

**PRODUÇÃO, PROPRIEDADES REOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA
XANTANA PRODUZIDA POR *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***

**PRODUCTION, RHEOLOGICAL PROPERTIES AND CHEMICAL COMPOSITION OF
XANTHAN PRODUCED BY *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***

Lauri Mayer¹; Claire Tondo Vendruscolo¹; Wladimir Padilha da Silva¹; Andrea Bittencourt Moura¹

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil

laurimayer@gmail.com

Resumo

Goma xantana é um heteropolissacarídeo bacteriano sintetizado por várias espécies do gênero Xanthomonas. Devido principalmente às suas excelentes propriedades reológicas, encontra diversas aplicações na indústria alimentícia, petrolífera, cosmética e em produtos farmacêuticos. Este trabalho objetivou a produção, a análise da viscosidade, do comportamento reológico e a composição química da goma xantana produzida por sete cepas de Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli. A produção de xantana variou de zero à 5,7g.L⁻¹. A xantana produzida por todas as cepas apresentou comportamento pseudoplástico e não houve diferença significativa da viscosidade aparente entre as xantanas. A viscosidade aparente a 3% (m/v) medida na taxa de deformação 10s⁻¹ variou de 3.400 a 3.800mPa.s, ficando abaixo da viscosidade da xantana comercial (13.900mPa.s), produzida por X. campestris pv. campestris. Todas as amostras de xantana apresentaram na sua composição os monossacarídeos glicose, manose, ácido glicurônico e diferentes quantidades de ramnose, que não é encontrada na xantana comercial.

Palavras-chave: *Xanthomonas axonopodis*; xantana; viscosidade; composição química.

1. Introdução

A goma xantana é produzida por bactérias do gênero *Xanthomonas*, e é largamente empregada na indústria alimentícia como espessante, geleificante, estabilizante, agentes suspensivos e auxiliar de emulsificação. Em cosméticos e produtos farmacêuticos em geral, é utilizada principalmente como espessante e estabilizante (Jeanes, 1974; Cadmus, 1978; Vendruscolo, 2000; Moreira, 2001; Borges, 2004; Mayer, 2006; Pradella, 2006). Na indústria petrolífera é empregada

como fluido de perfuração de poços e na recuperação terciária do petróleo (Bridges e Kalinski, 1991; Rosalam & England, 2006).

Economicamente, a xantana é o polissacarídeo microbiano mais importante, com uma produção mundial de cerca de 40 a 50 mil t/ano, movimentando aproximadamente 270 milhões de dólares anualmente, e o crescimento da demanda está estimado a uma taxa contínua de 5 a 10% ao ano (Pradella, 2006). Segundo Rosalam & England (2006), as maiores vantagens da xantana frente a outras gomas são: (1) alta viscosidade em baixas concentrações; (2) estabilidade em amplas faixas de pH (2 – 11), em altas concentrações de eletrólitos (150g.L^{-1} NaCl) e em temperaturas acima de 90°C ; (3) grande escala de produção em curto espaço de tempo por processo fermentativo e (4) suas propriedades pseudoplásticas.

Este biopolímero é um exopolissacarídeo hidrossolúvel com massa molecular aproximada de 2.10^6Da , mas podendo chegar a $13 - 50.10^6\text{Da}$ (Rosalam & England, 2006). Sua estrutura química é formada por repetidas unidades pentassacarídicas, compostas por duas moléculas de *D*-glicose, duas moléculas de *D*-manose e uma molécula de ácido *D*-glicurônico. Ligados à manose encontram-se ainda proporções variáveis dos radicais *O*-acetil e piruvato. Em *X. arboricola* pv. *pruni* e *X. arboricola* pv. *juglandis* foi identificado um quarto açúcar, a *L*-ramnose, que não é encontrada na xantana comercial produzida por *X. campestris* pv. *campestris* (Lowson e Symes, 1977; Souza, 1999; Antunes et al., 2000; Vendruscolo et al, 2000).

