

FORMULAÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO À BASE DE SORO DE LEITE PARA A PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA POR *X. campestris* C₇L¹

Marcia NITSCHKE^{2*}, Vanessa RODRIGUES³,

Lisiane Fiorio SCHINATTO⁴

RESUMO

A goma xantana é um polissacarídeo microbiano de grande significado comercial especialmente para a indústria de alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de xantana em diferentes meios de cultura à base de soro de leite utilizando o isolado *Xanthomonas campestris* C₇L. Dentre as formulações testadas o meio de soro de leite integral produziu maior viscosidade e concentração final de xantana. Um sistema combinando soro integral (0,35% de proteína) e soro filtrado (0,18% de proteína) foi proposto. Na primeira fase em soro integral a produção de xantana foi de 13g/L e 45% de rendimento, enquanto que na segunda fase utilizando-se soro filtrado obteve-se um total de 28g/L de xantana e 75% de rendimento. O rendimento geral do processo foi de 55% e a viscosidade final do meio atingiu 18000cP. As soluções de xantana produzidas em soro de leite apresentaram comportamento pseudoplástico e tixotrópico característicos deste tipo de polímero. O isolado C₇L demonstrou capacidade de produzir gomas de alta viscosidade e qualidade em soro de leite, constituindo uma alternativa promissora para a produção industrial de goma xantana a partir deste subproduto.

Palavras-chave: xantana; soro de leite; *Xanthomonas campestris*

SUMMARY

FORMULATION OF WHEY-BASED MEDIA FOR XANTHAN GUM PRODUCTION BY *X. campestris* C₇L ISOLATE. Xanthan gum is a microbial polysaccharide of great commercial interest, especially in the food industry. The aim of this work was the evaluation of xanthan gum production from different whey - based media by a lactose utilizing *Xanthomonas campestris* C₇L isolate. Three whey media formulations were tested: unfiltered whey, filtered whey and hydrolyzed whey. The medium composed of unfiltered whey showed the highest viscosities and xanthan concentrations. A two stage fermentation strategy, combining unfiltered whey (0,35% protein) and filtered whey (0,18% protein), was proposed. The first stage, using unfiltered whey medium, showed a xanthan production of 12g/L and a 45% yield. The second stage, with filtered whey addition, gave final xanthan concentration of 28g/L and a 75% yield. The overall yield was 55% and final broth viscosity reached 18000cP. The polymer produced in this combining system showed typical pseudoplastic and thixotropic behavior. The *X. campestris* C₇L isolate produced high viscosity broths and high quality gums when using whey as substrate and constitutes a promising option for the industrial production of xanthan gum from whey.

Keywords: xanthan; whey; *Xanthomonas campestris*

¹ Recebido para publicação em 12/09/00. Aceito para publicação em 06/03/01.

² UNICAMP-FEA - Departamento de Ciência de Alimentos- Laboratório de Bioquímica. Cx Postal 6121 CEP 13083-970 Campinas - SP

³ Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA) - UPF - Passo Fundo, RS

⁴ Estudante do Curso de Farmácia - UPF- RS

* A quem a correspondência deve ser enviada.

1 – INTRODUÇÃO

A goma xantana é um polissacarídeo microbiano produzido por linhagens de *Xanthomonas campestris*. Pelo fato de possuir propriedades reológicas únicas, a xantana vem sendo amplamente utilizada como agente suspensivo, espessante, emulsionante e estabilizante principalmente na indústria de alimentos [9,20]. A xantana também encontra aplicação em uma grande variedade de processos industriais, sendo aplicada em grande escala na recuperação secundária e terciária do petróleo [3].

