

**INVESTIGAÇÃO POR PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DA
INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E AERAÇÃO NO PROCESSO PRODUTIVO
DE XANTANA POR *Xanthomonas arboricola* pv pruni**

**INVESTIGATION BY EXPERIMENTAL DESIGN OF AGITATION
AND AERATION INFLUENCE ON THE XANTHAN PRODUCTION
PROCESS BY *Xanthomonas arboricola* pv pruni**

Fernanda Germano Alves-Gautério¹; Angelita da Silveira Moreira¹; Claire Tondo Vendruscolo¹
1Universidade Federal de Pelotas – UFPel – Pelotas – Brasil

¹fernandagauterio@unipampa.edu.br; ²angelitadasilveiramoreira@gmail.com;

³claire.vendruscolo@pq.cnpq.br

Resumo

Agitação e aeração em processos fermentativos de produção de xantana são variáveis necessárias para promover a oxigenação e evitar condições de anaerobiose, decorrentes da alta viscosidade do meio promovida pela formação desse biopolímero. Como existe interação entre essas variáveis, a combinação adequada deve ser determinada. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos combinados da agitação e aeração, variáveis independentes, sobre o rendimento e a produtividade de xantana pruni, variáveis dependentes, mediante Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), como também acompanhar o processo em termos de pH, oxigênio dissolvido, biomassa, rendimento e atividade celulolítica. O DCCR foi composto de 22 ensaios + 4 ensaios nas condições axiais + 3 pontos centrais e as fermentações foram conduzidas em volume de 5L, em condições operacionais em acordo com a patente WO2006047845. Todos os ensaios foram influenciados pelas variáveis estudadas e apresentaram comportamento semelhante com o passar do tempo, porém com valores distintos. A agitação, variável mais influente, proporcionou em seus níveis mais elevados, favoravelmente, os maiores níveis de oxigenação, rendimento em xantana e produtividade, associados a maiores biomassa e menores reduções do pH e atividade celulolítica. Obtiveram-se modelos válidos para rendimento e produtividade e verificou-se que não é necessário manter as variáveis agitação e aeração nos níveis mais elevados, dentre os testados.

Palavras-chave: aeração, agitação, planejamento experimental, xantana, *Xanthomonas arboricola* pv pruni.

1 Introdução

Xanthomonas campestris pv *pruni*, como todas as bactérias desse gênero, produz xantana, considerado o mais importante biopolímero microbiano exopolissacarídico sob o ponto de vista comercial e industrial. Este polímero foi o segundo a ser produzido em larga escala e o primeiro a ser utilizado na indústria alimentícia (MORRIS, 1995). É de grande importância para esta e outras indústrias como a farmacêutica, de tintas e petrolífera por sua capacidade de formar soluções de alta viscosidade, mesmo em baixas concentrações, pseudoplásticas e estáveis a, no mínimo, 65°C. Atua ainda como agente espessante, suspensivo, emulsificante e, em determinadas associações, como gelificante. Isto se deve as suas propriedades reológicas, que superam as de outros polissacarídeos comercializados (SUTHERLAND, 1996; BORN et al., 2002).

Nosso grupo vem trabalhando em pesquisas relacionadas ao *screening* de cepas de *Xanthomonas* pv *pruni* para a produção de xantana (VENDRUSCOLO et al., 2000; MOREIRA et al., 2001; ANTUNES et al., 2003; BORGES, 2004); condições operacionais (BORGES et al., 2008; BORGES et al., 2009a; ALVES et al., 2009); caracterização (BORGES et al., 2007; BORGES e VENDRUSCOLO, 2007; ALVES et al., 2009); comportamento reológico (BORGES et al., 2009b); composição química (MOREIRA et al., 1998; BORGES e VENDRUSCOLO, 2007; KLAIC et al., 2011); modificação química (SILVEIRA et al., 2008; PINTO et al., 2011).

Variações nas condições operacionais como temperatura, pH, agitação, aeração, entre outras, aplicadas à produção da xantana são fatores que podem influenciar na produtividade do processo fermentativo, bem como na qualidade do polímero obtido (PAPAGIANNI et al, 2001; FENG et al, 2003). Sendo as *Xanthomonas* estritamente aeróbias, o correto emprego das variáveis agitação e aeração no processo fermentativo é de fundamental importância para se evitar a limitação na transferência de oxigênio decorrente da elevação da viscosidade do meio ocasionada pela formação da xantana; também o estresse hidrodinâmico causado por elevadas agitações deve ser evitado. Desta forma, a combinação adequada destas variáveis deve ser estudada (SUTHERLAND, 1993; CASAS et al., 2000).

Planejamento experimental é uma ferramenta importante na área da biotecnologia para determinar as condições ideais do processo. Esta técnica é vantajosa em relação ao método convencional, que avalia apenas uma variável por tratamento e, como tal, não consegue alcançar as condições ideais por não considerar o efeito de possíveis interações entre as variáveis (SILVA-SANTISTEBAN e MAUGERI-FILHO, 2005; ALVES et al., 2010). A literatura relata diversos estudos relacionados às diferentes condições de agitação e de aeração, onde estes parâmetros são variados isoladamente (PETERS et al. 1989; LORDA et al., 1995; CASAS et al., 2000; PAPAGIANNI et al. 2001; BORGES et al., 2009a). Entretanto, inexistem relatos da utilização de

planejamento experimental para avaliação simultânea das variáveis agitação e aeração na produtividade do processo.

Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos combinados da agitação e aeração no processo fermentativo para produção de xantana por *Xanthomonas arboricola* pv pruni EDE (a ser mencionada neste trabalho como xantana pruni), esquematizado através da técnica de planejamento experimental, mediante análise das variáveis resposta rendimento de xantana e produtividade do processo. Também foi realizado o acompanhamento do processo com relação ao oxigênio dissolvido, pH, biomassa, rendimento, atividade celulolítica em todos os ensaios do planejamento experimental.

2 Material e métodos

Manutenção do micro-organismo e multiplicação celular

Utilizou-se a bactéria *Xanthomonas arboricola* pv pruni, cepa EDE, da coleção do Laboratório de Biopolímeros, mantida por repiques mensais em meio SPA, de acordo com Hayward (1964). Um estoque foi preservado por liofilização. A fase de multiplicação celular (produção de inóculo) foi conduzida em incubador agitador rotativo (*B. Braun Biotech International*®) durante 24h (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006).

Condução e acompanhamento dos processos fermentativos

As fermentações foram do tipo submersa de acordo com a patente WO/2006047845 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006), em fermentador (modelo *Biostat B* de 5L, *B. Braun Biotech International*®) com um volume útil de 3L, com duração de 72h. O pH foi ajustado inicialmente em 7,0 e não mais controlado durante o processo. O acompanhamento do processo foi realizado através da determinação do oxigênio dissolvido e pH, e mediante retirada de amostras nos intervalos de 0, 6, 20, 24, 30, 44, 48, 54, 66 e 72h para determinação da biomassa, rendimento de xantana e atividade celulolítica dos caldos fermentados. O oxigênio dissolvido foi mensurado por eletrodo polarográfico (*MicroNal*®, modelo B474) e o eletrodo de pH no próprio fermentador.

Diluição do caldo fermentado

Em virtude da elevada viscosidade do caldo fermentado pela presença de xantana tornou-se necessário realizar a diluição deste para facilitar a separação das células do restante do caldo fermentado. Para isto, o caldo fermentado foi diluído com solução salina 0,89% (m/v) na proporção 1:1, seguido de centrifugação ($47.810 \times g$ Centrífuga *Sorvall*® modelo RC 6). O precipitado e o

sobrenadante foram empregados nas determinações de biomassa e atividade celulolítica, respectivamente (ALVES-GAUTÉRIO, 2012; dado não publicado)

Determinação da biomassa

A biomassa foi determinada mediante separação das células por centrifugação do caldo fermentado a $47.810 \times g$ (Centrífuga Sorvall® modelo RC 6), ressuspensão das células precipitadas com solução salina 0,89% (m/v), medição por densidade óptica a 600nm, em espectrofotômetro (HITACHI®, modelo U-180) e conversão para gramas de célula seca por litro de caldo fermentado ($g L^{-1}$), conforme curva padrão (dado não mostrado).

Determinação da atividade celulolítica nos caldos fermentados

A atividade celulolítica foi determinada pelo método DNS, segundo Miller (1959, modificado). A atividade celulolítica foi mensurada espectrofotometricamente a 540nm (HITACHI®, modelo U-180), empregando carboximetilcelulase como substrato (Synth®) 1% (m/v) diluído em tampão citrato de sódio pH 7,0 e temperatura de reação de 45°C. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de glicose por minuto, sob as condições do ensaio.

Determinação do rendimento e produtividade do processo

Aliquotas das amostras dos caldos fermentados finais foram tratadas termicamente a 121°C por 15min; as xantanas foram recuperadas segundo Vendruscolo et al. (2000) mediante insolubilização pela adição de etanol 96°GL na proporção 1:4 (v/v), remoção manual e secagem em estufa a 56°C até peso constante. O rendimento de xantana foi expresso em $g L^{-1}$ de caldo fermentado. A máxima produtividade foi calculada como sendo a relação entre as concentrações máxima e inicial de xantana alcançadas em cada ensaio e os seus respectivos tempos, sendo expressa em $g L^{-1} h^{-1}$ de caldo fermentado.

Delineamento experimental

A influência da agitação e da aeração no processo foi avaliada através de um Planejamento Experimental - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR; *Central Composite Design Rotatable*; 2^2 ensaios + 4 ensaios nas condições axiais + 3 repetições no ponto central). As faixas estudadas no delineamento (Tabela 1) foram selecionadas de acordo com resultados de experimentos prévios e conforme patente WO/2006047845 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006). As variáveis independentes foram a agitação e aeração, tendo como variáveis resposta rendimento e produtividade do processo.

3 Resultados e discussão

O estudo da cinética do processo fermentativo está relacionado com a análise da evolução dos valores de concentrações iniciais, intermediários e finais dos componentes do processo em função do tempo de cultivo (HISS, 2001). Através do DCCR estudou-se a influência da agitação e da aeração no processo de produção da xantana pruni mediante acompanhamento das fermentações. A Tabela 1 contém a matriz do DCCR, com as variáveis codificadas, valores previstos e desvios relativos obtidos em cada ensaio e para as respostas rendimento e produtividade ao final do processo (72h). A Figura 1 representa o acompanhamento das fermentações, com relação às variações de pH, oxigênio dissolvido, atividade celulolítica, produção de biomassa e rendimento, ao longo do tempo, em função da agitação e da aeração.

