

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

JOÃO PEDRO MAZZOCHI

Avaliação da produção de goma xantana por linhagens recombinantes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

São Carlos – SP

2022

JOÃO PEDRO MAZZOCHI

Avaliação da produção de goma xantana por linhagens recombinantes de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

Trabalho de Graduação apresentado ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva.

Coorientador: M. Sc. Davi Benedito Oliveira.

São Carlos – SP

2022

BANCA EXAMINADORA

Trabalho de Graduação apresentado no dia 13 de setembro de 2022 perante a seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Convidada: Prof^a. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Professor da Disciplina: Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que sempre foi meu Pai, zelou e cuidou de mim nas horas que estive sozinho e creio que Ele nunca haverá de faltar. Agradeço a minha avó Belinha que me criou, formou meu caráter e hoje em dia me guarda do céu. A minha mãe Denise que me deu a vida e, praticamente sozinha, sempre cuidou e trabalhou para que nunca me faltasse nada. Ao meu companheiro Kaue, meu namorado e também melhor amigo, agradeço por estar junto de mim todos esses anos superando adversidades e me vendo dormir em centenas de filmes.

Meus demais familiares (tias e primos), que não consigo citar nominalmente sem deixar de esquecer alguém, deixo aqui registrado o meu obrigado por nunca deixarem de acreditar em mim nos momentos que eu mesmo não acreditei. Agradeço também às amigas que tive ao longo da graduação e que me estimularam a chegar até o fim. Cheguei.

Ao Prof. Dr. Adilson, meu orientador, pelas pertinentes sugestões, apoio e atenção ao longo do trabalho, meus eternos agradecimentos. Ao MSc. Davi que me passou muitos dos ensinamentos práticos para levar o trabalho da melhor forma possível. Aos demais colegas do Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC) que me auxiliaram ao longo do processo. Gratidão.

Agradeço imensamente a todos os docentes que me inspiraram ao longo dessa trajetória que é a vida. Especialmente aos professores do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos que fizeram parte da minha formação, registro aqui minha satisfação em tê-los como facilitadores do processo de aprendizado, que por muitas vezes não foi fácil, mas definitivamente valeu muito a pena ter chegado até aqui.

Finalizo meus agradecimentos dedicando este trabalho ao Josivan de Sousa Cunha, que fazia parte do quadro de doutorandos do Laboratório de Fábricas Celulares da Universidade Federal de São Carlos e era uma pessoa cheia de luz, conhecimento e felicidade, que me ensinou em pouco tempo de convívio muita coisa.

“Ora, o último inimigo que há de ser aniquilado é a morte”

I Coríntios 15:26

RESUMO

A goma xantana (GX) é um heteropolissacarídeo sintetizado a partir da fermentação aeróbica por bactérias do gênero *Xanthomonas*. Tem como principais características a alta viscosidade, elevada pseudoplasticidade, grande estabilidade da viscosidade para amplas variações de pH e temperatura e é compatível com sais. Tais propriedades lhe conferem diversas aplicações nas indústrias alimentícia, de cosméticos e petrolífera, pois a goma pode agir como espessante, emulsificante e estabilizante. Atualmente, a maioria dos polissacarídeos hidrossolúveis utilizados na indústria é de origem vegetal, porém, ainda que o Brasil dependa da sua importação, polissacarídeos de origem microbiana vêm demonstrando ser de grande valor comercial. O desenvolvimento de processos para síntese da goma tem sido orientado no sentido de otimizar fatores como condições operacionais, meios de cultivo e tecnologias para recuperar o composto de interesse – e parte importante desse processo é o desenvolvimento de novas linhagens recombinantes que maximizem a produção da goma pelas células. Nesse contexto, Oliveira (2021) realizou a superexpressão das principais enzimas identificadas como *bottlenecks* na rota de síntese da GX, a UDP-Glicose desidrogenase (UDPG-deH) e UDP-Glicose pirofosforilase (UDPG-PP), em linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris* e notou uma melhora expressiva na produção de xantana quando as enzimas são superexpressas de forma individual e em determinadas condições. O presente trabalho teve por intuito reavaliar os resultados citados anteriormente a partir do uso de linhagens recombinantes de *Xanthomonas campestris pv. campestris* em que foi feita a clonagem e transformação dos genes *ugd* (que codifica a enzima UDPG-deH) e *galU* (UDPG-PP) tomando como base um vetor de amplo espectro de hospedeiros. Foram utilizados dois plasmídeos, cada um contendo um dos genes, com intuito de avaliar se a superexpressão destes colabora ou não para o aumento na produtividade da goma e observou-se que o uso de linhagens recombinantes, juntamente com os demais parâmetros do cultivo, podem promover o aumento da produtividade volumétrica de goma xantana pelas células de *Xanthomonas*.

