

# SÍNTESE DE BIOPOLÍMERO XANTANA EM MEIOS CONVENCIONAIS E ALTERNATIVOS: VISCOSIDADE X COMPOSIÇÃO

ANTUNES, Adriane E. C.<sup>1</sup>; MOREIRA, Angelita S.<sup>3</sup>; VENDRUSCOLO, João L. S.<sup>4</sup>; VENDRUSCOLO C. T.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial -UFPEL; <sup>2</sup> Departamento de Ciência de Alimentos- UFPEL; <sup>3</sup> Centro de Biotecnologia- UFPEL; <sup>4</sup> CPACT-EMBRAPA  
(Recebido para publicação em 28/06/2000)

## RESUMO

Dada a importância industrial da xantana, estudou-se a relação entre viscosidade e composição química de xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* da patovar *pruni* cepa 06, quando produzidas em meios convencionais e alternativos. A viscosidade aparente foi medida em viscosímetro, em quatro taxas de deformação e a composição foi determinada por CCDC. A qualidade da xantana produzida em meios convencionais foi superior o que supostamente ocorreu em função de seu maior teor de manose e ácido glicurônico em sua composição.

Palavras-chave: *Xanthomonas campestris*, xantana, viscosidade, composição química.

## ABSTRACT

SYNTHESIS OF BIOPOLYMER XANTHAN USING ALTERNATIVE AND CONVENTIONAL MEDIA: VISCOSITY X COMPOSITION. Due to industrial importance of xanthan, it was studied the relation between viscosity and chemical composition of samples synthesized by *Xanthomonas campestris* from pathovar *pruni* strain 06, produced in conventional and alternative media. The apparent viscosity was measured in viscometer in four shear rates, and the composition in TCL. The better quality was achieved by xanthan from conventional medium, and probably due it's high quantity of mannose and glucuronic acid.

Key words: *Xanthomonas campestris*, xanthan, viscosity, chemical composition.

## INTRODUÇÃO

A xantana, biopolímero produzido por *Xanthomonas campestris*, é amplamente utilizada em diversos segmentos industriais devido as suas propriedades de emulsificação, suspensão, estabilização e floculação (SUTHERLAND, 1993; NITSCHKE, 1997; QUINN, 1999).

É composta por esqueleto linear celulósico, contendo unidades pentassacarídicas repetidas de D-glucose, D-manose, ácido D-glucurônico e grupos acetal pirúvico e D-acetil (JANSON *et al.*, 1975; STANDKOUWSKI *et al.*, 1993).

A síntese de xantana em laboratório pode ser por fermentação contínua ou intermitente. A maior parte, se não a totalidade, da produção comercial é feita em batelada (TAIT *et al.* 1986; SUTHERLAND, 1993).

Soluções de biopolímeros com propriedades reológicas interessantes do ponto de vista industrial geralmente exibem propriedades pseudoplásticas, viscoelásticas além de elevada tensão residual. Entretanto a determinação viscosidade aparente  $\eta_{ap}$  em solução de baixa concentração é parâmetro mais simples para se avaliar o potencial de aplicação de um biopolímero (SILVA e RAO, 1999.)

*X. campestris* pertence a família *Pseudomonaceae*, sendo gram-negativa, móvel por flagelo único, estritamente aeróbica, fitopatogênica e resistente à estreptomicina. O patovar *pruni* caracteriza-se infectar vegetais do gênero *Prunus* e híbridos, incluindo, pêssegueiro, cerejeira e ameixeira, entre outros, sendo responsável pela "prunus bacterial spot" (BRADBURY, 1948, CIVEROLO e HATTINGH, 1993).

A versatilidade nutricional de *X. campestris* é o maior atributo industrial na produção de xantana. Porém, a qualidade do biopolímero sintetizado em diferentes substratos pode variar consideravelmente quanto ao peso molecular, interferindo em suas características reológicas (SUTHERLAND, 1993).

*X. campestris* possui enzima  $\beta$ -galactosidase, mas a baixa afinidade desta com o substrato dificulta a síntese de biopolímero em meios com lactose (FRANK e SOMKUTI, 1979). No entanto, diversos autores utilizaram soro de leite como substrato para produção de xantana isolando cepas lactose+ ou realizando modificação genética no microrganismo. (SCHWARTZ e BODIE, 1985; FU e TSENG, 1990; FU *et al.*, 1992; KONÍCEK e KONÍCKOVÁ-RADOCHOVÁ, 1992; PAPOUTSOULOU *et al.* 1994; DRAHOVSKÁ e TURNA, 1995). Os mesmos autores relataram, no entanto, que as características crescidas ao microrganismo não se mantiveram estáveis.