Tabela 1 – Matriz do DCCR com variáveis codificadas, valores previstos e desvio relativo para o rendimento e produtividade do processo

Ensaio	Agitação	Aeração	Rendimento (g L ⁻¹)			Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)		
			Exp.*	Prev.**	Desv.*** (%)	Exp.*	Prev.**	Desv.*** (%)
1	-1	-1	5,20	4,76	8,46	0,07	0,10	-42,86
2	+1	-1	9,58	8,58	10,44	0,13	0,16	-23,08
3	-1	+1	6,85	6,40	6,57	0,09	0,08	11,11
4	+1	+1	11,13	10,22	8,18	0,15	0,13	13,33
5	-1,41	0	4,32	4,66	-7,87	0,06	0,06	0
6	1,41	0	8,98	10,05	-11,91	0,12	0,14	-16,67
7	0	-1,41	5,75	6,48	-12,69	0,08	0,15	-87,50
8	0	1,41	8,12	8,80	-8,37	0,11	0,12	-9,09
9	0	0	8,68	8,65	0,34	0,12	0,12	0
10	0	0	8,63	8,65	-0,23	0,12	0,12	0
11	0	0	8,65	8,65	0	0,12	0,12	0

*Exp.= Experimental **Prev.= Previsto ***Desv.= Desvio

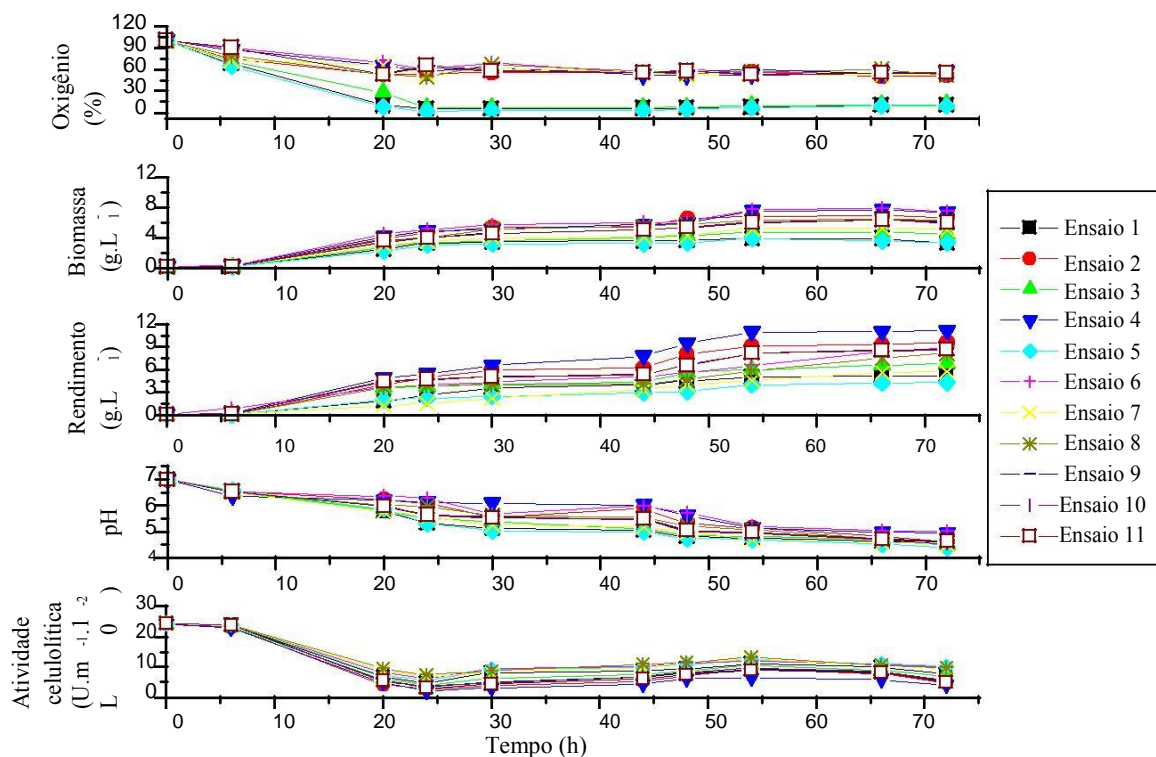
Pôde-se verificar que todas as fermentações apresentaram comportamento semelhante com o passar do tempo, a saber: aumento da concentração de biomassa e rendimento em xantana, queda nos valores de oxigênio dissolvido, pH, e queda inicial da atividade enzimática.

A concentração de oxigênio dissolvido, que é requerido tanto para a multiplicação celular quanto para produzir a xantana, sofreu um decréscimo no início do processo fermentativo, correspondendo ao início do incremento de biomassa; chegando quase que ao esgotamento nos ensaios 1, 3 e 5, conduzidos com os menores valores de agitação e que culminaram em baixas concentrações de biomassa e rendimento. Os níveis de oxigênio dissolvido estabilizaram-se a partir das 20h, com exceção do ensaio 3, no qual verificou-se ainda pequena queda em 24h, atingindo valor semelhante aos observados nos ensaios 1 e 5 neste mesmo período.

Para Galaction et al. (2004), o fornecimento de oxigênio aos meios fermentativos é um fator decisivo no crescimento dos micro-organismos aeróbios, como as bactérias do gênero *Xanthomonas*, pois a eficiência do processo depende da solubilização do oxigênio para satisfazer a

demanda da população microbiana. Segundo Wang et al. (1979), a agitação e aeração nos processos de fermentação objetivam tanto o fornecimento de oxigênio aos micro-organismos, com o propósito de possibilitar as atividades metabólicas aeróbicas, como manter os micro-organismos em suspensão e a homogeneidade de nutrientes e metabólitos no meio através da agitação.