Devido ao mercado crescente, muitos estudos têm sido conduzidos objetivando o melhoramento das linhagens, dos meios de cultivo e dos processos de extração e purificação de goma xantana. A maior parte da literatura referente à produção de xantana cita o uso de glicose e sacarose como fontes de carbono preferenciais [11,17], entretanto algumas fontes alternativas têm sido sugeridas [1,24], visando principalmente o aproveitamento de resíduos industriais e diminuição nos custos de produção. O soro de leite, resultante da fabricação de queijos, vem sendo estudado como alternativa [15,16,18,21]. A produção diária de soro de leite atinge quantidades muito elevadas e seu descarte representa um sério problema ambiental [21], entretanto possui alto teor de lactose além de proteínas, e sais minerais constituindo um meio de cultura rico e de fácil obtenção. O principal problema encontrado na produção de xantana em soro de leite é a baixa capacidade de utilização de lactose por *X. campestris*, fato este que se deve à baixa afinidade da β-galactosidase da bactéria por lactose [6]. A utilização de linhagens geneticamente modificadas também foi proposta [8,13,23] porém, as culturas demonstraram pouca estabilidade e gomas de qualidade inferior. Em estudo anterior foi relatada a seleção de isolados selvagens de *X. campestris* com capacidade para a produção de xantana a partir de lactose [12]. O presente trabalho teve por objetivo estudar diferentes formulações de meios de cultura à base de soro de leite, visando a utilização deste subproduto, para a produção de xantana pelo isolado *X. campestris* C₇L.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Microrganismo

Utilizou-se o isolado *Xanthomonas campestris* C₇L obtido em trabalho anterior [12].

2.2 – Meios de cultura

Para a manutenção do isolado utilizou-se meio mínimo de lactose contendo 1,5% lactose, 0,5% K_2HPO_4 , 0,2% NH_4Cl , 0,1% $NaCl$, 0,01% $MgSO_4$ e 0,1% extrato de levedura (pH 7,0-7,2). O soro em pó foi cedido gentilmente pela ELEGE Alimentos LTDA (Porto Alegre, RS), tendo na sua composição 1,0% gordura, 76,81% lactose, 12,03% proteína, 8,67% sais minerais e 0,065% ácido láctico.

Meio de soro de leite integral: solução aquosa a 4% (p/v) de soro de leite em pó, $MgSO_4$ 0,01% e K_2HPO_4 0,5% (pH 7,2). Após a autoclavagem o meio de soro apresentou um aspecto bastante turvo permanecendo com as proteínas insolúveis.

Meio de soro filtrado : foi preparado meio de soro integral que após a esterilização em autoclave foi filtrado assepticamente, obtendo-se um meio de aspecto límpido (proteínas precipitadas durante autoclavagem foram eliminadas).

Meio de soro de leite hidrolisado : preparou-se soro integral adicionando-se b-galactosidade (Lactozim 3000L HP-G, Novo Nordisk) nas condições especificadas pelo fabricante.

2.3 – Inóculo e condições de cultivo

O inóculo foi preparado a partir de um tubo de ágar inclinado em meio lac-min [16]. Uma alça contendo cultura de 24 horas foi inoculada em tubo de ensaio contendo 5mL de caldo lac-min e incubado em agitador rotatório por 24 horas a 160rpm e 28°C num ângulo de inclinação de aproximadamente 30°. A cultura resultante (10mL) foi transferida para erlenmeyer de 500mL contendo 90mL do respectivo meio de soro e incubada novamente por 72 horas à 200rpm e 28°C.

2.4 – Sistema alimentado

O ensaio combinando dois tipos de meio (soro integral e soro filtrado) foi conduzido em fermentador de 16L (New Brunswick SF-116) contendo inicialmente 6L de meio de soro integral. O inóculo foi preparado como anteriormente e adicionado na proporção de 10%(v/v) do volume total de meio. A temperatura foi mantida em 30°C, aeração 1vvm, pH controlado automaticamente para 7,0 e a velocidade de agitação foi programada para manter o oxigênio dissolvido (DO) > 50%. Quando a concentração de lactose no meio atingiu aproximadamente 3g/L adicionou-se assepticamente 1L de soro de leite filtrado preparado na concentração de 20% (p/v).

2.5 – Determinações analíticas

A concentração de lactose e açúcares reductores totais (ART) foram determinadas pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). A glicose foi determinada por método enzimático (Glicose oxidase- Ecoline 250- Merck). O teor de galactose foi determinado enzimaticamente (lactose/D-galactose -Boehringer Mannheim). Proteína por nitrogênio total (Kjeldahl).

