

‘EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CRESCIMENTO CELULAR NA PRODUÇÃO DE XANTANA PRUNI’

EDUARDO DOS SANTOS MACEDO COSTA¹; GEOVANE DIEL DE OLIVEIRA¹;
CAMILA WASCHBURGER AMES²; KARINE LASTE MACAGNAN¹; CLAIRE
TONDO VENDRUSCOLO²; ANGELITA DA SILVEIRA MOREIRA^{1,3*}

¹Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPEL –
eduardodossantosmacedocosta@gmail.com; geovanediel@gmail.com;
karinemacagnan@hotmail.com

²Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial,
UFPEL – camilaames@hotmail.com; Empresa Biopolix - biopolix@biopolix.com.br

³Universidade Federal de Pelotas - angelitadasilveiramoreira@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

Denomina-se xantana os polissacarídeos extracelulares produzidos por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* (ROTTAVA, 2005). Xanthanas comerciais são produzidas por cepas de *X. Campestris* pv *campestris*, enquanto a xantana pruni, uma xantana diferenciada química e reologicamente, é produzida por *X. arboricola* pv *pruni* (KLAIC et al., 2016)

A goma xantana é aplicada em diversos segmentos industriais, como o de alimentos, em cremes, bebidas, laticínios, comidas congeladas, etc. No setor de fármacos é usada principalmente em cosméticos e soluções, e no setor petroquímico é usada na extração de petróleo com finalidade de aumentar o rendimento da extração (GARCÍA-OCHOA, 2000).

As razões para a goma xantana ser altamente utilizada devem-se às suas diversas propriedades, como estabilizador de emulsões, agente de dispersão, estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura, possibilidade de uso em alimentos e boas propriedades reológicas (BORGES, 2008a). Além disso, o uso do polímero é mínimo, visto que as concentrações usadas em suas aplicações são extremamente baixas, variando de 0,03% até apenas 1% (GARCÍA-OCHOA, 2000).

O processo de produção da goma xantana ocorre em biorreatores em fase líquida. A produção e o rendimento de xantana no bioprocessamento são influenciados por diversos fatores, tais como: a composição dos meios, o tipo de biorreator, o modo de operação, composição do meio, e as condições da cultura (temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido) (GARCÍA-OCHOA, 2000). Assim, a grande aplicabilidade industrial da xantana e seu amplo mercado mundial vêm estimulando os pesquisadores da área a desenvolverem estudos sobre as melhores condições de multiplicação celular da *Xanthomonas* e de produção, recuperação e purificação deste heteropolissacarídeo, bem como estudo sobre as suas propriedades, a fim de obter a melhor relação de rendimento e qualidade reológica do produto sintetizado (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000; VENDRUSCOLO et al., 2000; DIAZ, 2002; ANTUNES et al., 2003; BORGES 2008b; BORGES et al., 2009a; BORGES et al., 2009b).

Os meios utilizados necessitam, além de fonte de carbono e de nitrogênio, de vários nutrientes, como magnésio, potássio entre outros. O nitrogênio pode estar presente tanto de forma orgânica ou inorgânica nos meios, e concentrações baixas favorecem a produção de xantana (Luvielmo et al., 2009). Assim, o objetivo deste trabalho foi o aprimoramento dos meios utilizados na fase de crescimento celular buscando redução de custos por meio de redução/substituição dos insumos fonte de nitrogênio orgânico e aumento da

produção da xantana pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni através da modulação da presença e/ou concentração dos componentes peptona; extrato de malte e extrato de levedura nos meios de crescimento celular.

2. METODOLOGIA

2.1 Materiais

Utilizou-se a bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni cepa 101 pertencente à bacterioteca do Laboratório de Biopolímeros (CDTec - UFPEL), peptona (Kasvi ®), extrato de malte (Kasvi ®) e extrato de levedura xx (Procelys ®).

2.2 Crescimento celular (inóculo)

Para o estudo da fase de inóculo foi desenvolvido o delineamento fatorial completo 2^3 , composto de 3 variáveis independentes (x= peptona, y= extrato de malte, z= extrato de levedura) e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 tratamentos.

Preparou-se os tratamentos (inóculos) em *Erlenmeyers* de 250mL previamente esterilizados com água destilada em autoclave vertical, com variações do meio de inóculo em relação às concentrações de peptona, extrato de levedura e extrato de malte do meio padrão Yeast Malt líquido (JEANES, 1974). Utilizou-se como meios padrão o YM e o SPA (HAYWARD, 1964). Incubou-se em *shaker* em 28°C, 150rpm por 24h.