Figura 1 – Acompanhamento da produção de xantana por *X. arboricola* pv *pruni* em função do DCCR: oxigênio dissolvido, pH, biomassa, rendimento e atividade celulolítica.



Conforme a literatura, quando se trata de produção de xantana, a utilização de velocidade de agitação elevada é necessária. Limitação de oxigênio foi observada por Peters et al. (1989) quando utilizaram baixos níveis de agitação na produção de xantana, resultando em uma produção de polímero significativamente menor do que a obtida em altas velocidades. De acordo com Casas et al. (2000), as concentrações de biomassa e de xantana tendem a aumentar com a elevação da agitação; entretanto, em elevados valores desse parâmetro, pode ocorrer quedas nessas produções, que segundo esses autores, podem ser decorrentes de um fenômeno conhecido como estresse hidrodinâmico. O estresse hidrodinâmico pode ser definido como a junção de todos os efeitos mecanicamente originados, que afetam negativamente o objetivo principal do processo em estudo. A agitação e a aeração estão intimamente ligadas a este fenômeno (MÄRKL e BRONNENMEIER, 1985).

Nossos resultados estão de acordo com os de Peters et al. (1989), que avaliaram a produção de xantana em função de diferentes velocidades de agitação (200, 400, 600 e 800rpm). Neste

estudo, estes autores não observaram estresse hidrodinâmico com o aumento da agitação, alcançando uma produção máxima de $16,4\text{g L}^{-1}$ em 800rpm.

Até as 8h de processo foi observada uma fase de adaptação (fase *lag*) do micro-organismo ao meio de cultura e, também, às condições operacionais impostas em cada ensaio estudado. Após esse intervalo e até 54h ocorreu incremento na produção de biomassa (fase *log*), que cessou ao ser atingida a fase estacionária de crescimento celular (54-66h). A partir de 66h de cultivo, na maioria dos ensaios, ocorreu uma leve redução de biomassa; entretanto, essa diminuição não prejudicou a produção do polímero, visto que a mesma se manteve constante até o final do processo ou aumentou, como nos ensaios 6 (maior agitação) e 8 (maior aeração). Elevadas concentrações celulares não estão necessariamente, relacionadas a elevados rendimentos em xantana. Apesar da semelhança no perfil do crescimento, as concentrações celulares máximas obtidas diferiram para cada condição estudada, atingindo valores entre $2,61$ e $8,6\text{g L}^{-1}$.

Em consonância ao esperado para micro-organismos estritamente aeróbicos, o aumento da agitação e aeração elevou os valores de biomassa, como foram observados nos ensaios 4, 6 e 8; por outro lado, os menores níveis dessas variáveis resultaram em menores concentrações celulares (ensaos 1, 5 e 7). Segundo Casas et al. (2000), como *X. arboricola* é estritamente aeróbica, é importante controlar as condições operacionais agitação e aeração para impedir a limitação de transferência de oxigênio decorrente da elevação da viscosidade do meio ocasionada pela formação da xantana.

A agitação foi a variável que mais influenciou o processo em termos de rendimento de xantana. Os ensaios 2, 4 e 6, com os maiores níveis de agitação, ocasionaram os mais elevados rendimentos. Foi observado um crescente aumento na produção de polímero ao longo do tempo para todos os ensaios, sendo mais acentuado até às 54h. A partir das 66h (final da fase estacionária), os valores mantiveram-se quase que constantes até o final do processo, em 72h, indicando não ser economicamente proveitoso a manutenção do processo após 54h, no que diz respeito à produção de xantana pruni.

De acordo com García-Ochoa et al. (2000), quando o pH do meio de cultura é mantido fixo (pH controlado), a produção de xantana cessa quando atingida a fase estacionária de crescimento celular; entretanto, quando não há controle de pH, o polímero continua a ser produzido durante esta fase, justificando o que ocorreu no presente trabalho. Resultado semelhante foi verificado por Moreira, em 2002, produzindo xantana a partir de outra cepa de *X. arboricola* pv pruni.

A literatura relata a variação ocorrida no pH do caldo fermentado quando o mesmo não é mantido fixo (pH não controlado) por meio da adição intermitente de soluções corretivas. Durante a produção de xantana o pH inicial do caldo de fermentação, geralmente neutro, normalmente decresce, até valores ao redor de 5,0, em função da produção de ácido pirúvico e da presença de

grupos ácidos na xantana; mais raramente, pode aumentar, dependendo da composição do meio e da cepa utilizada (De VUYST e VERMEIRE, 1994; GARCIA-OCHOA et al., 2000; PAPAGIANNI et al., 2001; KLAIC, 2010).

Como esperado, a queda dos valores de pH esteve relacionada ao aumento de biomassa e à produção da xantana pruni. Verificou-se redução no pH já nas primeiras 8h de processo, correspondentes à fase de adaptação celular. Após este intervalo e até 54h a queda do pH continuou dependente da multiplicação da biomassa, que exige intenso metabolismo celular. Após esse intervalo e até o final da fermentação, a redução do pH esteve mais relacionado ao aumento no rendimento em xantana, devido aos grupos ácidos presentes na estrutura do polímero formado, já que a concentração celular, neste intervalo, manteve-se constante. Na maioria dos ensaios foram atingidos valores abaixo de 5,0, exceto para os ensaios 4 (pH 5,0) e 6 (pH 5,01), com maiores valores de agitação.