Palavras-chave: biopolímeros; polissacarídeos; engenharia bioquímica; engenharia metabólica; *Xanthomonas campestris*.

ABSTRACT

Xanthan gum (XG) is a heteropolysaccharide synthesized by bacteria of the genus *Xanthomonas* through aerobic fermentation. The main characteristics of xanthan gum are its high viscosity, high pseudo-plasticity, great stability of its viscosity in a broad range of temperature and pH and it is compatible with salts. Such properties confer it several applications in food, cosmetics and petroleum industries, since the gum can be used as thickening, emulsifying and stabilizing agents. Nowadays, most of the water-soluble polysaccharides used in the industry come from vegetable sources, but, even though Brazil depends on its import, microbial polysaccharides proved to be of large commercial value. The development of processes for the gum synthesis has been oriented in the sense of optimizing factors such as operational conditions, growth media and technologies for recovering the intended composite – and an important part of this process is the development of new recombinant lineages that optimizes the gum production. In this context, Oliveira (2021) did the overexpression of the top enzymes targeted as bottlenecks on the synthesis pathway of XG, UDP-glucose dehydrogenase (UDPG-deH) and UDP-glucose pyrophosphorylase (UDPG-PP) in the lineages of *Xanthomonas campestris pv. campestris* and noticed a significant improvement on the production of xanthan when the enzymes are individually overexpressed and under certain conditions. The present work aims to re-evaluate the aforementioned results by using recombinant lineages of *Xanthomonas campestris pv. campestris* on which the *ugd* (which codifies the UDPG-deH enzyme) and *galU* (UDPG-PP) genes were cloned and transformed based on a broad-spectrum vector of hosts. Two plasmids, each containing one of the genes, were used in order to measure whether or not their overexpression contributes to an increase in gum productivity and it was observed that the use of recombinant lineages, along with further growth parameters, can promote the xanthan gum volumetric productivity through *Xanthomonas* cells.

Keywords: biopolymers; polysaccharides; biochemical engineering; metabolic engineering; *Xanthomonas campestris*.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
INTRODUÇÃO	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
<i>Xanthomonas campestris</i>	13
Goma xantana	15
Aplicações	16
Mercado	18
Via de síntese e otimização	19
METODOLOGIA	22
Meios de cultivo e preparo das células competentes	22
Vetor de expressão utilizado (pLAC2)	24
Extração, separação e purificação do DNA/plasmídeos	25
Transformação das células competentes	25
Cultivos	26
Produção e extração da goma xantana	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES E SUGESTÕES	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1:	Microscopia eletrônica de transmissão da <i>X. campestris</i>	14
Figura 2.2:	Estrutura da goma xantana produzida por <i>X. campestris</i>	15
Figura 2.2.1:	Aspecto da goma xantana comercializada industrialmente.....	16
Figura 2.3:	Custos e quantidades mensais relacionados à importação de goma xantana pelo Brasil.....	18
Figura 2.4:	Representação da síntese dos açúcares precursores.....	19
Figura 2.5:	Formação do biopolímero a partir dos açúcares precursores.....	20
Figura 3.5:	Exemplo de um erlenmeyer aletado utilizado.....	26
Figura 4.1:	Curva de crescimento de biomassa por tempo de cultivo pela equação que relaciona a massa seca (em g/L).....	29
Figura 4.2:	Crescimento médio de biomassa de XCC para cada linhagem recombinante, por tempo de cultivo.....	30
Figura 4.3:	Concentração de goma xantana (g/L) para diferentes linhagens de XCC.....	31
Figura 4.4:	Concentração média de goma xantana (g/L) para linhagens recombinantes de XCC.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1:	Composições do meio de cultura SYMP em g.L ⁻¹	23
Tabela 4.1:	Valores de produtividade volumétrica (Pr) de goma xantana para diferentes linhagens recombinantes.....	32
Tabela 4.2:	Valores médios de produtividade volumétrica (Pr) e concentração de goma xantana para linhagens recombinantes.....	32
Tabela 4.3:	Valores de produtividade específica (δp) de goma xantana para linhagens recombinantes.....	33
Tabela 4.4:	Comparativo de parâmetros estabelecidos e obtidos no presente estudo com dados disponíveis na literatura.....	34

1. INTRODUÇÃO

As *Xanthomonas* constituem um gênero de bactérias gram-negativas que são fitopatogênicas para algumas espécies de plantas. Durante o crescimento das bactérias desse gênero, e geralmente a partir do uso de glicose ou sacarose como fonte de carbono, as mesmas produzem o biopolímero conhecido como goma xantana (SOTINI, 2018).