Consubstanciado no exposto, objetivou-se avaliar meios convencionais e alternativos para produção de xantana com *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 06, e relacionar viscosidade e composição química dos biopolímeros sintetizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL

#### Material biológico

*Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 06, mantida a 4°C e repicadas à cada 30 dias em ágar YM (yeast malt) (JEANES, 1974).

#### Goma comercial

Biopolímero xantana, marca Rhodigel Supra, fornecida pela Rhodia.

#### Meio alternativo

Soro de leite, proveniente da produção de queijo tipo lanche, coletado em lote único, pH de 6,4, doado pela Cosulati do município de Moro Redondo, RS, e estocado a -10°C.

#### Meios de cultura e produção de xantana

A) Manutenção das culturas: ágar YM (JEANES, 1974), com a seguinte composição em g.L<sup>-1</sup>: 3g extrato de levedura, 3g extrato de malte, 5g peptona, 10g glicose e 25g ágar ágar;

B) Reprodução de células para inóculo (pé-de-cuba): meio líquido YM (JEANES, 1974), com a composição, em g.L<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>, de 3g extrato de levedura, 3g extrato de malte, 5g peptona e 10g glicose;

C) Meios convencionais para produção de xantana: MPI formado pela junção dos meios de SOUW e DEMAIN (1979), e de CADMUS *et al.* (1978), composto, em g.L<sup>-1</sup>, de 1,5g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,6g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 2,0g ácido cítrico; 5,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,006gH<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2,0g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,0024g FeCl<sub>3</sub>; 0,002g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,002g ZnSO<sub>4</sub> e 50,0g sacarose; e meio MPII obtido de CADMUS *et al.* (1978), composto, em g.L<sup>-1</sup>, por 1,5g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O e 50g sacarose.

D) Meios alternativos para produção de xantana: MPA - 900mL de soro de leite.L<sup>-1</sup>; 100mL de solução de sacarose contendo 50g. L<sup>-1</sup>; MPB- 900mL de soro de leite.L<sup>-1</sup>; 100mL de solução de sacarose contendo 50g.L<sup>-1</sup>; 0,2g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.L<sup>-1</sup>; 6g de farelo de arroz. L<sup>-1</sup>; MPC- 900mL de soro de leite. L<sup>-1</sup>; 100mL de solução de sacarose contendo 50g.L<sup>-1</sup>; 0,2g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.L<sup>-1</sup>; 6g de farelo de trigo. L<sup>-1</sup>.

Os meios foram ajustados para pH 7,0 e, posteriormente, esterilizados à 121°C por 15 minutos.

Visto tratar-se de microrganismo lactose negativo foi necessário acrescentar outra fonte de carbono aos meios alternativos. A adição de farelos de arroz e trigo visou elevar a quantidade de nitrogênio e microelementos e o sulfato de magnésio, suplementar este mineral que é co-fator de diversas enzimas.

## MÉTODOS

### Inóculo (pé-de-cuba)

*Erlenmeyers* de 150mL contendo 6mL de meio líquido YM, inoculados com 1mL de cultura contendo 3.10<sup>9</sup> a 1.10<sup>10</sup>UFC.mL<sup>-1</sup>. Seguiu-se incubação em agitador incubador marca New Brunswick Scientific, modelo Innova 4230, a 28°C e 150rpm, por 24 horas.

### Produção de xantana (fermentação)

Após o período de multiplicação de células, transferiu-se o inóculo à *erlenmeyer* de 250mL, contendo 50mL de MPI, MPII, MPA, MPB ou MPC, e incubado a 28°C, 200rpm, por 72 horas (SOUZA, 1999).

### Separação de xantana

O fermentado foi centrifugado à 16.200g em centrífuga marca Sorvall Instruments, modelo RC-5C, a 10°C por 20 minutos para remoção da biomassa (Vendruscolo, 1995). Ao sobrenadante adicionou-se, na proporção de 3:1 (v/v), etanol a 96°GL para insobilização dos biopolímeros, os quais foram recolhidos sobre placas, secados em estufa a 40°C até peso constante, triturados e acondicionados em vidros, vedados com parafilme.

### Viscosidade aparente

Amostras preparadas em solução aquosa a 3% (m/v), medidas em viscosímetro Brookfield rotacional, modelo LV a 25°C e nas taxas de deformação 6, 12, 30 e 60 rpm.