Para a determinação de xantana uma alíquota do meio foi diluída em água destilada (10x) e centrifugada (13000 x g). O sobrenadante foi adicionado de 1% de KCl agitado em agitador magnético por 15 minutos e adicionado de três volumes de álcool etílico 96° para a precipitação da goma. O produto obtido foi filtrado à vácuo, seco em estufa 55°C por 12 horas e colocado em dessecador à temperatura ambiente até peso constante. A viscosidade dos meios de cultivo foi determinada em viscosímetro Brookfield tipo Cone/Plate spindle CP-52, 0.6 rpm à 25°C. Para estudo de reologia procedeu-se a purificação da xantana: a goma foi redissolvida a 1% em água destilada, novamente centrifugada (13000xg). O sobrenadante foi filtrado em membrana tipo Millipore (0,45mm) e adicionado de 3 volumes de álcool etílico 96°. O precipitado foi submetido à secagem em estufa (55°C) e moagem e mantido em dessecador. Preparou-se uma solução aquosa a 1% da goma purificada adicionada de 0,1% de KCl. As viscosidades foram medidas a 25°C em viscosímetro Brookfield LVTDV-II usando spindle número 3, sob diferentes taxas de cisalhamento. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na *Tabela 1* são mostrados os resultados da produção de xantana pelo isolado C_7L em 3 tipos diferentes de formulações à base de soro de leite. Observa-se que o meio de soro integral apresentou maior viscosidade final em relação aos outros meios testados. Este fato sugere que a goma produzida em soro integral apresenta maior qualidade ou seja, maior viscosidade gerada por unidade de polímero produzido, enquanto que em meio de soro filtrado a xantana produzida possui qualidade inferior ou seja, menor viscosidade gerada por unidade de polímero produzido.

TABELA 1. Comparação dos resultados obtidos em diferentes meios de soro de leite.

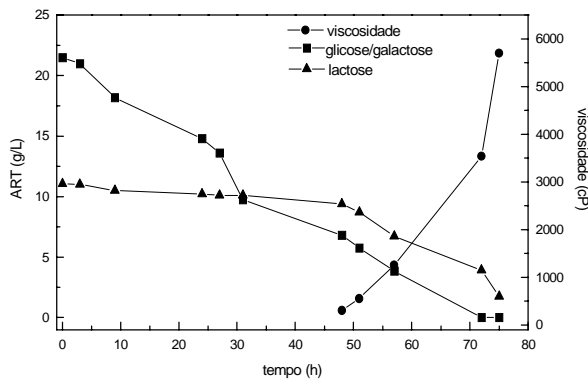
Tipo de soro	Xantana (g/Kg)	Viscosidade final (cP)	Rendimento (%)*
Hidrolisado	12,21	6162	43
Integral	14,7	9506	55
Filtrado	11,8	2030	51

* xantana produzida /açúcar consumido x 100

No soro hidrolisado observou-se uma preferência pelo uso de glicose e galactose em relação à lactose presente no meio, entretanto este fato não se refletiu em maior produção de xantana. Cabe ressaltar, que o microrganismo utilizou glicose e galactose concomitantemente, não exibindo preferência por um desses açúcares. A lactose residual foi consumida mais lentamente e preferentemente na fase de acúmulo de polímero (*Figura 1*). SCHWARTZ e BODIE [16] utilizando um isolado adaptado à lactose, verificaram que, quando a glicose foi adicionada a um meio contendo soro de leite, a lactose deixava de ser utilizada. O isolado C_7L não demonstrou preferência estrita por glicose (e ou galactose), ou seja, utilizou a lactose mesmo na presença dos monossacarídeos, principalmente a partir de 48 horas de cultivo, quando se inicia a produção de

xantana, indicando a adaptação deste microrganismo à utilização de lactose para a produção do polissacarídeo.

FIGURA 1. Perfil de consumo de açúcares em soro de leite hidrolisado por *X. campestris* C₇L



A relação C/N no meio de cultura influencia grandemente a produção de xantana. Segundo Sutherland [19], uma elevada concentração de nitrogênio é necessária para um rápido crescimento celular entretanto, quando a concentração de nitrogênio no meio de cultura for muito elevada, a xantana produzida possui propriedades reológicas inadequadas [2].

Meios contendo elevado teor de fonte de carbono e baixo teor de nitrogênio favorece o acúmulo de polímero [4]. Em geral os processos industriais procuram utilizar meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento como para o acúmulo de goma [22]. De VUYST, VAN-LOO, VANDAMME [5] verificaram que a xantana é produzida como metabólito secundário e propuseram a dissociação do processo em duas fases distintas: a fase de crescimento, onde maior concentração de nitrogênio é requerida para o crescimento celular e a fase de produção, onde maior concentração de carbono é necessária, visando o acúmulo de produto [10]. Baseado nesses fatos, propôs-se um sistema combinado em duas etapas utilizando soro integral (0,35% proteína) na primeira etapa e soro filtrado (0,18% proteína) na segunda etapa.