Quando é adicionada a soluções aquosas, mesmo que em pequenas quantidades, a xantana aumenta drasticamente a viscosidade do meio. A adição de 3% é capaz de elevar a viscosidade da água, que é de $1,003.10^{-3}\text{ Pa.s}$ (a 20°C), para mais de 10^4Pa.s (medida na taxa de deformação 10s^{-1}) (Mayer, 2006). Essas soluções, ao contrário da água, possuem ainda comportamento pseudoplástico, diminuindo sua viscosidade aparente quando a taxa de deformação é aumentada.

A busca de cepas que produzam xantana com alta viscosidade tem sido o objetivo daqueles que querem suprir as indústrias alimentícias, onde quanto menor o percentual utilizado para atingir a textura, viscosidade ou estabilidade desejada, menor será a interferência na cor do produto final, da mesma forma os que buscam as especificações para área de exploração de petróleo desejam obter xantanas com alta viscosidade, pois desta forma utilizando quantidades reduzidas como 0,48% ou menos estes volumes interferem muito pouco no volume final dos fluidos de perfuração. Porém, em algumas aplicações específicas, como por exemplo, na retenção de aromas e em agentes suspensivos, a alta viscosidade não é desejada, buscando-se, para estes casos, cepas que produzam xantana com baixa viscosidade, (Weisrock, 1983; Bridges e Kalinski, 1991) ou ainda cepas mutantes com essas características (Salome, 1996)

A distribuição geográfica de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* inclui todos os continentes, e seu principal hospedeiro é o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*), onde causa o

crestamento bacteriano comum, mas outras espécies de leguminosas também são naturalmente infectadas: *P. lunatus*, *Vigna aconitifolia* e *V. radiata*. *Lablab purpureus* e *Mucuna deeringiana* são considerados possíveis hospedeiros naturais. *P. coccineus*, *P. acutifolius* e *Lupinus polyphyllus* são hospedeiros apenas quando artificialmente inoculados. (EPPO, 2006).

Em 1995, o patovar *phaseoli*, que pertencia à espécie *X. campestris*, foi inserido na espécie *X. axonopodis* (Vauterin et al., 1995). Entretanto, o nome *X. campestris* pv. *phaseoli* ainda é utilizado. De uma maneira geral, a taxionomia do gênero *Xanthomonas* tem sido extensivamente revisada com base na homologia do DNA, gerando muitas vezes, confusões de nomenclatura.

Como em estudos preliminares cepas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* mostraram capacidade de produzir xantana, o objetivo deste trabalho foi avaliar sete cepas de diferentes regiões quanto a produção e caracterização destes biopolímeros produzidos.

2. Material e Métodos

2.1. Cepas

Sete cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isoladas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) foram utilizadas na pesquisa (Tab. 1).

Tabela 1. Locais de isolamento das cepas utilizadas.

Cepa	Local de isolamento
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> cepa UFLA 2	Lavras/MG
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> cepa 12	Pelotas/RS
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> cepa 14	Pelotas/RS
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> cepa 16	Pelotas/RS
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> cepa 29	Bandeirantes/MS
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> cepa 32	Unaí/MG
<i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> cepa 48	Irai de Minas/MG

2.2. Produção da goma xantana

O pré-inóculo foi preparado em meio YM (Yeast Malt), segundo Borges (2004). Após 24h, a massa celular obtida (2.10^8 a 8.10^9 UFC.mL⁻¹) foi transferida para um erlenmeyer de 250mL contendo 45mL de meio de cultura MPII (Cadmus et al., 1978) e incubada em agitador orbital a 28°C e 200rpm. Após 72h, o caldo fermentado foi centrifugado a 12.000g e 4°C por 30min e a xantana precipitada pela adição de etanol comercial 96% [1:4 (v/v)]. Os biopolímeros foram secos a 55°C até peso constante, e a produção calculada em g.L⁻¹ de meio total. A produção de cada cepa foi realizada em quadruplicata.

2.3. Propriedades reológicas

O biopolímero seco foi triturado em graal e preparada uma solução aquosa a 3% (m/v), segundo Diaz (2002). O comportamento reológico foi analisado em reômetro rotativo Haake RS150 a 25°C, utilizando-se sensor placa-cone PP35Ti, e aplicando-se uma taxa de deformação de 0,01 a 100s⁻¹, por um período de 300s. Cada curva de viscosidade foi calculada a partir de três repetições.