Para Schneider et al. (2001), quando o sistema está submetido a condições insuficientes de agitação ocorre abaixamento do pH em função do acúmulo do CO₂ proveniente do metabolismo do micro-organismo. Fermentações conduzidas em condições de maior agitação promovem uma maior liberação de CO₂ ao meio externo e o pH sofre menor redução. Em nosso trabalho, nos ensaios 3 e 5, com as menores agitações, foram observadas as maiores reduções no parâmetro pH, atingindo-se os valores pH 4,43 e 4,39, respectivamente.

Micro-organismos do gênero *Xanthomonas* produzem um grande número de enzimas durante a síntese da xantana; como exemplo, têm-se a enzima celulase. O nosso interesse na realização do acompanhamento da atividade da celulase foi em virtude de que, além das *Xanthomonas* serem micro-organismos produtores de celulase, a cadeia principal da xantana apresentar estrutura química idêntica àquela da celulose, formada por unidades de glicose unidas por ligações do tipo β -1,4 [β -Glc(1 4)Glic], constituindo-se em substrato natural da celulase. Desta forma, esta enzima pode vir a degradar o polímero durante o processo fermentativo.

Acompanhando o processo fermentativo pôde-se observar um comportamento inverso entre a produção de xantana e a atividade celulolítica. Verificou-se atividade celulolítica elevada no início da fermentação, quando as células ainda apresentam o comportamento metabólico característico da fase de produção do inóculo, seguida de um decréscimo acentuado até as 24h. Este resultado nos leva a interpretar que o meio e as condições utilizadas para promover o crescimento celular (produção do inóculo) propiciam uma elevada atividade celulolítica e não a produção de xantana.

A variação das condições operacionais – agitação e aeração – influenciou a atividade celulolítica no caldo fermentado durante o processo fermentativo. Elevados valores de agitação, favoravelmente, em menor atividade celulolítica e maior rendimento de polímero. Por outro lado,

em baixas agitações foram obtidos atividades enzimáticas maiores e os mais baixos valores de xantana. Tais resultados podem ser explicados em virtude de que baixas concentrações de oxigênio dissolvido resultam em um menor aporte energético para as células mediante metabolismo respiratório.

Segundo Sutherland (1999), enzimas degradadoras de biopolímeros podem ser produzidas durante o cultivo de micro-organismos e, dependendo das condições operacionais que estão sendo empregadas no processo fermentativo, podem vir a serem utilizadas na degradação dos polímeros, a fim de utilizá-los como fonte de energia. Desta forma, estas enzimas são capazes de degradar estes polissacarídeos em fragmentos menores, de forma a reduzir a cadeia, o que, conseqüentemente, reduz a viscosidade do meio, favorecendo a oxigenação. Esse fenômeno foi observado durante a produção de celulose microbiana, curdulana, dextrana e xantana por Cadmus et al. (1982). 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 rico em polissacarídeos complexos como fonte de carbono, obtiveram atividades enzimáticas na faixa de 0,06-0,08U mL⁻¹, valores mais elevados que os verificados em nosso trabalho empregando como fonte de carbono polissacarídeo simples (sacarose).

As diferenças observadas nos parâmetros analisados no acompanhamento dos ensaios realizados em função dos diferentes níveis de aeração e agitação confirmaram a importância do conhecimento da cinética do processo. Desta forma, a fim de continuar avaliando a influência da agitação e da aeração no processo de produção de xantana foi realizada a validação do modelo proposto para o processo através da Análise de Variância (ANOVA), conforme reportado na Tabela 2. Para isto, os máximos valores de rendimento e produtividade em xantana foram empregados nesta análise. As variáveis dependentes e independentes foram ajustadas a um modelo quadrático. Em razão do termo de interação entre as variáveis independentes não ter sido significativo, este foi incorporado aos resíduos para o cálculo da ANOVA.

Tabela 2 – ANOVA para rendimento e produtividade no DCCR.

Fonte de variação	Soma quadrática		Graus de liberdade		Média quadrática		F calculado	
	Rend.*	Prod.**	Rend.*	Prod.**	Rend.*	Prod.**	Rend.*	Prod.**
Regressão	37,44	7,2.10 ⁻³	4	4	9,36	1,8.10 ⁻³	12,65	12,00
Resíduo	4,47	0,9.10 ⁻³	6	6	0,74	0,15.10 ⁻³		
Falta de ajuste	4,47	0,09.10 ⁻³	4	4				
Erro puro	1,3.10 ⁻³	0	2	2				
Total	41,91	8,1.10 ⁻³	10	10				

Rend. (Rendimento): R² = 0,9

F_{tabelado 4,6; 0,95} = 4,53

Prod. (Produtividade): R² = 0,9

F_{tabelado 4,6; 0,95} = 4,53

No presente estudo foram obtidos valores de R² altos (0,9 e 0,9) e um desempenho bom do F_{teste} (12,65 e 12,00), sendo aproximadamente três vezes maior que o F_{tabelado} (4,53 e 4,53) para o rendimento e produtividade, podendo concluir-se que o modelo ajusta-se bem aos dados

