

ATIVIDADE CELULOLÍTICA *VERSUS* RENDIMENTO DE XANTANA PRUNI

**SILVA, Caciara Souza da¹, ALVES-GAUTÉRIO, Fernanda Germano²,
MACAGNAN, Karine Laste¹, MOREIRA, Angelita da Silveira³,
VENDRUSCOLO, Claire Tondo⁴**

¹Aluna do Curso de Bacharelado em Biotecnologia – Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) – UFPel; ²Doutoranda Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) – CD Tec – UFPel, Professora IFSul – Campus Pelotas – Visconde da Graça; ³Professora do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos e do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Agroindustrial – UFPel; ⁴Professora do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, do P P-GCTA e do PPGB/CDTec – UFPel, claire.vendruscolo@pq.cnpq.br e caciara.souza@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A goma xantana é um aditivo estabilizante de grande importância e ampla utilização industrial, por isso sua produção é bastante estudada. As propriedades e o rendimento de xantana obtidos no processo fermentativo podem ser influenciados pela variação das condições operacionais impostas na fermentação (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Outro fator que também deve ser levado em conta é a atividade de enzimas extracelulares, que podem vir a degradar o biopolímero; como exemplo dessas enzimas cita-se a celulase (SUTHERLAND, 2001).

De acordo com Dow et al. (2003), a celulase é uma enzima que apresenta atividade sobre a goma xantana, no entanto, não possui nenhum papel aparente contra a bactéria *Xanthomonas*. O biopolímero sofre hidrólise parcial em presença da enzima celulase, que é sintetizada pela bactéria. Esta enzima também torna limitada a utilização de xantanas que não sofreram tratamento térmico previamente, que promove a inativação enzimática, em combinação com compostos derivados da celulose, como carboximetilcelulose (SUTHERLAND, 1999; SUTHERLAND, 2001).

Entende-se que durante a produção da goma xantana ocorre produção de enzimas que podem atuar auxiliando a sua síntese, como também ocorre a produção de enzimas que podem atuar degradando o polímero. A partir desse entendimento objetivou-se o presente trabalho, tendo como razão de seu desenvolvimento traçar a relação entre a atividade celulolítica e o rendimento de xantana pruni.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Manutenção do microrganismo e multiplicação celular

Para o desenvolvimento dessa pesquisa utilizou-se a bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni, cepa EDE, da coleção do Laboratório de Biopolímeros, mantida por repiques mensais em meio SPA. Preservou-se um estoque por liofilização. Conduziu-se a fase de multiplicação celular (produção de inóculo) em incubador agitador rotativo (modelo *B. Braun Biotech International*) durante 24h, conforme patente WO/2006047845 (VENDRUSCOLO et al., 2006).

2.2. Produção de xantana

Para obtenção da xantana, realizaram-se fermentações do tipo submersa, em duas fases, sendo a inicial, de produção de inóculo, em *shaker*, com 24h de duração, e a segunda, de produção em fermentador (modelo Biostat B de 5L, *B. Braun Biotech International*®), com volume útil de 3L, de acordo com a patente WO/2006047845 (Vendruscolo et al., 2006), utilizando-se duas combinações de agitação e aeração. No ensaio 1 utilizaram-se agitação e aeração altas e no ensaio 2 empregou-se baixa agitação e aeração intermediária. As fermentações foram conduzidas por 72h com o pH ajustado inicialmente em 7,0 e não mais foi controlado durante o processo. Realizaram-se fermentações em triplicata. Fez-se um acompanhamento mediante retiradas de amostras dos caldos fermentados nos intervalos de 0, 6, 20, 24, 30, 44, 48, 54, 66 e 72h, através da determinação da atividade celulolítica e do rendimento de xantana nos caldos fermentados. Expressaram-se os resultados conforme a codificação do tratamento, como rendimento 1 e 2 e atividade celulolítica 1 e 2.

2.3. Determinação do rendimento

Tratou-se termicamente a 121°C por 15min os caldos fermentados. Das alíquotas das amostras do caldo fermentado recuperou-se as xantanas, pela adição de etanol 96°GL na proporção 1:4 (v/v), e secou-se em estufa a 56°C até peso constante (VENDRUSCOLO et al., 2000). Calculou-se gravimetricamente o resultado e se expressou em g.L⁻¹ de caldo fermentado.

2.4. Determinação da atividade celulolítica nos caldos fermentados

Determinou-se a atividade celulolítica pelo método DNS, segundo Miller (1959) modificado por Alves et al. (2011) empregando como substrato carboximetilcelulase (CMC) (Synth®). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima para liberar por minuto, sob condições do ensaio, 1µmol de glicose. Mensurou-se espectrofotometricamente a 540nm (HITACHI®, modelo U-180) a glicose liberada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O seguinte gráfico (Fig. 1) mostra os resultados obtidos, nos ensaios 1 e 2, nos diferentes horários de coleta do caldo fermentado, para o rendimento de xantana e a atividade celulolítica.

Obteve-se os maiores rendimentos no ensaio 1. Observou-se, dois picos em relação ao rendimento de xantana, sendo o primeiro em 18h e o segundo em 54h, nos dois ensaios estudados. Os valores mostraram-se quase constantes a partir das 66h mantendo-se assim até a finalização do processo. A atividade celulolítica variou de 2,43 a 0,39U.mL⁻¹ no ensaio 1 e de 2,43 a 1,02U.mL⁻¹ no ensaio 2.