2.4. Composição química

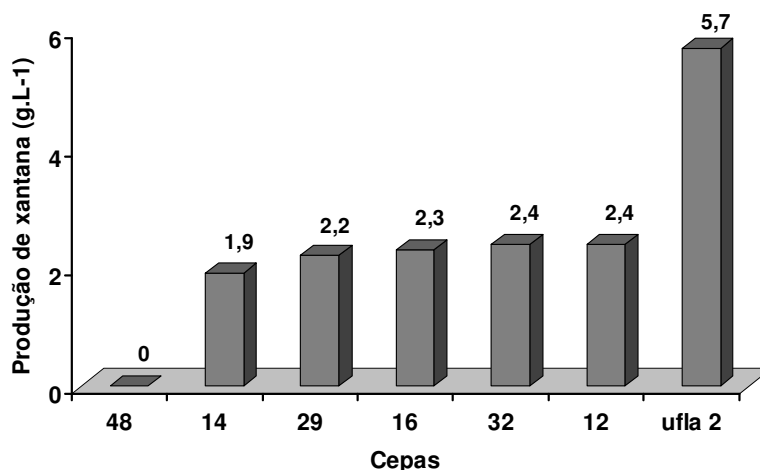
A determinação dos monossacarídeos presentes na xantana foi realizada através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), segundo Moreira et al. (1999). Os biopolímeros foram hidrolisados com HCl 2N [3:100 (m/v)] a 80°C por 16 horas. Realizou-se a cromatografia em sílica gel 60 F254 (Merck), com o seguinte eluente: clorofórmio:metanol:ácido acético:água, na proporção de 40:40:10:10 (v/v/v/v). Na revelação, utilizou-se anilzaldeído sulfúrico e aquecimento com pistola até 200°C, até o aparecimento das bandas. A determinação dos constituintes foi feita comparando-os com os padrões autênticos de glicose, manose, ácido glicurônico e ramnose. Para confirmar os resultados, a análise foi realizada em triplicata.

3. Resultados e Discussão

3.1. Produção da goma xantana

A produção de xantana no meio MPIO após 72h de fermentação variou de zero à 5,7g.L⁻¹ (Fig. 1). A cepa 48 não produziu xantana. A produção das demais cepas (14, 29, 16, 32 e 12) foi baixa, variando de 1,9 a 2,4g.L⁻¹. Entretanto, a cepa UFLA 2 teve um rendimento superior às demais, com 5,7g.L⁻¹, ficando na faixa de produção de várias outras cepas de *Xanthomonas* nas mesmas condições de fermentação (Moreira, 2001; Borges, 2004, Borowski et al., 2006).

Figura 1. Produção de xantana (g.L⁻¹) por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* após 72h de fermentação.

