetic analysis of growth and xanthan gum production with *Xanthomonas campestris* on sucrose, using sequentially consumed nitrogen sources. **Appl Microb Biotechnol**, v. 55 p. 417-22, 2001.
- LII, C.Y. Xanthan gum-complexes. **European Polymer journal**, v.3, p. 1377-1381, 2002.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL W. *Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo, v.3 p. 125-154, 2001.
- LO, Y.M.; YANG, S.T.; MIN, D.B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cells growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Appl Microbiol Biotechnol**, Berlin v. 47 p. 689-94, 1997.
- MAUGERI, F. Produção de polissacarídeos. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, v. 3, 2001.
- MAURY, A.; ROQUE, J. Lês Polysaccharides. **Biofutur**, p. 17-31, 1986.
- MONTEIRO, C. L. B. Técnicas de avaliação sensorial. 2 ed. Curitiba: **Universidade Federal do Paraná**, p 101, 1984.
- MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; GIL-TURNES, C.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv. pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 15 p. 496-474, 2001.
- NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, Editora da Unicamp, 2001. 401p.
- OH, S.; RHEEM, S.; SIM, J.; KIM, S.; BAEK, Y. Optimizing condition for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tyrtone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. **Applied Environmental Microbiology**, Washington v. 61, p. 3809-3814, 1995.
- PACE, G.W.; RIGHELATO R.C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 15 p. 41-70, 1980.
- PADILHA, F.F. Síntese e caracterização de biopolímeros por *Beijirinkia sp* 7070. **Dissertação de Mestrado (UFPEL)**, Pelotas, 1997.
- PADILHA, F.F. Produção de biopolímeros sintetizados por microrganismos. **Tese de doutorado (UNICAMP)**, Campinas, 2003.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13 p. 81-84, 2003.
- PASQUEL, A. Gomas: utilização e aspectos reológicos. **Boletins do SBCTA**, v. 33 p. 86-97, 1999.

PETER, H.V.; HERBEST, H.; HESSELINK, P.G.M.; LÜNSDORF, H.; SCUMPE, A.; DECKWER, W.D. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34 p. 1391-1397, 1989.

POPLAWSKY, A.R.; URBAN, S.C.; CHUN, W. Biological role of xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. **Appl. Environmental Microbiology**, v. 12 p. 5123-5127, 2000.

PORTILHO, M. Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de *Agrobacterium* sp. **Tese de doutorado, (UNICAMP)**, 2002.

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

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia seqüencial de planejamento. São Paulo: Casa do Pão Editora, 2005. 326p.

ROLZ, C.E. Solid substrate cultivation. eds H.W. Doelle, D.A. Mitchell, C.E. Rolz. **Elsevier Science Publishers Ltda**, p. 173-183, 1992.

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

ROSELL, C.M. Influence of hydrocolloids on dough rheology and bread quality. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 75-81, 2001.

RUDOLPH, K. Infection of the plants by *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p. 193-245, 1993.

SAHIR, A.H.; KUMAR, S.; KUMAR, S. Modelling of a packed bed solid-state fermentation bioreactor using the *N*-tanks in series approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35 p. 20-28, 2007.

SANDFORD, P.A. Potential important microbial gums. **Food Hydrocolloids**, Londres, v. 1 p. 168-1999, 1982.

SHU, C.H.; YANG, S.T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch cultures of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p. 454 – 468, 1990.

SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidium gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenic. **FEMS Microbial Letters**, v. 203 p. 165-171, 2001.

SYMES, K.C. The relationship between the covalent structure of the *Xanthomonas* polysaccharide and its function as a thickening, suspending and gelling agent. **Food Chemicals**, v. 6 p. 63-76, 1980.

STREDANSKY, M.; CONTI, E.; NAVARINI, L.; BERTOCHI, C. Production of exopolysaccharides by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34 p. 11-16, 1999.

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

SUTHERLAND, I.W. Xanthan. London: Chapman & Hall, p. 363-388, 1993.

SUTHERLAND, I.W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 12 p. 393-448, 1994.

SUTHERLAND, I.W. Extracellular polysaccharide. **Biotechnology**. v. 3 p. 532-574, 1998.

VANDAMME, E.J.; BRUGGEMAN, G.; BAETS, S.D.; VANHOOREN, P.T. Useful polymers of microbial origin. **Agro-food Industry Hi-tec**, p. 21-25, 1996.

VAUTERIN, L.; SWING, J. Are classification and phytopathological diversity compatible in *Xanthomonas*? **Journal Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19 p. 77-82, 1997.

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

WOICIECHOWSKY, A.L. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e mandioca. **Tese de doutorado (UFPR)**, Paraná, 2001.