A Figura 2 mostra os resultados da produção de xantana no sistema combinado.

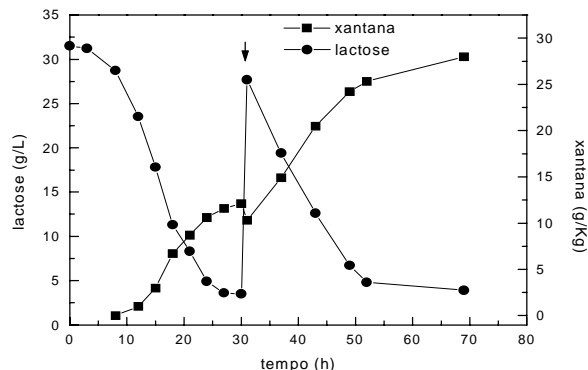


FIGURA 2. Produção de xantana combinando soro de leite integral e filtrado.

Na primeira etapa obteve-se 13g/Kg de xantana e um rendimento de 45%. Após 30 horas de processo a adição de soro filtrado produziu 28g/Kg de xantana e um rendimento de 75%. Depois de 70 horas o rendimento total atingiu 55% e a viscosidade final do meio foi de 18000cP. No início do processo, o uso do soro integral favoreceu o crescimento celular, enquanto que na segunda fase, a adição de soro filtrado contendo menor concentração de proteínas favoreceu o acúmulo do produto. De fato, a relação C/N do meio parece ser o fator mais importante na produção de xantana , uma vez que a adição de soro integral na segunda etapa também mostrou concentrações de xantana e rendimento semelhante aos encontrados na primeira etapa. Por outro lado, a utilização de soro filtrado na primeira etapa mostrou produções de gomas de baixa viscosidade (Tabela 1).

Para a caracterização reológica da goma xantana produzida em soro de leite, verificou-se a influência da taxa de cisalhamento na viscosidade do polímero (Figura 3). Observa-se um comportamento pseudoplástico ou seja, diminuição da viscosidade à medida que aumenta a taxa de cisalhamento. Este comportamento é típico de soluções de xantana. Observa-se leve comportamento tixotrópico, que também foi relatado por SANDFORD *et al* [14] que relacionaram o comportamento tixotrópico com o conteúdo de piruvato presente na xantana. Gomas com elevado teor de piruvato exibiram leve comportamento tixotrópico, enquanto gomas com baixo teor de piruvato, não demonstraram esse comportamento. Sabe-se, que o conteúdo de piruvato é um indicativo da qualidade da goma xantana [7] portanto, os resultados obtidos sugerem que a goma xantana produzida em soro de leite possui características reológicas adequadas a um produto de boa qualidade. Entretanto, futuros testes devem ser conduzidos visando a melhor caracterização química e reológica da xantana produzida pelo isolado C₇L em soro de leite.

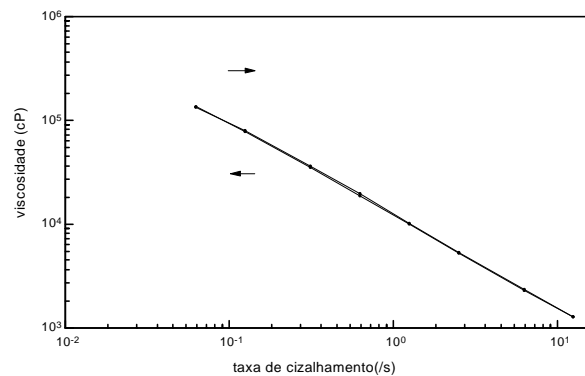


FIGURA 3. Reograma de soluções à 1% de xantana produzida em soro de leite

4 – CONCLUSÕES

- O meio de cultura à base de soro de leite integral demonstrou os melhores resultados dentre os meios testados.