A goma xantana (GX) é um heteropolissacarídeo hidrossolúvel. Dentre suas principais características, destacam-se a elevada viscosidade (agindo como viscosificante) mesmo a baixas concentrações; alto grau de pseudoplasticidade, propriedade característica de materiais nos quais a viscosidade diminui à medida que a tensão de cisalhamento (ou corte) aumenta; elevada estabilidade de viscosidade a alterações de temperatura, pH e concentração de sais e age como estabilizante em emulsões, suspensões e produtos espumosos. Dadas suas características, é amplamente utilizada em diversos setores da indústria, como a alimentícia, têxtil, de cosméticos, farmacêutica e petrolífera (WOICIECHOWSKI et al., 2000).

Ainda que, atualmente, grande parte dos polissacarídeos hidrossolúveis utilizados na indústria seja de origem vegetal, os biopolímeros de origem microbiana possuem grande importância econômica. No Brasil, por não haver produção nacional, a goma xantana utilizada industrialmente e em larga escala é exclusivamente importada de países como a China, França e Áustria. Ainda assim, o Brasil possui um bom potencial econômico para implantar em seu território indústrias de produção de goma xantana, pois possui em abundância matéria-prima básica para produção e recuperação da goma (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008).

Muitos grupos de pesquisa têm se empenhado em estudar diferentes maneiras de otimizar o processo da produção de goma xantana, com bons resultados ao longo dos anos. Os temas mais explorados pelos pesquisadores são as condições ótimas de cultivo, bem como o uso e reaproveitamento de matérias-primas com baixo valor agregado. Entretanto, no geral, o desenvolvimento de novas linhagens recombinantes de bactérias do gênero *Xanthomonas* como forma de melhorar o processo de produção da goma ainda é um tema pouco explorado por pesquisadores (OLIVEIRA, 2021).

Nesse contexto, Kundlatsch (2017) propôs um modelo determinístico que contém as reações intracelulares de síntese dos principais monômeros da GX e, utilizando as velocidades máximas de reação e dados disponíveis na literatura, apontou dois *bottlenecks* na biossíntese dos monômeros da goma: reações catalisadas pelas enzimas UDP-Glicose pirofosforilase (UDPG-PP), codificada pelo gene *galU* e UDP-Glicose desidrogenase (UDPG-deH), codificada pelo gene *ugd*.

A partir desses resultados, Oliveira (2021) validou as hipóteses citadas anteriormente realizando a superexpressão dos genes *galU* e *ugd* (individual e conjuntamente) em *Xanthomonas campestris pv. campestris*. Em seu trabalho, o autor conclui que os genes, quando superexpressos de forma individual, contribuem para um aumento na produtividade da goma xantana sob determinadas condições.

O presente trabalho propõe reavaliar os resultados obtidos anteriormente fazendo uso da linhagem *Xanthomonas campestris pv. campestris* (XCC). A construção de linhagens recombinantes de XCC contendo uma cópia extra dos genes *galU* e *ugd*, de forma individual, tem como principal objetivo a obtenção de uma linhagem mais eficiente, dadas as condições, no aspecto de produtividade da goma xantana.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Xanthomonas campestris*

A espécie *Xanthomonas campestris* (XC), do gênero *Xanthomonas*, é uma bactéria gram-negativa, estritamente aeróbica e pertencente à família *Xanthomonadaceae*. Possui morfologia de bastonetes retos e isolados, com 0,4–0,7 µm de largura e 0,7–1,8 µm de comprimento, móveis por flagelo único (1,7–3 µm de comprimento). São quimiorganotróficas e utilizam sais, ácidos orgânicos e carboidratos como fontes de carbono (ROTTAVA, 2005 apud GARCIA-OCHOA et al., 2000).

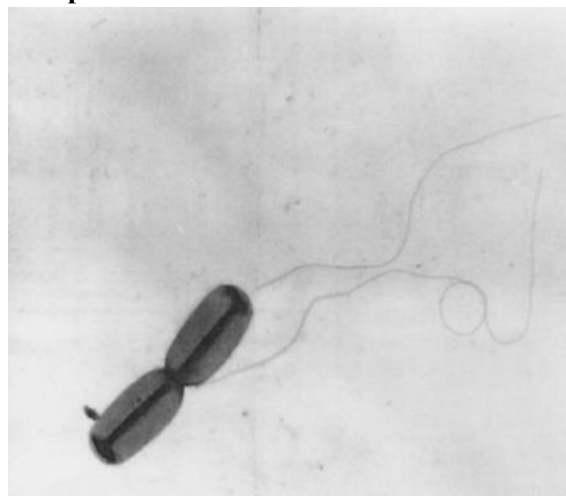
A maioria das espécies deste gênero de bactérias são fitopatogênicas, com exceção da *X. maltophilia*, que é patógena de humanos (HOLT, et al., 1994). No crescimento em meio sólido apresentam colônias geralmente lisas, viscosas e com coloração amarelada. A coloração amarelada característica deve-se à presença do pigmento xantomonadina, insolúvel em água e que confere o nome do gênero destas bactérias (do grego, *xanthos* = amarelo e *monas* = unidade) (TESSMANN, 2002).