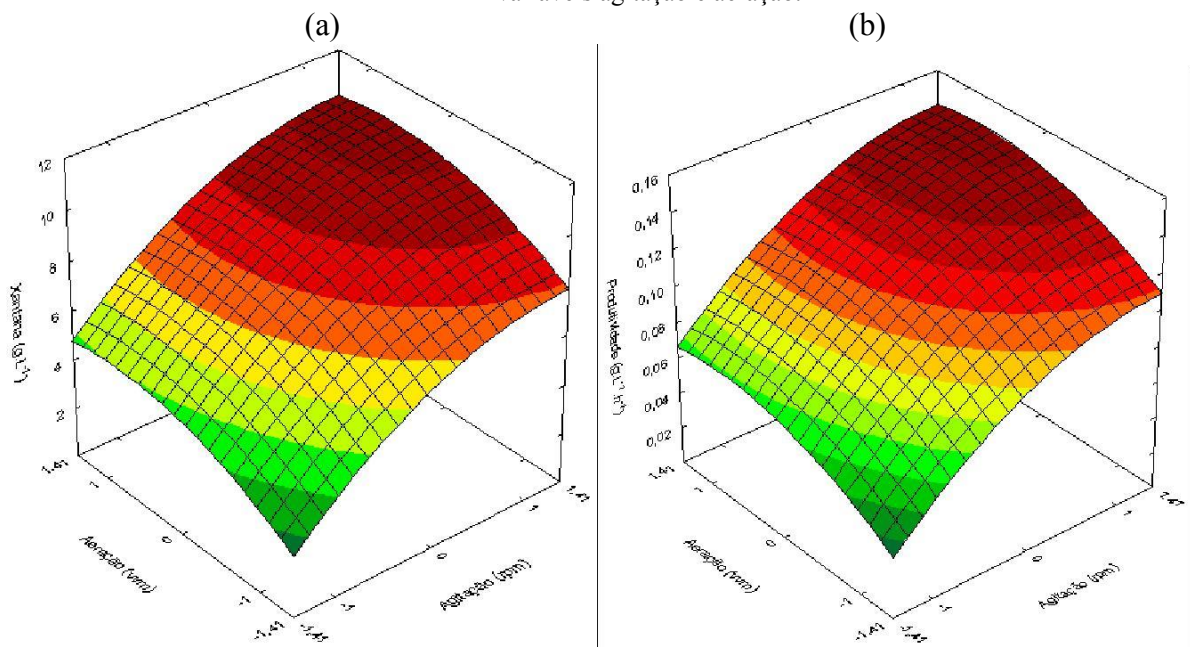
experimentais. Os valores do erro puro foram baixo ($1,3 \cdot 10^{-3}$) e nulo para a produção e produtividade, respectivamente, indicando uma boa reprodutibilidade experimental. Os desvios relativos foram calculados para cada ensaio e estão reportados na Tabela 2. Para o rendimento todos os desvios foram baixos, com valores máximos na ordem de 12%, enquanto que para a produtividade foram mais elevados; entretanto, na região de maior produtividade (ensaio 4), o desvio foi na ordem de aproximadamente 13%.

Os modelos com as variáveis codificadas, que representam o rendimento e a produtividade de xantana em função da agitação e da aeração, estão demonstrados nas Equações 1 e 2, respectivamente. Em função dos modelos codificados terem sido considerados preditivos e significativos, foi possível obter as superfícies de resposta para o rendimento e produtividade, apresentadas nas Figuras 2a e 2b, respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Rendimento} = & 8,64776 + 1,909506 (\text{Agitação}) - 0,650599 (\text{Agitação})^2 + 0,820152 (\text{Aeração}) \\ & - 0,507246 (\text{Aeração})^2 \end{aligned} \quad (\text{Equação 1})$$

$$\begin{aligned} \text{Produtividade} = & 0,119321 + 0,026521 (\text{Agitação}) - 0,008990 (\text{Agitação})^2 + 0,011391 (\text{Aeração}) \\ & - 0,006999 (\text{Aeração})^2 \end{aligned} \quad (\text{Equação 2})$$

Figura 2 – Superfícies de resposta para (a) rendimento em xantana e (b) produtividade como uma função das variáveis agitação e aeração.



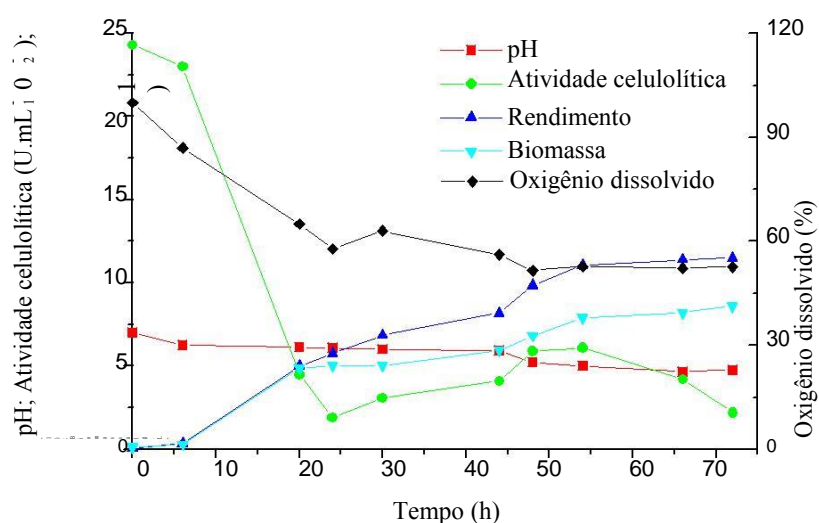
Através das superfícies de resposta geradas pelos modelos (Figuras 2a e 2b) foi possível visualizar as condições de agitação e de aeração que resultaram em maiores valores para o rendimento e produtividade. As faixas ótimas foram as mesmas, tanto para o rendimento como para

a produtividade – a partir do nível +1 e do ponto central (0) para a agitação e aeração, respectivamente.