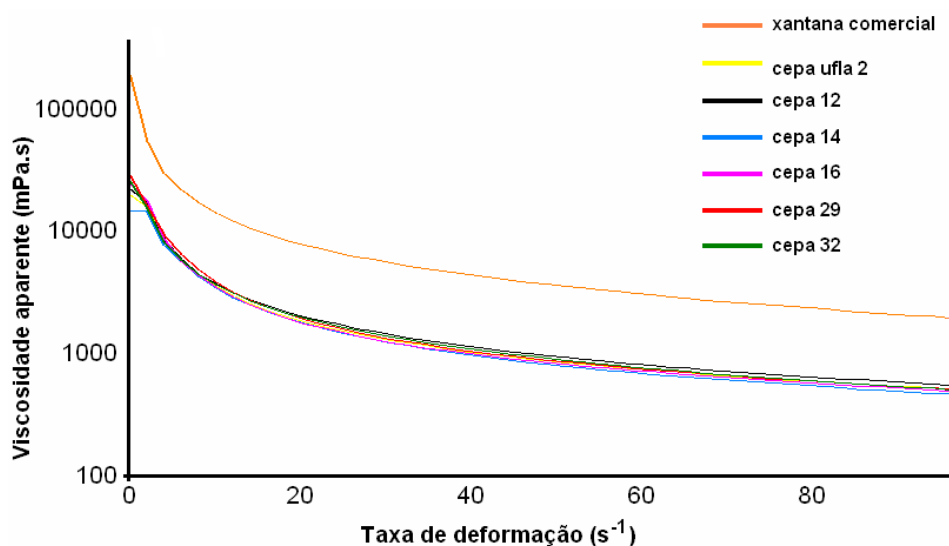


Vários são os parâmetros de produção que interferem na quantidade e qualidade (incluindo viscosidade) da xantana produzida, entre eles, o meio de produção, condições operacionais como agitação e aeração, temperatura, entre outros. Em um trabalho com o patovar *pruni* envolvendo vários meios de cultura, Borowski et al. (2006) demonstraram que cada cepa comporta-se de maneira diferente frente à variação do meio, e que é possível aumentar a produção de xantana e sua viscosidade mudando o meio de cultura. Borges (2008) também observou um aumento significativo na produção de xantana por uma cepa de *X. arboricola* pv. *pruni* variando os parâmetros pH e taxa de aeração. Portanto, o rendimento da xantana produzida por cepas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ainda poderá ser consideravelmente aumentado testando-se principalmente, diferentes meios de cultura, pH e taxa de aeração.

3.2 Análises reológicas

A viscosidade aparente de todas as soluções aquosas de xantana apresentou valores muito próximos entre si a partir da taxas de deformação $4,6s^{-1}$ (Fig. 2), não havendo diferença significativa ($p>0,05$) de viscosidade aparente entre as amostras nesta faixa. A figura 2 mostra ainda que a pseudoplasticidade da xantana produzida neste experimento é equivalente à xantana comercial. Porém em relação à viscosidade os resultados entre a xantana comercial produzida por *X. campestris* pv. *campestris* e a xantana produzida por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* são distintas. Na taxa de deformação $10s^{-1}$, a viscosidade variou de 3.400 a 3.800mPa.s, ficando abaixo da xantana comercial (13.900mPa.s) e também abaixo da xantana de cepas do patovar *pruni* (6.120 a 12.700mPa.s) produzida nas mesmas condições por Borges (2004). As xantanas produzidas por estas cepas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* são, portanto, de baixa viscosidade.

Figura 2. Curvas de viscosidade aparente a 25°C de solução aquosa 3% (m/v) da xantana produzida por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e comparação com a xantana comercial



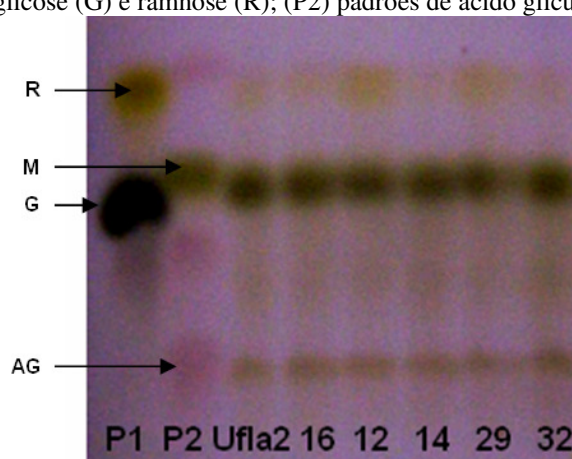
Para a produção de xantana buscam-se cepas com a melhor relação produção/viscosidade, pois a maior parte das aplicações necessita de xantana com alta viscosidade. Entretanto, a produção de xantanas de baixa viscosidade, como as obtidas neste estudo, não é, necessariamente, uma desvantagem. Há aplicações onde altas viscosidades não são necessárias, e a baixa viscosidade é uma característica desejável. Na indústria de alimentos, aplicações com xantana de baixa viscosidade incluem a retenção de aromas (Grisel et al., 2006; Grisel et al., 2008), onde é eficaz em concentrações de até 0,02% (m/v). Também foi demonstrado sua capacidade na retenção de umidade em produtos de panificação (Zambrano et al., 2005), onde a viscosidade da xantana utilizada não é uma característica fundamental.

Outra aplicação deste biopolímero de baixa viscosidade é no processo de recuperação do petróleo extraído em terra, onde uma metodologia foi desenvolvida e patenteada para a obtenção de xantana com estas propriedades (Bridges e Kalinski, 1991).