X. campestris foi isolada pela primeira vez por Vers em 1940. À época, a propriedade de interesse era a capacidade de colônias dessa linhagem em formar soluções altamente viscosas. Os estudos consistiam na identificação de microrganismos que produzissem gomas de interesse comerciais e solúveis em água (MAURY; ROQUE, 1986).

A temperatura ótima de crescimento das bactérias deste gênero encontra-se entre 20 e 30 °C, com mínimo de 4 e máximo de 39 °C (GARCÍA-OCHOA, 2000; SADDLER; BRADBURY, 2015). Aconselha-se manter o pH do meio o mais próximo possível da neutralidade. O meio de cultura consiste geralmente em glicose, sacarose ou glicerol como fonte de carbono e extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, com a presença de fósforo e traços de outros minerais (MAUGERI, 2001).

Na Figura 2.1 tem-se a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da *X. campestris*.

Figura 2.1: Microscopia eletrônica de transmissão da *Xanthomonas campestris*



Fonte: García-Ochoa et al., 2000.

A respeito do cultivo das bactérias do gênero *Xanthomonas* na literatura, diversos estudos exploram diferentes fontes de carbono nos meios de cultivo. Existem estudos que utilizam substratos alternativos, geralmente resíduos de processos industriais ou agrícolas, sendo o caldo de cana-de-açúcar, batata, casca de coco, mandioca e soro de leite alguns exemplos de substratos fermentativos encontrados na literatura e que podem ser utilizados. O objetivo, ao se estudar meios alternativos, é de diminuir o impacto ambiental do descarte de efluentes na indústria, além de gerar um menor custo na cadeia produtiva (SILVA, 2017).

Os sais minerais e as fontes de nitrogênio também são essenciais para o crescimento celular da *X. campestris*. Sutherland (1982) destaca que uma alta concentração de nitrogênio é altamente necessária para o rápido crescimento das células, entretanto, quando a concentração de nitrogênio no meio de cultura é elevada, a goma xantana sintetizada possui propriedades reológicas inadequadas. Por outro lado, o autor destaca que os meios que contenham teor elevado de carbono e baixo teor de nitrogênio favorecem o acúmulo do polímero sintetizado.

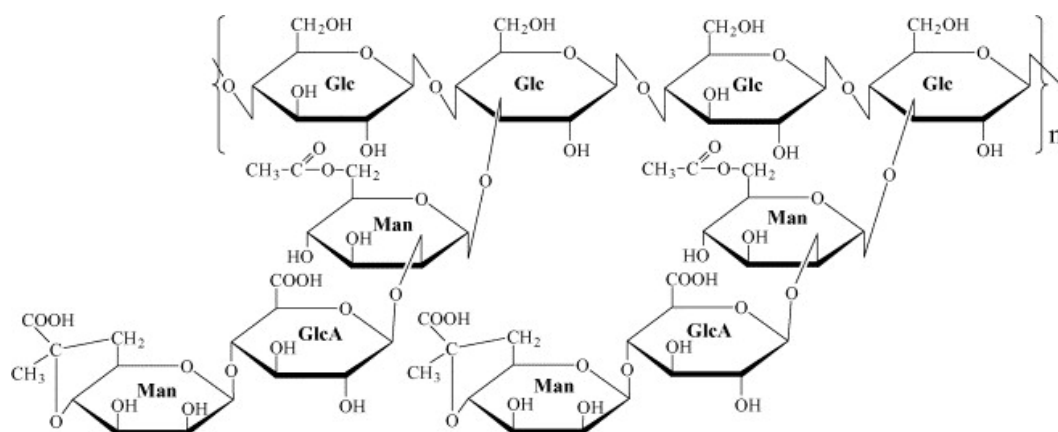
Além dos estudos que exploram condições ótimas operacionais e de cultivo, a criação de linhagens recombinantes que possam auxiliar na melhora da produtividade da GX tem se tornado objeto de interesse de estudos recentes. A modificação genética de linhagens pode levar ao aumento da produção, redução do tempo de fermentação e simplificação da etapa de recuperação e purificação da goma em sua biossíntese (BRANDÃO, 2012 apud ROSALAM; ENGLAND, 2006; MESOMO, 2007).