### Composição química

Amostras hidrolisadas e cromatografadas por CCDC segundo a metodologia de MOREIRA *et al.* (1998). Para fins comparativos foram utilizadas amostras autênticas de glicose, manose, ácido glicurônico e ramnose.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Viscosidade aparente

Segundo Figura 1, todas as amostras de xantana apresentaram comportamento pseudoplástico.

A xantana produzida nos meios convencionais MPI e MPII desenvolveram viscosidades comparáveis à xantana comercial, com resultados superiores a 20.000cP a 6rpm.

DESTAFANO e ROSATO (1991), isolando mutantes de *X. campestris* pela viscosidade aparente do biopolímero sintetizado e tomando xantana comercial marca Keltrol como referência, obtiveram valor máximo de 3.650cP em solução aquosa a 1%, 5 rpm à temperatura ambiente. Esse resultado foi comparável ao referencial do trabalho, que foi de 3.250cP.

Quando empregados os meios alternativos os resultados de viscosidade foram baixos. O valor máximo foi de 1.275cP a 6rpm para meio com adição única de sacarose (MPA).

Embora diversos autores tenham utilizado meios alternativos para produção de xantana, a maior parte deles se restringiu à produção, não avaliando a viscosidade do polímero biossintetizado (FU e TSENG, 1990; FU *et al.*, 1992; KONÍCEK e KONÍCKOVÁ-RADOCHOVÁ, 1992; PAPOUTSOULOU *et al.*, 1994; EL-SALAM *et al.*, 1994; BILANOVIC *et al.* 1994; GREEN *et al.*, 1994).

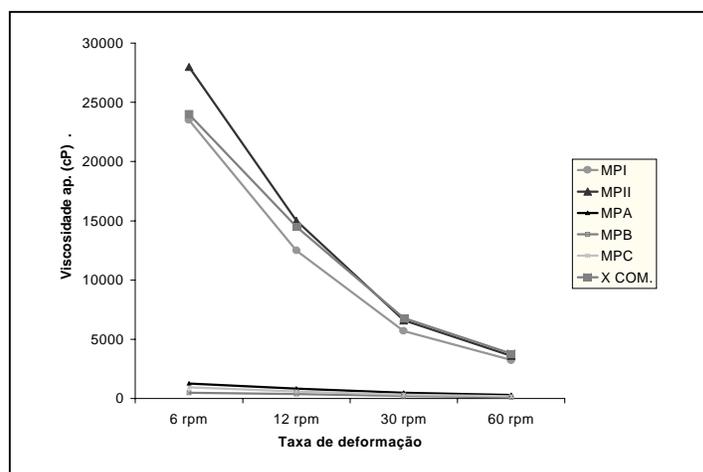


Figura 1: Viscosidade aparente de xantana sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv *pruni*, cepa 06, em solução aquosa a 3% (m/v) em meios convencionais (MPI e MPII) e alternativos (MPA, MPB, MPC) e xantana comercial, em função da taxa de deformação.

### Composição química

Os biopolímeros apresentaram perfis cromatográficos semelhantes entre si. Na sua composição foram identificados o ácido glicurônico, com R<sub>f</sub> de 0,27 e os monossacarídeos glicose, manose e ramnose com valores de R<sub>f</sub> de 0,54; 0,56 e 0,68, respectivamente, confirmando resultado obtido por SOUZA (1998). A xantana comercial não apresenta ramnose na sua composição. LOWSON e SYMES (1977) relataram a presença de ramnose na xantana produzida por *X. juglandis*. Sugere-se que a presença desse açúcar seja uma característica desejável, pois, em geral, os polímeros dos quais faz parte possuem capacidade de formar géis verdadeiros (MCNELLY e KANG, 1977).

Embora qualitativamente os biopolímeros sintetizados em meios alternativos e convencionais sejam iguais, há diferença de intensidade e tamanho nas manchas dos cromatogramas, sugerindo quantidades variáveis de seus componentes. Os biopolímeros produzidos nos meios MPI e MPII parecem conter maior quantidade de manose e ácido glicurônico o que justificaria seu maior potencial espessante. QUINN (1999) afirma que a eliminação dos terminais de manose da xantana diminui a sua capacidade de espessar.

## CONCLUSÃO

*Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepa 06 em meios convencionais produz xantana com qualidade superior às gomas sintetizadas com meios alternativos, contendo soro de leite. A viscosidade dos biopolímeros produzidos em meios convencionais é semelhante a de xantana comercial e sua viscosidade é superior que a da goma produzida nos meios alternativos avaliados devido, provavelmente, ao seu maior teor de manose e ácido glicurônico.