Foi observado que não é necessário manter as condições operacionais de agitação e de aeração em seus níveis mais elevados (pontos axiais positivos). Para o processo, isto é favorável economicamente, já que a diferença de velocidade entre os níveis de agitação +1,41 e +1 corresponda a 14,7%. Cumpre, ainda, salientar que, sob o ponto de vista energético e mecânico do equipamento, a manutenção de elevados níveis de agitação mecânica ocasiona maior consumo e desgaste, respectivamente. De acordo com Schmidell (2001), a manutenção de elevadas concentrações de oxigênio no meio de cultura com elevada viscosidade demanda um maior consumo de energia, em função da necessidade de agitação e aeração mais intensas. Por esta razão, micro-organismos que mantêm um bom desempenho em culturas com presença de baixas concentrações de oxigênio dissolvido são muito interessantes sob o ponto de vista econômico. Outro aspecto importante a ser salientado é que nossos resultados estão em acordo com os encontrados por Peters et al. (1989), cujos valores de rendimento aumentaram conforme foi elevada a agitação do sistema, sem verificar ocorrência de estresse hidrodinâmico até os níveis utilizados.

Para validar o DCCR foi realizado o ensaio 12 com a agitação e aeração nos níveis +1,41 (ponto extremo nas superfícies de resposta para o rendimento e produtividade). Nesta condição, o processo foi acompanhado através do rendimento, biomassa, atividade de celulase, pH e oxigênio dissolvido ao longo do tempo (Figura 3).

Figura 3 – Acompanhamento da fermentação na melhor condição do DCCR (ensaio 12): rendimento, biomassa, pH, celulase (atividade celulolítica) e oxigênio dissolvido.



Neste experimento foram obtidos 11,5g L⁻¹ de rendimento; produtividade 0,15g L⁻¹ h⁻¹; 0,02U mL⁻¹ de atividade celulolítica e uma concentração celular (biomassa) de 8,6g L⁻¹ ao final do processo (72h), conforme Figura 3.

4 Conclusão

As variáveis dependentes, rendimento e produtividade, foram significativamente influenciadas pelas variáveis independentes, agitação e aeração, em todos os ensaios do DCCR, no processo de produção de xantana por *Xanthomonas arboricola* pv pruni EDE. Os níveis de agitação e aeração resultaram em variações distintas nos resultados de oxigênio dissolvido, pH, biomassa, atividade celulolítica e rendimento, mas com comportamento semelhante com o passar do tempo. A agitação foi a variável que mais influenciou o processo fermentativo, com os maiores níveis possibilitando, favoravelmente, a obtenção de maiores rendimento em xantana, produtividade e níveis de oxigenação, associados a maiores biomassas e menores atividades celulolíticas e reduções do pH. O modelo proposto pelo DCCR foi considerado válido para rendimento e produtividade, sendo que as faixas ótimas estabelecidas foram as mesmas: a partir do nível +1 e do ponto central (0) para a agitação e aeração, respectivamente; portanto, não sendo necessário manter as condições operacionais de agitação e de aeração em seus níveis mais elevados, o que resulta em economia no processo.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Centro de Desenvolvimento Tecnológico/UFPel pelo suporte financeiro.

Abstract

*Agitation and aeration on fermentation processes for xanthan production are necessary variables to avoid anaerobic conditions due to high viscosity of fermented broth by polymer formation. Oxygenation obtained in the process results mainly from these variables, which appropriate combination of these, should be studied in order to avoid the transfer of oxygen limitation in the process. This study aimed to evaluate the combined effects of agitation and aeration on the xanthan production by *Xanthomonas arboricola* pv pruni EDE. It was employed a Central Composite Rotational Design, 2² + 4 assays in the axial condition + 3 central points; with independent variables agitation and aeration; yield and productivity as dependent variables; also pH, dissolved oxygen, biomass and cellulolytic activity were accompanied during the process in all assays of experimental design. Process was carried out in a 5L bioreactor with operational conditions according to patent WO2006047845. All assays were influenced by varying the agitation and aeration; all fermentations showed similar behavior by the time. The agitation was the variable that most influenced the fermentation process, providing get higher values of yield and biomass and lower cellulolytic activity, what is desired. The differences observed emphasized the necessity of studying the process kinetics by monitoring the yield, biomass, pH, dissolved oxygen and cellulolytic activity. It was obtained valid models for yield and productivity. It has been found that it is not necessary to maintain the operational conditions of agitation and aeration at their highest levels.*

Key-words: aeration; agitation; experimental design; xanthan; *Xanthomonas arboricola* pv pruni.