2.2 Goma xantana

Os biopolímeros de origem bacteriana dividem-se basicamente em três grupos: de parede celular, intracelulares e extracelulares, de acordo com sua localização morfológica. Grande parte das pesquisas visando aplicação industrial, de forma geral, está concentrada nos polissacarídeos extracelulares, já que apresentam uma alta produtividade e o processo de extração e purificação torna-se mais simples. Os exopolissacarídeos (EPSs), chamados também de glicanos, constituem compostos extracelulares e são encontrados em grande variedade de bactérias, viabilizando a vida livre destas, e viabilizando a aderência e colonização em superfícies sólidas onde nutrientes se acumulam (COSTERTON et al., 1987).

A xantana é um EPS complexo, aniônico, formado por heteropolissacarídeos extracelulares constituídos por unidades básicas de D-manopirranose, D-glicopirranose e ácido D-glicurônico, na proporção molar de 3,0: 2,8: 2,0 (Figura 2.2). Além de grupos acetila e de ácido pirúvico, sendo estes ligados às cadeias de D-glicose através de ligações acetálicas (FERREIRA et al., 2009).

Figura 2.2: Estrutura da goma xantana produzida por *Xanthomonas campestris*.



Fonte: Qian et al., 2006.

A composição dos substratos acetil e pirúvil, bem como a massa molecular podem variar a depender do tipo de cepa, das condições de cultivo, disponibilidade de oxigênio e de mutações genéticas. Seu peso molecular encontra-se na faixa de 500 a 2000 quilodaltons (kDa) (SILVA, 2017 apud DEY et al., 2014; DONOT et al., 2012; SWORN, 2011).

O arranjo e estrutura química de um biopolímero — e os grupos substituintes que este possui — tem influência direta em suas características reológicas e, conseqüentemente, nas suas eventuais aplicações (PACE, 1991).

A GX apresenta uma elevada pseudoplasticidade, o que significa que sua viscosidade diminui na medida em que aumenta a tensão de cisalhamento do fluido por conta do alinhamento parcial das macromoléculas na direção do fluxo de cisalhamento e da desarticulação da rede de polímero. Outra característica reológica observada é a tixotropia, isto é, a goma recupera de forma rápida, mas não completamente, a viscosidade do fluido quando se encerra o cisalhamento. É atóxica e apresenta uma excelente estabilidade para diferentes valores de pH. Além disso, sua solubilidade em água é estável para amplas faixas de temperatura e é compatível com a maioria dos sais metálicos (GOMES, 2014 apud KI-WON; YONG-SEOK; GAP-SHIK, 2006).

2.2.1 Aplicações

A utilização da GX na indústria de alimentos é autorizada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos desde o ano de 1969. Desde então, o setor é o que mais consome e faz uso da xantana. Lima et al. (2001) citam que, no Brasil, a adição da goma em alimentos é permitida como espessante e estabilizante desde 1965 por meio do Decreto nº 55.871 de 26 de março da Legislação Brasileira de Alimentos.

Figura 2.2.1: Aspecto da goma xantana comercializada industrialmente



Fonte: Mercado Livre, 2022.

Atualmente, a utilização da GX é regulamentada pela Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) de nº 45 de 03 de novembro de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação, e suas classes funcionais estão caracterizadas na própria RDC, sendo elas: espessante, estabilizante, emulsificante e espumante (ANVISA, 2010).

Na indústria de alimentos, o uso de goma xantana possui um vasto campo de aplicação em razão da compatibilidade do biopolímero com muitos ingredientes alimentares, não alimentares e aditivos, e, também, por ser atóxico. É amplamente utilizada como espessante devido ao poder estabilizante observado em grande faixa de pH e temperatura. As aplicações da goma xantana na indústria alimentícia incluem fabricação de geleias, cremes, substituição da clara de ovos, molhos para salada, produtos cárneos, enlatados, confeitos e sopas, segundo Wankenne (2015). No setor têxtil, utiliza-se a xantana em processos de estampagem para obtenção de um maior controle na migração da cor, com mais nitidez, agindo como agente de suspensão e espessante. Em atividades agrícolas, a GX é empregada como agente de suspensão de agrotóxicos das mais diversas classes, controlando a dispersão de produtos que são pulverizados. No processo de fabricação de cerâmicas, é empregada como agente ligante, sendo utilizada na etapa de desmontagem das peças. Quando adicionada a tintas e adesivos, o exopolissacarídeo desenvolve poder de aderência (ALVES, 1991; SOUZA, 2012; WHISTLER, 1993).

Na indústria farmacêutica é utilizada em formulações de cremes, xaropes e emulsões, sendo adicionada com intuito de espessar e estabilizar os produtos. Outra aplicação da GX nesse setor é como sistema matricial para controlar a liberação de fármacos. Pode ou não ser associada a outros polímeros a depender da consistência da matriz que se almeja atingir (GOMES, 2014).