As maiores atividades celulolíticas foram observadas nas amostras do ensaio 2, com menor rendimento. Nas primeiras 24h de fermentação, ocorreu um decréscimo acentuado na atividade celulolítica, em ambos os ensaios. Este resultado sugere que o meio utilizado para o crescimento celular (produção de inóculo) favorece uma elevada atividade celulolítica inicial, e não a produção de xantana. A enzima celulase é produzida durante a síntese da xantana, assim

como outras enzimas que estão relacionadas com esse microrganismo do gênero *Xanthomonas* (CADMUS et al., 1978).

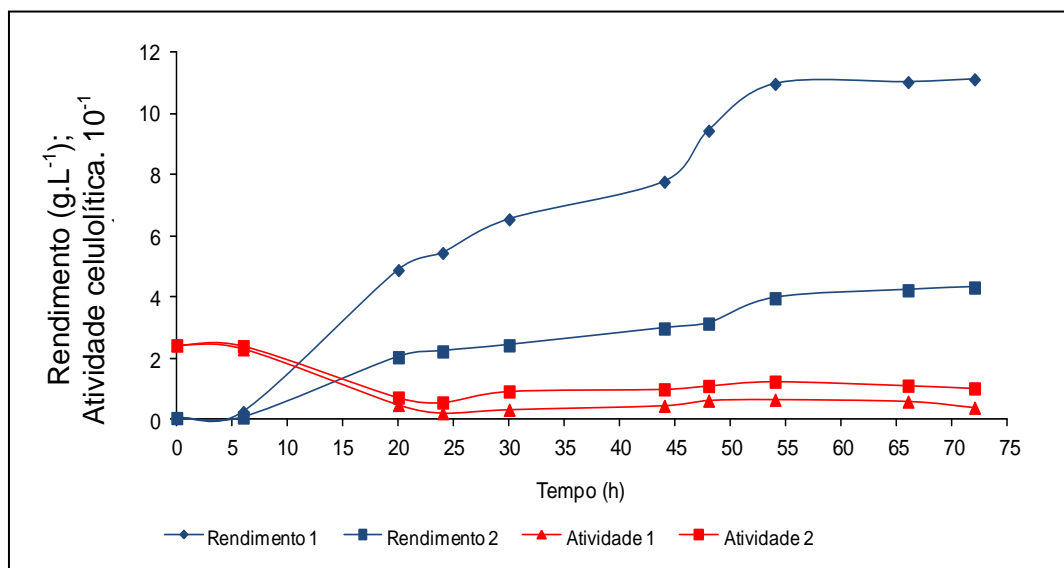


Figura 1: Rendimento de xantana dos processos fermentativos 1 e 2 e respectivas atividades celulolíticas

Explicam-se estes resultados levando-se em conta que baixas concentrações de oxigênio dissolvido, resultantes de menor aeração e agitação, resultam em um menor aporte energético para as células mediante metabolismo respiratório. Sutherland (1999) relata que algumas enzimas podem degradar biopolímeros durante o cultivo do microrganismo dependendo das condições empregadas no processo fermentativo. Nesse caso, o polímero degradado pode ser utilizado como fonte de energia para o metabolismo celular. Essas enzimas são capazes de transformar estes polissacarídeos em fragmentos menores, reduzindo assim a sua cadeia, e conseqüentemente, a viscosidade do polímero. Esse fenômeno também foi observado na produção de celulose, curdulana e dextrana. Cadmus et al. (1978), em suas pesquisas, verificaram enzimas capazes de degradar a xantana, dependendo das condições operacionais de cultivo deste biopolímero. Menezes et al. (2007), avaliando a produção de celulase pelo fungo do gênero *Pleurotus* por fermentação submersa em frascos agitados, por 30 dias a 30°C, empregando bagaço de cana como fonte de carbono, obtiveram atividades enzimáticas na faixa de 0,06 a 0,08 U.mL⁻¹, valores muito inferiores aos verificados no presente trabalho.

4. CONCLUSÃO

Ao fazer o acompanhamento do processo fermentativo, constatou-se um comportamento inverso entre a produção de xantana e a atividade celulolítica; pode-se, também, observar que a variação das condições de agitação e aeração, influenciaram o processo. Elevados valores de agitação e aeração ocasionaram um maior rendimento e uma menor atividade celulolítica. Em contra partida,

condições de baixa agitação e média aeração resultaram em menores rendimentos de xantana e uma maior atividade celulolítica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALVES, F. G.; LAUFFER, M. L.; ÜCKER, C. L.; MILCZRSKI, A. C. R.; KALILI, S. J.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo de Diferentes Diluentes do Caldo Fermentado de *Xanthomonas arboricola* pv pruni para Determinação da Atividade Celulolítica XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos – SINAFERM Caxias do Sul RS 2011

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.

DOW, J. M.; CROSSMAN, L. C.; FINDLAY, K.; HE, Y.Q.; FENG, J. X.; TANG, J. L. (2003), Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signalling and is required for full virulence to plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, p. 10995-11000.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**. v. 18, p. 549-579, 2000.

MENEZES, C. R. Estudo da atividade prebiótica de hidrolisados lignocelulósicos. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 663-674, 2001.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 319-328, 1999.

VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; MOREIRA, A. S. **WO/2006047845**. Universidade Federal de Pelotas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2006.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; ZAMBIAZI, R.; SCAMPARINI, A. R. P. Heteropolysaccharide produced by *Xanthomonas campestris* pv pruni C24. In: NISHINARI, K. **Hydrocolloids**. Amsterdam: Elsevier, v. 1, p. 187-191, 2000.