- Em soro de leite hidrolisado, a partir de 48 horas de cultivo, o isolado C₇L demonstrou capacidade de utilização de lactose independente da presença de glicose e galactose.
- A estratégia de combinar meio à base de soro de leite integral e filtrado aumentou o rendimento e a concentração final de xantana.
- A xantana produzida em meios de soro de leite exibiu comportamento pseudoplástico e tixotrópico característicos.
- o isolado *Xanthomonas campestris* C₇L possui capacidade para utilização do soro de leite como substrato constituindo uma alternativa promissora para a produção de goma xantana a partir deste resíduo.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BILANOVIC, D.; SHELEF, G.; GREEN, M. Xanthan fermentation of citrus waste. **Bioresource Technology**, v.48, n.2, p.169-172, 1994.
- [2] CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCIA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.2-4, p.282-291, 2000.
- [3] COTTRELL, I.W.; KANG, K. S. Xanthan gum, a unique bacterial polysaccharide for food applications. **Developments in Industrial Microbiology**, v.19, p.117-131, 1978.
- [4] DAVIDSON, I.W. Production of polysaccharide by *X. campestris* in continuous culture. **FEMS Microbiological Letters**, v.3, n.6, p.347-349, 1978.
- [5] DE VUYST, L.; VAN-LOO, J.; VANDAMME, E.J. Two-step fermentation process for improving xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1549. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.39, n.4, p.263-273, 1987.
- [6] FRANK, J.F.; SOMKUTI, G. A. General properties of beta-galactosidase of *Xanthomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.38, n.3, p.554-556, 1979.
- [7] FLORES CANDIA, J.L.; DECKWER, W.D. Effect of the nitrogen source on pyruvate content and rheological properties of xanthan. **Biotechnology Progress**, v.15, n.3, p.446-452, 1999.
- [8] FU, J.F.; TSENG, Y.H. Construction of a lactose -utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.4, p.919-923, 1990.
- [9] KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, p.81-84, 1998.
- [10] LO, Y.M.; YANG, S.T.; MIN, D.B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell with in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.47, n.6, p.689-694, 1997.
- [11] MARGARITIS, A.; PACE, G.W. Microbial polysaccharides. In: MOO-YOUNG, M.(Ed) **Comprehensive Biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1985, p.1006-1041.
- [12] NITSCHKE, M.; THOMAS, R.W.S.P.; KNAUSS, C. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in a whey -based medium. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 148-151, 1997.
- [13] 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, 1994.
- [14] SANDFORD, P.A.; PITTSLEY, J.E.; KNUTSON, C.A.; WATSON, P.R.; JEANES, A. Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459: characterization of xanthan products of differing pyruvic acid content. In: SANDFORD, P.A.; LASKIN, A. (Eds). **Extracellular Microbial Polysaccharides**. Washington: American Chemical Society, 1977, p.192-210.
- [15] SCHWARTZ, R.D.; BODIE, E.A. Production of high-viscosity whey broths by a lactose-utilizing *Xanthomonas campestris* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, n.6, p.1483-1485, 1985.
- [16] SCHWARTZ, R.D.; BODIE, E.A. Production of high-viscosity whey- glucose broths by a *Xanthomonas campestris* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, n.1, p.203-205, 1986.
- [17] SOUW, P.; DEMAINE, A. L. Nutritional studies on xanthan production by *X. campestris* NRRL B-1459. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, n.6, p.1186-1192, 1979.
- [18] STAUFFER, K.R.; LEEDER, J.G. Extracellular microbial polysaccharide production by fermentation on whey or hydrolyzed whey. **Journal of Food Science**, v.43, n. 3, p. 756-758, 1978.
- [19] SUTHERLAND, I.W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, v.23, p.79-149, 1982.
- [20] SYMES, K.C. The relation between the covalent structure of the *Xanthomonas* polysaccharide (xanthan) and its function as a thickening, suspending and gelling agent. **Food Chemistry**, v.6, n.1, p.63-76, 1980.
- [21] THORNE, L.; TANSEY, L.; POLLOCK, T.J. Direct utilization of lactose in clarified cheese whey for xanthan gum synthesis by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, n.5, p.321-328, 1988.
- [22] VASHITZ, O; SHEINTUCH, M. Analysis of polymer synthesis rates during steady-state growth of *X. campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.37, n.4, p.383-385, 1991.
- [23] WALSH, P.M.; HAAS, M. J.; SOMKUTI, G. A. Genetic construction of lactose-utilizing *Xanthomonas campestris*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, n.2, p. 253-257, 1984.
- [24] YOO, S.D.; HARCUM, S.W. Xanthan gum production from waste sugar beet pulp. **Bioresource Technology**, v.70, n.1, p.105-109, 1999.