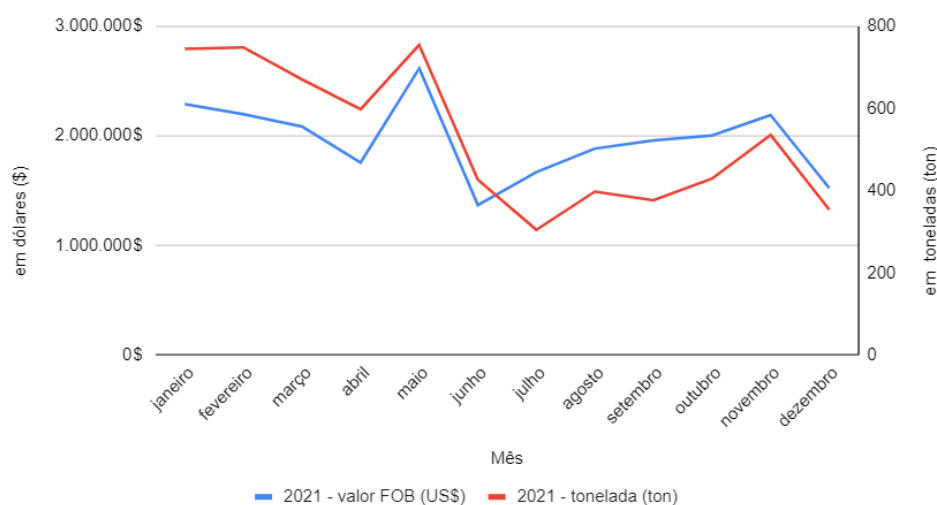
No processo de perfuração de poços de petróleo, utilizam-se suspensões aquosas com argila e materiais coloidais, as chamadas lamas de perfuração, que são utilizadas para contrabalançar a pressão do óleo ascendente e também para a lubrificação de brocas. A lama deve ter características pseudoplásticas e lubrificantes, e muitas formulações de lama incluem a goma xantana como agente espessante nas suspensões aquosas. Outra aplicação da GX no setor petrolífero é seu uso na recuperação avançada ou terciária de petróleo, por apresentar resistência à degradação por temperatura, ter boa compatibilidade com sais e por não estar sujeita à degradação de cisalhamento (ALVES, 1991; MENEZES et al., 2012).

2.2.2 Mercado

A goma xantana utilizada em larga escala no Brasil não é produzida nacionalmente, o que torna o país dependente de importações. A produção nacional de GX é considerada incipiente e um dos fatores que colaboram para tal fato é a baixa produção nacional de propriedade intelectual sobre o processo de produção. Na última década, houve apenas 12 patentes inscritas e depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Apesar desse fato, o país possui um bom potencial para implantação da indústria de produção da GX, pois a matéria-prima básica para produção e recuperação da goma existe em abundância, tal como a sacarose como substrato de fermentação e o álcool do setor sucroalcooleiro para recuperação do biopolímero. Em contrapartida, para outros países, a escassez e alto custo das matérias-primas representam fatores críticos no aspecto comercial da produção do biopolímero (BORGES; VENDRUSCOLO, 2008).

De acordo com os dados obtidos do Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior (COMEXSTAT), o Brasil importou pouco mais de 6300 toneladas de goma xantana no ano de 2021, e somando os gastos com importação pelo país, o valor totaliza pouco mais de 23.5 milhões de dólares (ver Figura 2.3). Os principais países fornecedores de xantana para o Brasil são a China, França, Áustria e Estados Unidos. Apesar de não haver produção nacional em larga escala, o país exporta GX em poucas quantidades para demais países da América Latina, como Argentina, Paraguai, Colômbia e Chile (COMEXSTAT, 2022).

Figura 2.3: Custos e quantidades relacionados à importação de goma xantana pelo Brasil