No processo de fermentação a baixa viscosidade também é uma vantagem, pois diminui o custo energético com aeração, devido a uma melhor difusão do oxigênio que é bombeado para o meio de cultura durante o processo. Segundo Weisrock e William (1983), em uma fermentação onde a viscosidade é reduzida pela metade, o custo final da xantana poderá ser 10% menor.

3.3 Composição química

A análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) da xantana produzida por *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. (P1) padrões de glicose (G) e ramnose (R); (P2) padrões de ácido glicurônico (AG) e manose (M).



O monossacarídeo ramnose, que não é encontrado na xantana comercial produzida por *X. campestris* pv. *campestris*, foi identificado em todas as amostras, com mais intensidade nas cepas 12 e 29, sugerindo uma maior proporção na xantana produzida por estas cepas. A presença deste açúcar (na forma levógira) já foi identificada na xantana produzida por *X. arboricola* pv. *pruni* e *X.*

arboricola pv. *juglandis* (Lowson e Symes, 1977; Souza, 1999; Antunes et al., 2000; Vendruscolo et al., 2000). Segundo Mcnelly e Kang (1977), a presença deste açúcar é uma característica desejável, pois, em geral, os polímeros dos quais fazem parte possuem a capacidade de formar géis verdadeiros. Neste estudo a forma isomérica (*D* ou *L*) dos monossacarídeos não foi determinada, pois a cromatografia em camada delgada não possibilita essa diferenciação.

4. Conclusão

Do total de sete cepas de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* usadas neste estudo, seis produziram xantana. No meio de cultura e nos parâmetros de fermentação testados a produção de xantana foi considerada baixa. Entretanto, pode ser consideravelmente aumentada testando outros meios de cultura e variando as condições operacionais durante o processo fermentativo. Em todas as xantanas produzidas foi identificado, além dos açúcares normalmente encontrados neste biopolímero comercial, o monossacarídeo ramnose. A baixa viscosidade observada nas soluções aquosas das xantanas obtidas possibilita seu emprego principalmente na retenção de aromas em produtos alimentícios e em agentes suspensivos em geral.

Abstract

Xanthan gum is a bacterial heteropolysaccharide synthesized by several species of Xanthomonas Genus. Because mainly its excellent rheological properties, it finds diverse applications in the food industry, petroleum extract, cosmetics and pharmaceutical products. The objective of this work was the xanthan production and analyze the viscosity, rheological behaviour and chemical composition of the xanthan gum produced by seven strains of Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli. The xanthan yield varied from zero to 5.7 g.L⁻¹. The xanthan produced by all strains showed pseudoplastic behavior and no was observed significant difference of apparent viscosity among the xanthans. The apparent viscosity at 3% (w/v) measured in the deformation rate 10s⁻¹ varied from 3,400 to 3,800 mPa.s, minor that the commercial xanthan viscosity (13,900 mPa.s), produced by X. campestris pv. campestris. All xanthan samples showed in its composition the sugars glucose, mannose, glucuronic acid and different amounts of rhamnose, absent in the commercial xanthan.

Key-words: *Xanthomonas axonopodis*; xanthan; viscosity; chemical composition.

Referências

ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Síntese de biopolímero xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, n.2, v.6, p.83-87, 2000.

- BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* e das condições operacionais**. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – FAEM, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. 2004.
- 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**. Article in Press. doi:10.1016/j.carbpol.2008.07.013. 2008.
- BOROWSKI, J.M. ; REDIES, C. R. ; MICHELS, R. A. ; BORGES, C. D. ; VENDRUSCOLO, C. T. Xantana sintetizada por cepas *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* em diferentes meios de cultivo. **Anais do XIV Congresso de Iniciação Científica - Universidade Federal de Pelotas**. Pelotas/RS. 2006.
- BRIDGES, K.L.; KALINSKI, K.L. **Reduction of the viscosity of solutions viscosified with Xanthan gum polymers**. United States Patent No. 5055209. Osca, Inc. (Lafayette, LA). 1991, disponível em < <http://www.freepatentsonline.com> >, acesso em 19/08/2008.
- CADMUS, et al. Synthetic media for production, of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology Bioengineering**, v.20, p.1003-1014, 1978.
- DIAZ, P.S. **Influência de parâmetros físicos, químicos e da adição de íons no comportamento reológico de gomas xantana**. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – FAEM. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. 2002.
- EPPO – European and Mediterranean Plant Protection Organization. **EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests**. (version 2006-09), disponível em < <http://www.eppo.org> >, acesso em 17/06/2008.
- GRISEL, M.; JOUQUAND, C.; AGUNI, Y.; MALHIAC, C. Influence of chemical composition of polysaccharides on aroma retention. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.1097-1104, 2008.
- GRISEL, M.; JOUQUAND, C.; MALHIAC, C. Determination of specific interactions between aroma compounds and xanthan/galactomannan mixtures. **Developments in Food Science**, v.43, p.421-424, 2006.
- JEANES, A. Extracellular microbial polysaccharides – New hydrocolloids of interest to the food industry. **Food Technology**, n.5, v.28, p.34-40, 1974.
- LOWSON, C. J.; SYMES, K. C. Oligosaccharides produced by partial acetolysis of xanthan gum. **Carbohydrates Research**, Kidlington, v.58, p.433-438, 1977.
- MAYER, L. **Caracterização molecular de cepas de *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas axonopodis* pela técnica de AFLP e relação com a produção, reologia e composição química da xantana**. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – FAEM, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS. 2006.
- Mayer, L.; Bastos, C.P.; Michels, R.A.; Vendruscolo, C.T.; Moura, A.B. Produção de biopolímero xantana por cepas de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Curitiba/PR. 2006.
- MCNELLY, W.; KANG, K. PS-7 a new bacterial heteropolysaccharide. In: **SANDFORD P. A.; LASKIN, A. ed. Extracellular Microbial Polysaccharides**, Washington, D. C: American Chemical Society, p.220-230, 1977.
- MOREIRA, A.S.; SOUZA, A.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Determinação da composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada: metodologia. **Agrociência**, n.3, v.4, p.222-224, 1999.
- 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.469-474, 2001.
- PRADELLA, J.G.C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Relatório técnico n. 84396-205. Centro de Tecnologia de Processos e Produtos. Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP. São Paulo. 2006.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**. v.39, p.197-207, 2006.

SALOME, M. **Mutant strain of *Xanthomonas campestris*, process of obtaining xanthan, and non-viscous xanthan.** United States Patent No. 5536651. Sanofi (Paris, FR) Societe Nationale Elf Aguitaine (Courbevoie, FR). 1996, disponível em < <http://www.freepatentsonline.com> >, acesso em 19/08/2008.

SOUZA, A. S.; VENDRUSCOLO, C.T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**, n.2, v.8, p.115-123, 1999.

VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n.3, v.45, p.472-489, 1995.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharides produced by *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* C24. In: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**. Japan: Elsevier, p.187-191. 2000.

WEISROCK, W. P. **Method for producing a low viscosity xanthan gum.** United States Patent No. 4377637. Standard Oil Company, Indiana, Chicago/IL. United States. 1983, disponível em < <http://www.freepatentsonline.com> >, acesso em 19/08/2008.

ZAMBRANO, F.; HIKAGE, A.; ORMENESE, R.C.C.; MONTENEGRO, F.M.; RAUEN-MIGUEL, A.M. Efeito das gomas guar e xantana em bolos como substitutos de gordura. **Brazilian Journal of Food Technology**. n.1, v.8, p.63-71, 2005.

Nome completo: Lauri Mayer

Filiação institucional: Universidade Federal de Pelotas

Departamento: Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Função ou cargo ocupado: Estudante de Doutorado (Ciência e Tecnologia Agroindustrial)

Titulação: Mestrado em Ciências (Ciência e Tecnologia Agroindustrial (área: microbiologia))

Endereço completo para correspondência (bairro, cidade, estado, país e CEP):

Laboratório de Microbiologia de Alimentos

Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial - FAEM

Universidade Federal de Pelotas

Campus Universitário – Pelotas/RS - Brasil

CEP. 96010-900 Caixa postal 354

Telefones para contato: (53) 3275-7258 ramal 202; Fax: (53) 3275-7258

e-mail: laurimayer@gmail.com