Referências

- ALVES, F. G.; MAUGERI-FILHO, F.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. Maximization of β -Galactosidase production: a simultaneous investigation of agitation and aeration effects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.160, p.1528-1539, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-009-8683-z>
- ALVES, F. G.; KLAIC, P. M. A.; RODRIGUES, A. A.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, C. T. Estabilidade do caldo fermentado por *Xanthomonas arboricola* pv pruni após armazenamento. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, p. 77-85, 2009. <http://dx.doi.org/10.3895/s1981-36862009000100008>
- ANTUNES, A. E. C.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening of *Xanthomonas campestris* pv pruni strains according to their production of xanthan and its viscosity and chemical composition. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 317-322, 2003.
- BORGES, C. D.; DE 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**, v. 75, p. 262–268, 2009a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.07.013>
- BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T.; MARTINS, A. L.; LOMBA, R. F. T. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 2, 160-165, 2009b.
- BORGES, C. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; AYUB M. A. Z. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 81-85, 2008.
- BORGES, C. D.; BASTOS, C. P.; VENDRUSCOLO, C. T. Avaliação das características físicas e químicas de gomas xantanas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, n.2, p. 107-114, 2007. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2007v28n2p107>
- BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. Xanthan synthesized by strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni: production, viscosity and chemical composition. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 4, p. 67-73, 2007.
- BORGES, C. D. **Caracterização da goma xantana em função da cepa de *Xanthomonas campestris* pv pruni e das condições operacionais**. 2004. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- BORN, K.; LANGENDORFF, V.; BOULENGUER, P. Xanthan. In: STEINBÜCHEL, A.; VANDAMME, E. J.; De BAETS, S. **Biopolymers**, 2002, v. 5. Weinheim: Wiley-VCH, p. 259-291.
- CADMUS, M., C.; JACKSON, L. K.; BURTON, K. A.; PLATTNER, R. D.; SLODKI, M. E. Biodegradation of Xanthan Gum by *Bacillus* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 5-11, 1982.
- CASAS, J. A.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: Molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 26, p. 282–291, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00160-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00160-X)
- De VUYST, L.; VERMEIRE, A. Use of industrial medium components for xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 187-191, 1994. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530050236>
- FENG, Y.; HE, Z.; ONG, S. L.; HU, J.; ZHANG, Z.; Ng, W. J. Optimization of agitation, aeration and temperature conditions for maximum β -mannanase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 82-89, 2003.
- GALACTION, A. I.; CASCAVAL, D.; ONISCU, C.; TURNEA, M. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacterias, yeast and fungus broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 20, p. 85-94, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2004.02.005>
- GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASA, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00050-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00050-1)
- HAYWARD, A. C. Bacteriophage sensitivity and biochemical group in *Xanthomonas malvacearum*. **Journal of General Microbiology**, p. 287-298, 1964. <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-35-2-287>
- HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: BORZANI, W. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biocologia Industrial – Engenharia Bioquímica**, 2001, v. 2, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda.

KLAIC, P. M. A.; NUNES, A. M.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; RIBEIRO, A. S. Determination of Na, K, Ca and Mg in xanthan gum: Sample treatment by acid digestion. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1895-1900, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.059>

KLAIC, P. M. A. **Desenvolvimento de método de digestão ácida para determinação de sais em xantana e potencialização reológica de xantana de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* por troca iônica**. 2010. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

LORDA, C. S.; PASTOR, M. D.; BALATTI, A. P. Obtención de xantano a partir de *Xanthomonas campestris* B-1459 em fermentadores com agitação mecânica. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 27, p. 146-155, 1995.

MARKL, H.; BRONNENMEIER, R. **Mechanical Stress and microbial production. Fundamental of Biochemical Engineering: Biotechnology**. Volume Editor: H. Brauer VCH, v. 2, cap 18, 1985.

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. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>

MOREIRA, A. S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. 2002. 73f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, 2002.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X\(01\)00092-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0268-005X(01)00092-3)

MOREIRA, A. S.; SOUZA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T.. Determinação de composição de biopolímero por cromatografia em camada delgada. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, p. 222-224, 1998.

MORRIS, V. J. Bacterial polysaccharides. In: STEPHEN, A. M. **Food polysaccharide and their applications**. New York: Basel Marcel Dekker, 1995. p. 341-375.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 73-80, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00174-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00174-1)

PETERS, H.; HERBST, H.; HESSELINK, P.; LÜNSDORF, H.; SCHUMPE, A.; DECKWER, W. The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 1393-1397, 1989. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260341108>

PINTO, E. P.; FURLAN, L.; VENDRUSCOLO, C. T. Chemical deacetylation natural xanthan (Jungbunzlauer). **Revista Polímeros**, v. 21, n. 1, p. 47-52, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282011005000005>

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2, p. 5-18.

SCHNEIDER, A. L. S.; MERKLE, R.; CARVALHO-JONAS, M. F.; JONAS, R.; FURLAN, S. Oxygen transfer on β -galactosidase production by *Kluyveromyces marxianus* using sugar cane molasses as carbon source. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 547-550, 2001. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010338904870>

SILVA-SANTISTEBAN, B. O. Y.; MAUGERI-FILHO, F. **Enzyme and Microbial Technology**, 36, 717-724, 2005.

SILVEIRA, C. F.; PREICHARDT, L. D.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, C. T. Modificações químicas em xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* promovidas por tratamento térmico. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 2, p. 32-41, 2008. <http://dx.doi.org/10.3895/S1981-36862008000200004>

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases For Microbial Exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 319-328, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00114-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00114-3)

SUTHERLAND, I. W. Microbial biopolymers from agricultural products: production and potencial. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 38, n. 3-4, p. 249-261, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(96\)00058-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(96)00058-3)

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993, p. 363-388.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS. VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; MOREIRA, A.S. **Process for preparing a xanthan biopolymer.** WO/2006/047845. 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. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-044450178-3/50022-6>

WANG, D. I. C.; COONEY, C. L.; DEMAIN, A L.; DUNNIL, P.; HUMPHREY, A E.; Lilli, M. D. **Fermentation and Ezyme Technology.** New York, Toronto. John Wiley & Sons, 1979.

Submetido em 26 ago. 2013, Aceito para publicação em 11 jan. 2015, Publicado em 10 dez. 2015.