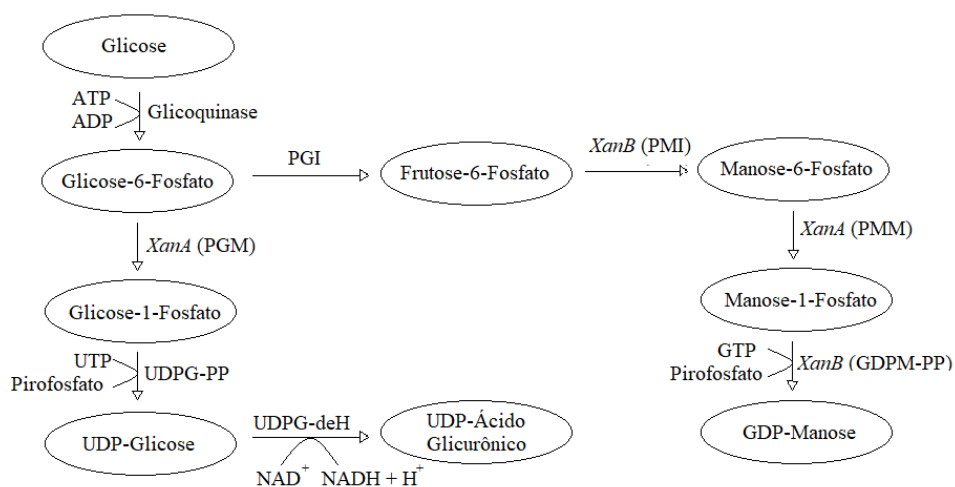


Fonte: COMEX STAT, 2022.

2.2.3 Via de síntese e otimização

A síntese da goma xantana durante a fermentação aeróbica pode ser dividida em duas partes: síntese dos açúcares precursores (Figura 2.4) e formação do polímero a partir dos açúcares precursores (Figura 2.5). A GDP-Manose, UDP-Glicose e UDP-Ácido Glicurônico são os três açúcares utilizados na síntese da GX e são produzidos a partir da Glicose-6-Fosfato através de reações catalisadas por cinco enzimas, sendo duas destas codificadas pelos genes *xanA* e *xanB* transcritos em conjunto (KUNDLATSCH, 2017 apud BECKER et al. 1998; KÖPLIN et al., 1992).

Figura 2.4: Representação da síntese dos açúcares precursores. PGI: Fosfoglicose isomerase; PMI: Fosfomanose isomerase; PMM: Fosfomanose mutase; GDPM-PP: GDP-Manose pirofosforilase; PGM: Fosfoglicose mutase; UDPG-PP: UDP-Glicose pirofosforilase; UDPG-deH: UDP-Glicose desidrogenase. Os cofatores UTP, GTP e NAD^+ são necessários.

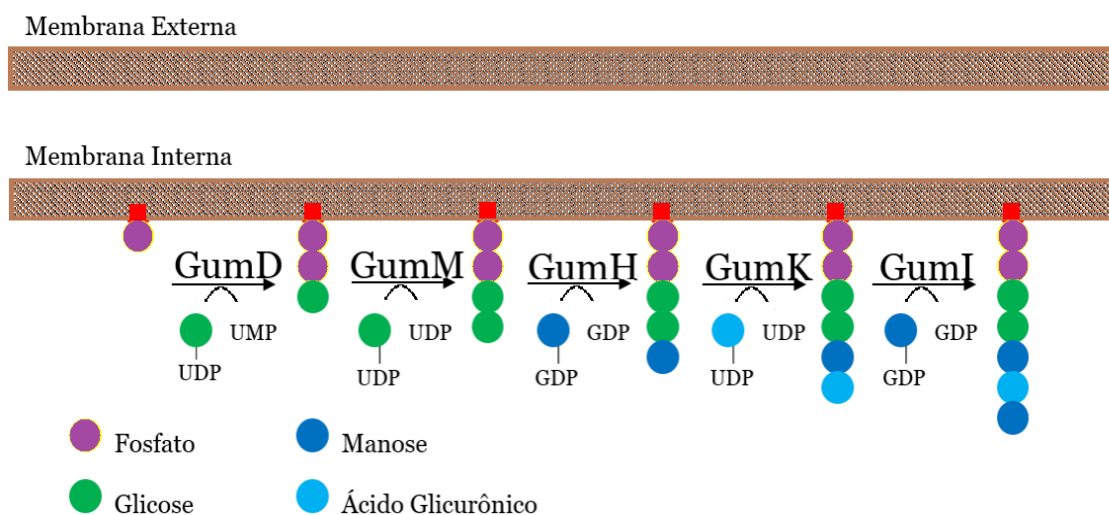


Fonte: Kundlatsch, 2017.

Ao contrário de outros organismos que sintetizam polissacarídeos, os genes que codificam as enzimas responsáveis pela produção dos precursores não se encontram na mesma região dos genes *gum*, responsáveis pela polimerização e secreção da goma (HARDING et al., 1987). A formação dos polímeros é iniciada quando há transferência dos açúcares para a membrana portadora de fosfato poliprenol, um carreador lipídico. O primeiro passo na síntese é catalisado por uma glicosiltransferase, codificada pelo gene *gumD* e