2.3 Produção de Xantana Pruni

Os inóculos obtidos foram adicionados, em uma proporção de 10%, em *Erlenmeyers* de 250mL contendo 40mL meio de produção mineral (MPII) (VENDRUSCOLO et al., 2004). Incubou-se na temperatura de 28°C, 200rpm por 72h. No final da fermentação, recuperou-se a xantana com etanol 96%, na proporção de 4:1 de caldo fermentado. Secou-se o biopolímero em estufa à 56°C até atingir peso constante e determinou-se o rendimento (g.L⁻¹) por gravimetria.

2.4 Análise estatística

As médias dos resultados, de rendimento de xantana (g.L⁻¹) e crescimento celular foram avaliadas em duplicata e analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey $p < 0,05$ no programa Statistix 9.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a tabela 1, os maiores crescimentos celulares foram obtidos a partir dos tratamentos 1, 2 e SPA padrão, sem adição de extrato de malte, alcançando-se de 4,9 a 5,2 x 10⁹ UFC/mL. Já para o rendimento de xantana pruni, os melhores resultado (15,9 e 15,4 g.L⁻¹) foi obtidos nos tratamentos 2 e 5, no quais combinou-se a concentração máxima de peptona com mínima de extrato de levedura, sem adição de extrato de malte, e máxima de extrato de levedura com mínima de peptona, sem adição de extrato de malte, respectivamente.

Tabela 1. Delineamento fatorial 2^3 com valores codificados e reais das variáveis independentes e variáveis respostas, crescimento celular em 24h (UFC/mL) e rendimento de xantana pruni em 72 h (XP – g.L⁻¹).

Tratamentos	Variáveis Independentes			Variáveis Dependentes	
	[Peptona] (g.L-1)	[Ext Malte] (g.L-1)	[Ext Levedura] (g.L-1)	UFC/mL	XP (g.L-1)
1	-1 (1)	-1 (0)	-1 (1)	$4,9 \times 10^9 \pm 1,2^a$	$10,8 \pm 2,6^{bc}$
2	+1 (5)	-1 (0)	-1 (1)	$5,2 \times 10^9 \pm 2,7^a$	$15,9 \pm 0,8^a$
3	-1 (1)	+1 (3)	-1 (1)	$4,1 \times 10^9 \pm 1,1^{abc}$	$12,8 \pm 1,2^{abc}$
4	+1 (5)	+1 (3)	-1 (1)	$4,6 \times 10^9 \pm 0,8^{ab}$	$13,0 \pm 2,8^{abc}$
5	-1 (1)	-1 (0)	+1 (5)	$2,8 \times 10^9 \pm 1,3^{abc}$	$15,4 \pm 2,2^{ab}$
6	+1 (5)	-1 (0)	+1 (5)	$1,0 \times 10^9 \pm 1,7^{abc}$	$12,1 \pm 1,1^{abc}$
7	-1 (1)	+1 (3)	+1 (5)	$8,8 \times 10^8 \pm 2,6^{bc}$	$10,1 \pm 2,6^c$
8	+1 (5)	+1 (3)	+1 (5)	$3,6 \times 10^8 \pm 1,9^c$	$11,3 \pm 1,5^{abc}$
9	0 (3)	0 (1,5)	0 (3)	$3,6 \times 10^8 \pm 0,9^c$	$12,7 \pm 1,5^{abc}$
10	0 (3)	0 (1,5)	0 (3)	$4,8 \times 10^8 \pm 2,4^c$	$12,3 \pm 0,2^{abc}$
11	0 (3)	0 (1,5)	0 (3)	$4,4 \times 10^8 \pm 1,9^c$	$12,7 \pm 0,0^{abc}$
Padrão SPA	5	0	0	$5,2 \times 10^9 \pm 2,1^a$	$13,2 \pm 1,4^{abc}$
Padrão YM	5	3	3	$1,2 \times 10^9 \pm 1,3^{abc}$	$9,2 \pm 1,1^c$

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Todas as variáveis isoladas e combinadas apresentam efeitos significativos ($p < 0,05$) sobre os resultados, com exceção da combinação peptona e extrato de malte no crescimento celular (Figura 1A). A maioria das variáveis independentes apresentaram efeitos negativos, ou seja, a adição de maiores concentrações desses compostos na formulação dos meios de cultivos resultou em crescimento celular e rendimento de xantana inferiores. O extrato de malte isolado teve o segundo maior efeito negativo em ambas respostas. A combinação do extrato de levedura e peptona com ambos na maior concentração também teve efeito negativo, demonstrando que a combinação de qualquer um desses nutrientes em maior quantidade com o outro em menor quantidade é o suficiente para obter excelentes resultados.

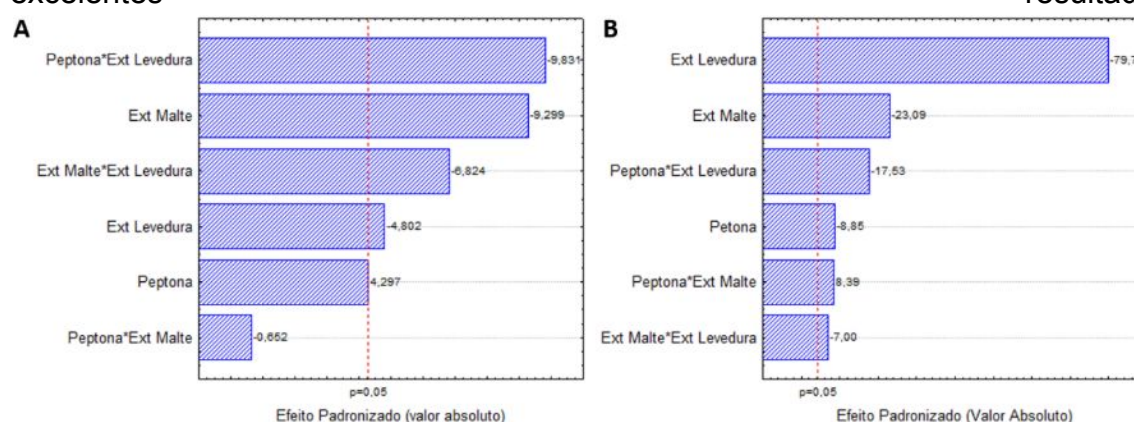


Figura 1. Efeito das variáveis independentes sobre as variáveis respostas (A) crescimento celular (UFC/mL) e (B) rendimento de xantana pruni (g.L-1).

4. CONCLUSÕES

A eliminação do extrato de malte do meio de crescimento aumenta a produção de xantana pruni e reduz custos. Peptona e extrato de levedura devem ser combinados com qualquer um deles na maior concentração e o outro na

menor concentração. A relação entre o custo de produção e rendimento de xantana no processo fermentativo pode ser aprimorado através de estudos como o deste trabalho, e um novo delineamento será realizado apenas com as variáveis peptona e extrato de levedura.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ROTTAVA, I. **SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Xanthomonas* sp PARA PRODUÇÃO DE XANTANA**. maio, 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, URI-Campus Erechim.
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.; CASAS, J.; Gómez, E. *Xanthan gum: production, recovery, and properties*. **Biotechnology Advances**, 18(7), p.549–579, 2000.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Goma Xantana: características e condições operacionais de produção. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 171-188, 2008a.
- LUVIELMO, MM; SCAMPARINI, ARP. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. **Estudos tecnológicos**, v.5, n1, p.50-67, 2009.
- ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.6, p. 317-322, 2003.
- BORGES, C. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB M. A. Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. **Revista Argentina de Microbiología**, v.40, p. 81-85, 2008b.
- BORGES, C. D.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; VENDRUSCOLO, C. T. The influence of thermal treatment and operational conditions on xanthan produced by *X. arboricola* pv pruni strain 106. **Carbohydrate Polymers**. v.75, p. 262-268, 2009a.
- HAYWARD, A. C. Bacteriophage sensitivity and biochemical type in *Xanthomonas malvacearum*. **Journal of General Microbiology**, v. 33, p. 287-298, 1964.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. **Polímeros**, v.19, p. 160-165, 2009b.
- CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbiology Technology**, v.26, p. 282-291, 2000.
- DIAZ, P. S. **Influência de parâmetros físicos e químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. 2002. 65f Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- KLAIC, P. M. A; VENDRUSCOLO, C.T; FURLAN, L.; MOREIRA, A. S. Ion exchange as post-fermentative process enhancer of viscosity of xanthan produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 118 – 126, 2016.
- JEANES A. Extracellular microbial polysaccharides—New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, p. 34–40, 1974.