## AGRADECIMENTOS

A equipe agradece à FAPERGS, CAPES, CNPq e Dra. Olinda Martins do CPACT-EMBRAPA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BILANOVIC, D.; SHELEF, G.; GREEN, M. Xantan fermentation of citrus waste. **Bioresource Technology**, v. 48, p. 169-172, 1994.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2<sup>a</sup> ed. Varela, 1992. 150p.
- BRADBURY, J. F. *Xanthomonas*. Dowson. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. (eds). Baltimore: Williams and Wilkins, 1948, v. 1, p.199-210.
- CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 20, p. 1003-1014, 1978.
- CIVEROLO, E. L.; HATTINGH, M. J. *Xanthomonas campestris* pv *pruni*: cause of prunus bacterial spot. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. ed. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p.60-64.
- DESTEFANO, S. A. L.; ROSATO, Y. B. Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. **Rev. Brasil. Genet.**, v. 14, n. 3, p. 599-607, 1991.
- DRAHOVSKÁ, H.; TURNA, J. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* with a mini-mu derivative. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 811-812, Feb.1995.
- EL-SALAM, M. H. A.; FADEL, M. A.; MURAD, H. A. Bioconversion of sugarcane molasses into xanthan gum. **Journal of Biotechnology**, v. 33, p. 103-106, 1994.
- FU, J. -F.; TSENG, Y. -H. Construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4 p. 919-923, Apr.1990.
- FU, J. -F.; CHANG, R. -Y.; TSENG, Y. -H. Construction of stable lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* by chromosomal integration of cloned *lac* genes using filamentous phage  $\phi$ Lf DNA. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 225-229, 1992.
- GREEN, M.; SHELEF, G.; BILANOVIC, D. The effect of various citrus waste fractions on xanthan fermentation. **The Chemical Engineering Journal**, v. 56, p. B37-B41, 1994.
- JANSSON, P. -E., KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, p. 275-285, 1975.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, v. 28, n 5, p. 34-40, 1974.
- KONÍČEK, J.; KONÍČKOVÁ-RADOCHOVÁ, M. Use of whey for production of exocellular polysaccharide by mutans strain of *Xanthomonas campestris*. **Folia Microbiologia**, v.2, p.102-104, 1992.
- LI, G. -Q.; QIU, H.-W.; ZHENG, Z. -M.; CAI, Z. -L.; YANG, S. -Z. Effect of fluid rheological properties on mass transfer in a bioreactor. **Journal of Chem. Tech. Biotechnology**, v.62, p.385-391, 1995.
- LOWSON, C. J.; SYMES, K. C. Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum. **Carbohydrates Research**, v.58, p. 433-438, 1977.
- MCNELLY, W.; KAN, K. PS-7 a new bacterial heteropolysaccharide. In: SANDFORD, P. A.; LASKIN, A. ed. **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington, D. C: American Chemical Society, 1977. p. 220-230.
- MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Determinação de composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: metodologia. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, n. 3, p. 222-224, 1998.
- PAPOUTSOPOULOU, S. V.; EKATERINIADOU, L. V.; KYRIAKIDIS, D. A. Genetic construction of *Xanthomonas campestris* and xanthan gum production from whey. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 12,p. 1235-1240, Dec.1994.
- QUINN, F. X. Xanthan Gum (Overview). In: SALAMONE, J. C. Ed. **Concise Polymeric Materials Encyclopedia**, Boca Raton, 1999, p. 1652-1653.
- SCHWARTZ, R. D.; BODIE, E. A. Production of high-viscosity whey broth by a lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1485-1485, dec.1985.
- SILVA, J. A. L.; RAO, M. A. Role of rheological behavior in sensory assessment of fluid foods. In: **Rheology of Fluid and Semisolid Foods Principles and Applications**, RAO, M. A. (ed) Gaithenburng Aspen Publisher, 1999. 443p.
- SOUZA, A. da S. **Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv *pruni* cepas 24 e 58**. Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPEL, 1999. 19 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial).
- SOUW, P.; DEMAÏN, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1186-1192, 1979.
- STANKOWSKI, J.; MUELLER B.; ZELLER, S. Location of a second *O-acetyl* group in xanthan gum by the reductive-cleavage method. **Carbohydrate Research**, n. 241, p. 321-326, 1993.
- SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. Ed. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p. 363-388.
- TAIT, M. I.; SUTHERLAND, I. W.; CLARKE-STURMAN, A. J. Effect of growth condition on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. **Journal of General Microbiology**, v. 132, p. 1483-1492, 1986.
- VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização do biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo cultivado com cana-de-açúcar da região de Ribeirão Preto – São Paulo – Brasil**. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1995. 143 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos).