

Produção de Goma Xantana por Cepas Nativas de *Xanthomonas campestris* a Partir de Casca de Cacau ou Soro de Leite

Denis de M. Diniz, Janice I. Druzian, Samara Audibert

Departamento de Engenharia Química, UFBA

Resumo: Foi estudada a otimização do processo de produção de goma xantana a partir de casca de cacau ou soro de leite como fonte de carbono, e determinou-se o rendimento da goma obtida pela bioconversão de casca de cacau e soro de leite com a *Xanthomonas campestris* 1182. A goma foi produzida em meios com potássio e nitrogênio a 25 °C, 250 rpm por 120 horas. Os rendimentos foram: 2,335 g.L⁻¹ para a sacarose; 4,995 g.L⁻¹ para a casca de cacau seca e 12,01 g.L⁻¹ utilizando soro de leite. Portanto, é viável a produção de goma xantana utilizando fontes de carbono como a casca de cacau e o soro de leite.

Palavras-chave: Biopolímero, fontes alternativas, goma xantana.

Production of Xanthan Gum by *Xanthomonas campestris* Strains Native From Bark Cocoa or Whey

Abstract: The optimization of the production process of xanthan gum from cocoa husks or milk whey as carbon source was studied, and the production rate of gum obtained by the bioconversion of cocoa pods and whey was determined, using *Xanthomonas campestris* 1182. The gum was produced in a medium with potassium and nitrogen at 25 °C, 250 rpm for 120 hours. The results were: 2.335 g.L⁻¹ for sucrose; 4.995 g.L⁻¹ for cocoa dry pods and 12.01 g.L⁻¹ using whey. Therefore, the production of xanthan gum is feasible upon using carbon sources such as cocoa hulls and whey.

Keywords: Biopolymer, alternative sources, xanthan gum.

Introdução

Os principais biopolímeros encontrados no mercado são as gomas xantana e as dextranas. A primeira representa a maior parte do mercado, sendo aplicada como aditivos em alimentos (estabilizantes de suspensão líquidas e gelatinizantes) por não apresentar nenhum efeito nocivo à saúde humana^[1-3].

Os biopolímeros microbianos são produzidos por diversos gêneros de bactérias, fungos e leveduras^[4-6].

A goma xantana é um exopolissacarídeo natural e de grande importância para a indústria de polímeros, sendo descoberta em 1950 pelo Northern Regional Research Laboratories (NRRL) do United States Department of Agriculture. O Polímero B-1459, ou goma xantana, produzido pelas bactérias *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 foi muito estudado por causa das suas propriedades^[6]. É utilizada na indústria petrolífera, no entanto, só é viável como grau alimentício devido ao alto custo da fonte de carbono utilizada no meio fermentativo, tal como glicose ou sacarose, que representa 50% do custo final da goma.

Entre as técnicas mais promissoras, na recuperação avançada de petróleo, destaca-se a aplicação de polímeros. Estudos demonstram que a correta aplicação dos polímeros pode aumentar as atuais reservas em cerca de 50%. Paralelamente, com a injeção de polímeros, ocorre a redução da produção de água nos poços de petróleo, tendo como consequência a redução de custos de descarte de água com efeitos ambientais positivos^[7,8].

O biopolímero que a *Xanthomonas* produz pode ser obtido por fermentação em diferentes meios de cultura, com os mais variados rendimentos, massas molares e composição da goma, o que interfere diretamente na sua composição química e consequentemente nas propriedades reológicas.

As agroindústrias de processamento de cacau e de queijos produzem quantidades consideráveis de resíduos, que normalmente são descartados no meio ambiente, mas que podem ser utilizados como fonte de carbono no meio fermentativo.

A utilização de soro de leite para produção de goma xantana depende da bactéria de *Xanthomonas* apresentar enzima com atividade galactosidase para hidrolisar a lactose^[3].

Diversos pesquisadores usaram outros substratos alternativos para produzir goma xantana, tais como extrato de alfarroba^[9], água de lavagem de moinho de azeitona^[10], resíduos de citros^[11,12], ácido cítrico^[13] e soro de leite^[14,15]. Todos obtendo resultados favoráveis a utilização de fontes de carbono alternativas.

Selecionar fontes de carbono para *Xanthomonas*, para obter polissacarídeos em quantidade e com propriedades economicamente interessantes é um desafio que vem sendo enfrentado por vários grupos de pesquisa. Portanto, embora a tecnologia para produzir goma xantana está sedimentada a partir de sacarose como substrato, é necessário em paralelo estudar fontes de carbono alternativas que possam ser viáveis. Neste sentido, o objetivo deste trabalho é viabilizar a produção de goma xantana utilizando a casca de cacau e o soro de leite como fonte viável.

Materias

O álcool etílico utilizado na precipitação da goma foi grau comercial. A peptona bacteriológica e o extrato de malte foram obtidos, respectivamente, da Inlab e da Acumedia. Os demais componentes químicos (Agar Agar puro, D(+) Glucose Anidra P.A., D(+) Sacarose P.A., Extrato de levedura, D(+) Lactose P.A., K₂HPO₄ P.A., NH₄Cl, MgSO₄, (NH₄)₂HPO₄, Uréia e KH₂PO₄) foram comprados da Vetec.

Incubadora Tecnal TE 398/2; Estufa com circulação de ar Nova Ética, autoclave vertical Alpha, Mufla Lavoisier, Balança analítica Sartorius BL 210S, Shaeker Tecnal TE 424, e determinador de nitrogênio Tecnal TE 036/1, Banho de água Dubnoff Nova Ética, Espectrofotômetro Lambda 20 Perkin Elmer, além de acessórios em geral.

Cepas: Foram utilizadas: 1198 – *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae*; 1779 – *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*; 1182 – *Xanthomonas campestris* *manihotis*; 472 – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Todas as cepas foram doadas pelo Instituto Biológico de Campinas – SP.

Casca de cacau: A quantidade de 25 kg de resíduo foi coletada no beneficiamento de cacau de uma fazenda no sul da Bahia.

Soro de leite: A quantidade de 9 L foi coletada da produção de queijo realizada no laboratório de pescado (LAPESCA). Composição centesimal dos resíduos utilizados na fermentação por *Xanthomonas*. Os teores de umidade, proteína, cinzas e fibra foram determinados segundo metodologia da AOAC^[16]. O conteúdo de lipídios foi determinado pelo método de BLIGH & DYER^[17].

Metodologia

Cepas

As cepas de *Xanthomonas* usadas para produção de goma xantana foram mantidas em meio yeast manitol (YM) sólido Agar com repicagens periódicas semanais para a manutenção.

Preparação dos resíduos

A Casca de cacau *in natura* foi fatiada e seca em estufa a 110 °C por 12 horas, depois foi triturada em multiprocessador, em seguida as partículas de maior diâmetro foram retiradas com auxílio de peneira de tyler 42 com abertura de 355 μm . O pó resultante foi acondicionado em 50 recipientes de 500 g a -18 °C.

O soro de leite foi autoclavado (121 °C/15 minutos) e acondicionado em nove recipientes de 1 L à -18 °C.

O pó de casca de cacau e o soro de leite eram descongelados somente no momento do preparo dos meios para a fermentação.

Produção de goma xantana

As etapas de obtenção de goma xantana produzida seguem a seqüência do fluxograma abaixo, conforme Figura 1.

Repicagem das cepas

Foi utilizado o meio composto de: Extrato de malte, Extrato de Levedura, Peptona Bacteriológica, Glicose e Agar. Os reagentes foram dissolvidos em 100 mL de água destilada, (pH ajustado para 7,0), Agar, foi adicionado seguido de aquecimento até completa dissolução e desaparecimento da opacidade. O meio foi distribuído em tubos de ensaio, fechados com algodão, depois autoclavados por 121 °C/15 minutos. Os tubos foram inclinados em bancada até o equilíbrio com a temperatura ambiente local e solidificação do meio. A repicagem com *Xanthomonas campestris* foi realizada com alça de platina por raspagem, e mantido em estufa por 48 horas para crescimento da colônia.

Obtenção do tempo de inoculação

Para monitorar o crescimento das bactérias de *Xanthomonas campestris*, a produção de goma no meio e obtenção do ponto ótimo de inoculação, foram realizadas medidas de absorbância em espectrofotômetro UV λ (620 nm) ao longo do período de inoculação. Neste experimento foram preparados oito

erlenmeyers contendo o meio YM, segundo a metodologia adotada. O meio foi autoclavado, inoculado com as cepas e mantido em incubadora a 250 rpm, 28 °C por 100 horas. O fermentado n° 1 (tempo zero de fermentação) foi utilizado como branco e os seguintes foram lidos em intervalos de 12 horas consecutivas.

Inóculo

O meio YM (Meio I) foi dissolvido em 400 mL de água destilada, (pH ajustado 7,0). Transferiu-se 50 mL do meio YM para 08 erlenmeyers de 250 mL e autoclavados (121 °C/15 minutos). Depois deixados em repouso até equilíbrio com a temperatura ambiente local. Após o equilíbrio foi realizada a inoculação com células viáveis obtidas na repicagem. Em seguida foram fermentados em Shaker a 28 °C.250 rpm⁻¹/48 horas. O mesmo foi feito para os meios II e III. As composições dos meios encontram-se na Tabela 1.

Fermentação

No primeiro método de fermentação 08 erlenmeyers de 250 mL, contendo 80 mL de meio fermentativo composto por uréia, fosfato monobásico de potássio e sacarose como fonte de carbono, (pH ajustado para 7,0), receberam cada um 16 mL do inóculo. A fermentação foi realizada em Shaker a 28 °C.250 rpm⁻¹/120 horas.

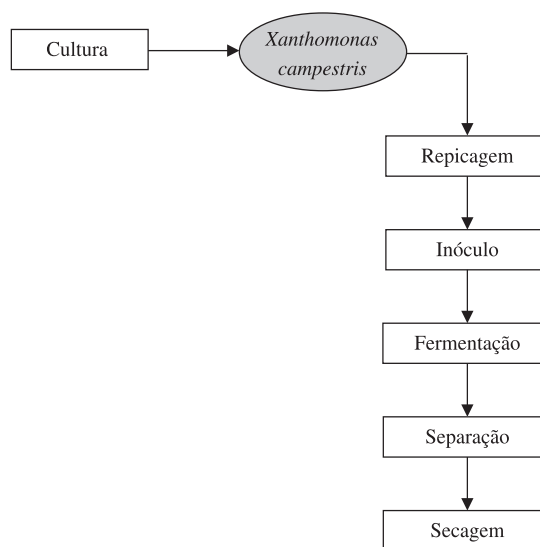


Figura 1. Fluxograma utilizado para obtenção de goma xantana a partir de sacarose, casca de cacau seca e soro de leite integral.

Tabela 1. Composição dos meios utilizados no inóculo.

	Meios		
	I	II	III
Extrato de levedura	0,3%	0,1%	0,15%
Malte	0,3%	-	0,15%
Peptona	0,5%	-	0,25%
Sacarose	1%	-	-
Glicose	-	-	1,2%
Lactose	-	1,5%	-
K ₂ HPO ₄	-	0,5%	0,25%
NaCl	-	0,1%	-
MgSO ₄	-	0,01%	-
NH ₄ Cl	-	0,2%	-
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	-	0,15%

No segundo método de fermentação o mesmo foi feito, mas nesta fermentação mudou-se a fonte de carbono, sendo utilizada a casca de cacau no lugar da sacarose, que foi deixada sob agitação no solvente (água) por 30 minutos com posterior filtragem para melhor obtenção da fonte de carbono.

O terceiro método de fermentação utilizou o soro de leite como solvente da uréia e do fosfato monobásico de potássio a sacarose foi retirada, pois o soro de leite também é a fonte de carbono.

Foi obtida a concentração ótima de fonte de carbono no meio fermentativo através de um estudo variando a concentração da fonte de carbono entre 1 a 11%.

Isolamento da goma xantana

As gomas obtidas dos três métodos de fermentações foram isoladas do meio de cultura por precipitação com etanol 96% na proporção, meio:álcool de 1:3 (v/v).

Secagem da goma xantana

Depois de separado o precipitado foi seco a 30 ± 2 °C e triturado para avaliação dos rendimentos (g de goma/ L de meio de fermentação) e estudo da viscosidade aparente das gomas. A massa de goma produzida foi avaliada gravimetricamente.

Resultados

As bactérias, 1198 – *Xanthomonas campestris* pv. *arracaciae*; 1779 – *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*; 1182 – *Xanthomonas campestris* *manihotis*; 472 – *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* foram inoculadas e fermentadas. Os rendimentos obtidos para a bioconversão em goma xantana pelas diferentes cepas de *Xanthomonas* são apresentados na Tabela 2:

De acordo com a Tabela 2, pode-se observar que todas as cepas formaram goma xantana na primeira produção, mas apenas quatro precipitaram em presença de álcool: duas com meio fermentativo padrão que utilizou sacarose (cepas 1182 e 1198) e duas com o meio fermentativo que utilizou o resíduo (cepas 1182 e 1198).

Na segunda produção observa-se que, apenas as cepas 1182 e 1779 formaram goma precipitável em álcool. As demais cepas não formaram goma. Na terceira produção houve precipitação apenas da goma formadas pelas cepas 1182 e 472.

Segundo Shu et al. (1990)^[18] e Xueming et al. (1991)^[19] o isolamento e a seleção de colônias de *Xanthomonas campestris* do habitat natural, assim como, a otimização das condições de fermentação são ferramentas importantes para melhorar a produção de goma xantana. A colônia microbiana, junto com outras condições de processo, isto é composição do meio de cultura, modo de agitação (oxigênio dissolvido), e o tempo de fermentação determinam a produtividade e a qualidade da goma.

A cepa 1182 foi selecionada por ter sido a que se apresentou mais produtiva dentre as quatro cepas testadas, a produção de goma xantana com esta cepa e casca de cacau seco alcançou maior repetibilidade nos valores do rendimento.

O período de crescimento microbiano máximo observado por Rottava (2005)^[20] através de medidas de absorbância no comprimento de onda igual a 560 nm foi de 16 a 40 horas para vários tipos de *Xanthomonas*. A Figura 2, espectrofotômetro no comprimento de onda igual a 640 nm, mostra a curva de crescimento celular da cepa 1182 acompanhada da produção de biomassa no meio inóculo, onde é observado um patamar máximo de absorvância no intervalo entre 40-70 horas, com a subsequente queda, devido ao consumo da fonte de carbono (sacarose) pelas bactérias. Pode-se observar que o ponto ótimo da fase log ocorre entre 40-70 horas de inoculação

a temperatura de 28 °C com agitação de 250 rpm, sendo adotado o período de inoculação de 48 horas.

O estudo feito, com sacarose, para obtenção da melhor concentração de fonte de carbono no meio fermentativo mostrou que a concentração ótima está em 1% o meio com 3% também formou, mas com rendimento menor. Os meios com 5, 7, 9 e 11% não formaram goma devido à alta pressão osmótica do meio que comprometeu a divisão celular.

Com a lactose foi obtido um rendimento de 3,72 g.L⁻¹, o estudo inicial com a lactose mostrou que a cepa 1182 é capaz de utilizar essa fonte de carbono para a produção de goma xantana.

Dois métodos de fermentação com o soro de leite foram realizados para a produção de goma. No primeiro teste o meio fermentativo foi produzido sem uréia. Constatou-se, que não houve formação de goma provavelmente devido à falta de uréia (ponte de nitrogênio), nutriente indispensável para a bactéria, apesar do soro apresentar de 2,61 a 2,66% de proteína bruta. Este nitrogênio orgânico provavelmente não foi disponibilizado às bactérias para a multiplicação celular, enquanto a forma inorgânica normalmente permite esta disponibilidade.

No segundo teste, com a adição de uréia no meio fermentativo obteve-se um grande rendimento, superando inclusive os valores obtidos com 2% sacarose e casca de cacau, nas mesmas condições fermentativas.

A Tabela 3 mostra os resultados obtidos a partir da otimização da produção de goma xantana com os resíduos (casca de cacau e soro de leite) e sacarose.

Tabela 2. Goma xantana obtida com diferentes cepas de *Xanthomonas*, com sacarose e casca de cacau seca, 28 °C, 250 rpm, 120 horas de fermentação.

Cepas	Meio Fermentativo	Produção / Rendimento			Média	Desvio padrão
		1º (g.L ⁻¹)	2º (g.L ⁻¹)	3º (g.L ⁻¹)		
1182	Sacarose	2,16	2,12	2,48	2,25	± 0,1600
	Resíduo de cacau	2,20	5,27	8,81	5,42	± 2,7011
472	Sacarose	+	1,78	+	1,78	-
	Resíduo de cacau	+	0,65	+	0,65	-
1198	Sacarose	0,64	-	+	0,64	-
	Resíduo de cacau	1,15	-	+	1,15	-
1779	Sacarose	+	-	1,40	1,40	-
	Resíduo de cacau	+	-	3,45	3,45	-

(+) = Houve formação de goma, mas não precipitou.

(-) = Não houve formação.

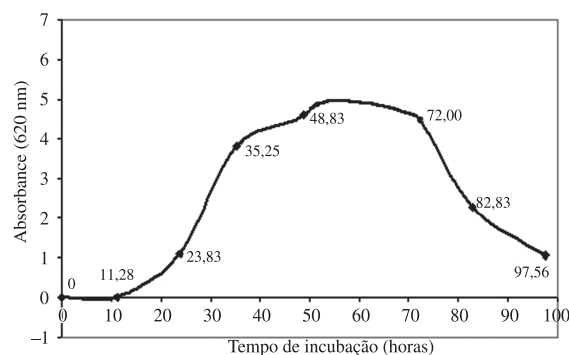


Figura 2. Curva de crescimento da biomassa do inóculo pela cepa 1182, 28 °C, 250 rpm a 620 nm.

Tabela 3. Produção de goma xantana obtida após a otimização dos processos e meios fermentativos. 28 °C, 250 rpm, 120 horas.

Cepas	Meio fermentativo	Produção média g.L ⁻¹	Desvio padrão
1182 – <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>manihotis</i>	Sacarose	2,42	±0,62
	Casca de cacau	7,34	±0,41
	Soro de leite	12,01	±0,65

Druzian & Pagliarini (2007)^[21] estudaram a produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã fuji com cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* em condições semelhantes as utilizadas no presente estudo. A fermentação a 28 °C.150 rpm⁻¹ produziu na condição otimizada, 45 g.L⁻¹ de meio, que representou um rendimento 10 vezes maior do que o obtido com sacarose. Rottava (2005)^[20] Estudando a mesma cepa com condições de agitação diferente e um meio fermentativo mais complexo obteve um rendimento de 7,97 g.L⁻¹ de goma xantana.

Nitschke & Rodrigues (2000)^[22] no seu estudo de virulência da *Xanthomonas campestris*, retiradas de diferentes vegetais, obtiveram uma produção de goma xantana entre 8,3 a 13,5 g.L⁻¹. Antunes et al. (2000)^[23] trabalhando com triagem em cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* obtiveram concentrações variáveis, sendo a mais eficiente de 26, 4 g.L⁻¹. Bastos et al. (2005)^[24] e Mayer et al. (2005)^[25] estudando a cepa *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatória* obtiveram nos dois trabalhos um rendimento de 5,85 g.L⁻¹ com alterações apenas na quantidade de piruvato e acetil.

Existem alguns estudos que testaram a utilização do soro de leite para a produção de goma xantana.^[3] Produziram goma a partir de soro de leite com *Xanthomonas campestris* C₇L atingindo uma produção média de 12,21 g.L⁻¹ com o soro hidrolisado, 14,7 g.L⁻¹ com o soro integral e 11,8 g.L⁻¹ com o soro filtrado. Fornari (2006)^[26] utilizou o soro de queijo mussarela para a produção de goma xantana e obteve um rendimento de 13,70 g.L⁻¹ e com soro de queijo prato obteve 7,81 g.L⁻¹. Valores próximos aos obtidos neste trabalho.

Conclusão

Das quatro linhagens estudadas, a melhor para produção de goma xantana foi a *Xanthomona campestre manihotis* - 1182, em termos de produção obtida com resíduos de agroindústria Baiana.

Constatou-se que é possível e viável produzir Goma Xantana utilizando a cepa 1182 e resíduos da agroindústria Baiana no meio fermentativo, do tipo casca de cacau seca e soro de leite.

Um melhor rendimento de produção de goma foi obtido com a cepa 1182 utilizando o meio fermentativo com soro de leite, obtendo-se uma produtividade 1,2 vezes maior do que com o meio com glicose, 1,6 vezes maior do que com resíduo de casca de cacau e 1,5 vezes maior do que com sacarose.

Vale salientar que as cepas de *Xanthomonas campestris* utilizadas nesse estudo são cepas nativas, isoladas de vegetais da região sudeste.

Referências Bibliográficas

- Villen, R. A. – Biotec. Hist. Tend. (2002).
- Moreira, A. S.; Souza, A. S. & Vendrusculo, C. T. – Rev. Bras. Agroc., 4 (1998).

- Nitschke, M.; Rodrigues, V. & Schinatto, L. F. – Cienc. Tecnol. Aliment., 21, p.82 (2001). <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612001000100018>
- Padilha, F. F. - “Produção de Biopolímeros sintetizados por microorganismos”, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil (2003).
- Crescenzi, V. – Biotechnol. Prog., 11, p.251 (1995). PMID:7619395. <http://dx.doi.org/10.1021/bp00033a002>
- Garcia-Ochoa, F.; Santos, V. E.; Casas, J. A. & Gomez, E. – Biotechnol. Adv., 18, p.1 (2000).
- Correia, D. Z.; França, F. P. & Mothe, C. G. – Conjunt. Inform, 31, p.1 (2006).
- Kimura, R. M. - “Indústria brasileira de petróleo: uma análise da cadeia de valor agregado”, Monografia do Graduação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil (2005).
- Roseiro, J. C.; Costa, D. C. & Collaco, M. T. A. – Food sci. Technol., 25, p.289 (1992).
- Lopez, M. J. & Ramos-cormenaza, A. – Int. Biodeterior. Biodegrad., 38, p.263 (1996).
- Green, M.; Shelef, G. & Bilanovic, D. – Chem. Eng. J., 56, p.37 (1994).
- Bilanovic, D.; Shelef, G. & Green, M. – Bioresour. Technol., 48, p.169 (1994). [http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90205-4](http://dx.doi.org/10.1016/0960-8524(94)90205-4)
- Jana, A. K. & Ghosh, P. – J. Ferm. Bioeng., 80, p.485 (1995). [http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)80924-X](http://dx.doi.org/10.1016/0922-338X(96)80924-X)
- Yang, S. T. & Silva, E. M. – J. Dairy Sci., 78, p.2541 (1995). [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76884-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76884-9)
- Konicek, J.; Lasik, J. & Safar, H. – Fol. Microbiol., 38, p.403 (1993).
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. - “Official Methods of Analysis oh the AOAC”, AOAC, v.16, p.1141 (1995).
- Bligh, E. G. & Dyer, W. J. – Can. J. Biochem. Physiol., 37, p.911 (1959). <http://dx.doi.org/10.1139/o59-099>
- Shu, C. H. & Yang, S. T. – Biotechnol. Bioeng., 35, p.454 (1990). PMID:18592538. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260350503>
- Xueming, Z.; Nienow, A.W.; Kent, C. A.; Chatwin, S. & Galindo, E. - “Improving xanthan fermentation performance by changing agitators” in: Proceedings of the 7^o European Conference on Mixing, p.277, Brugge, Sep (1991).
- Rottava, I. - “Seleção de linhagens de *Xanthomonas sp* para a produção de goma Xantana”, Dissertação de mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil (2005).
- Druzian, J. I. & Pagliarini, A. P. - Cienc. Tecnol. Aliment., 27, p.26 (2007). <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000100005>
- Nitschke, M. & Rodrigues, V. – Bras. J. Microbiol., 31, p.58 (2000). <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000100014>
- Antunes, A. E.; Moreira, A. S.; Vendrusculo, J. L. S. & Vendrusculo, T. C. – Ciên. Eng., 9, p.83 (2000).
- Bastos, C. P.; Mayer, L.; Monks, L.; Michels, R. A.; Vendrusculo, C. T. & Moura, A. B. – “Correlação entre produção, viscosidade e teor de acetil no biopolímero de 5 cepas de *Xanthomonas*”, in: Anais do 14^o Congresso de iniciação científica, Pelotas, (2005).
- Mayer, L.; Bastos, C. P.; Monks, L.; Michels, R. A.; Vendrusculo, C. T. & Moura, A. B. – “Correlação entre produção, viscosidade e teor de piruvato no biopolímero de 5 cepas de *Xanthomonas*.” in: Anais do 14^o Congresso de iniciação científica, Pelotas, (2005).
- Fornari, R. C. G. - “Aproveitamento de soro de queijo para a produção de goma xantana”, Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil (2006).

Enviado: 03/11/10
Reenviado: 22/08/11
Aceito: 04/09/11