responsável pela transferência da glicose-1-fosfato até o fosfato poliprenol presente na membrana para formar o monossacarídeo-lipídeo. Os genes *gum* são agrupados em um *operon* formado por um *cluster* de 16kb contendo no total 12 genes, sendo eles *gumB–M*. Em seguida, o gene *gumM* codifica a enzima glicosiltransferase II que catalisa a segunda adição de glicose para formar o dissacarídeo-lipídeo; *gumH* é responsável por codificar a enzima glicosiltransferase III que catalisa a adição da primeira manose, gerando o trissacarídeo-lipídeo; *gumK* irá codificar a enzima glicosiltransferase IV que catalisa a adição do ácido glicurônico na formação do tetrassacarídeo-lipídeo; finalmente, *gumI* codifica a glicosiltransferase V que catalisa a adição da segunda molécula de manose. A unidade repetida recém-formada é movida através da membrana citoplasmática para o lado externo da célula por um transportador de unidade repetida, ou flipase (VORHÖLTER et al., 2008). A Figura 2.5 a seguir ilustra de forma simplificada as principais etapas da formação do biopolímero a partir de seus açúcares precursores:

Figura 2.5: Formação do biopolímero a partir dos açúcares precursores. As demais enzimas GumF, GumG e GumL, responsáveis pela adição dos grupos acetil e piruvil, bem como as enzimas GumB, GumC, GumE e GumJ, responsáveis pela polimerização e secreção não constam na representação abaixo.



Fonte: Kundlatsch (2017).

Nos últimos anos, com a utilização de ferramentas da engenharia genética e biologia molecular, muitos estudos contribuíram no sentido de apontar eventuais rotas para melhoria de linhagens produtoras e otimização do processo de biossíntese com alta no rendimento ao final do processo.

O trabalho de Kundlatsch (2017) por exemplo, interessado no estudo da otimização do processo de produção da GX através do desenvolvimento de linhagens recombinantes, reuniu dados experimentais disponíveis na literatura para criar um modelo determinístico, até então inexistente, em que fez-se uso da linguagem de programação Python 2.6.6, de código aberto, com intuito de determinar quais os *bottlenecks*, ou gargalos presentes na biossíntese do polímero. O autor apontou qual dos açúcares precursores seria o primeiro a ser consumido totalmente no caso das reações operarem em velocidade máxima, chegando a conclusão que o UDP-Ácido glicurônico é o reagente limitante em questão, tendo, portanto, a enzima UDPG-deH (codificada pelo gene *ugd*) como sendo um dos gargalos na via de produção da GX. Outro aspecto considerado foi o acúmulo de intermediários durante a síntese e o autor apontou que a velocidade da reação catalisada por UDPG-PP não permite que a atividade da enzima XanA opere em velocidade máxima. Chegou-se à conclusão que o segundo gargalo na via de síntese da goma seria a enzima UDPG-PP, codificada pelo gene *galU*.

Dando continuidade a essa linha de pesquisa, em seu trabalho, Oliveira (2021) clonou e realizou a superexpressão dos genes que codificam as enzimas UDPG-PP e UDPG-deH em *Xanthomonas campestris pv. campestris* e obteve como resultado que os genes quando são superexpressos de forma individual geram melhores resultados na produtividade, se comparados com a linhagem natural não transformada. Porém, ao expressar os genes em conjunto na configuração *operon*, com a enzima UDPG-PP à frente da enzima UDPG-deH, o autor não observou melhora significativa na produtividade de GX.

Faz-se necessário, portanto, aprofundar os estudos acerca das demais espécies de *Xanthomonas* e dos outros genes e enzimas que fazem parte da biossíntese, de maneira a aperfeiçoar o modelo determinístico existente e realizar modificações pontuais para controlar características reológicas da goma. Futuros trabalhos que explorem as demais configurações (*pseudo-operon* e monocistrônico) na construção dos vetores de expressão também são interessantes do ponto de vista acadêmico.

3. METODOLOGIA

3.1 Meios de cultivo e preparo das células competentes

No presente trabalho, fez-se uso de bactérias da espécie *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC® 33913™ para avaliar a produtividade de goma xantana e comparar os valores obtidos com diferentes literaturas. A linhagem de XCC, já transformada com os genes de interesse, é parte do acervo do Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC) da Universidade Federal de São Carlos. Os procedimentos que tratam da etapa de transformação encontram-se descritos posteriormente na Seção 3.4. O cultivo das células, antes da transformação, é realizado em meio *Luria-Bertani* (LB) e placas de Petri contendo LB Ágar para crescimento de colônias isoladas. O meio LB é composto por triptona 10 g.L⁻¹, extrato de levedura 5 g.L⁻¹ e cloreto de sódio 5 g.L⁻¹. Para LB Ágar, adiciona-se 15 g.L⁻¹ de ágar bacteriológico na composição do meio.

No preparo das células eletrocompetentes de *Xanthomonas*, foi seguido o protocolo descrito por Wang et al. (2016), utilizando uma solução 250 mM de sacarose. Inoculou-se em 10 mL de LB (em tubo tipo Falcon de 50 mL) uma colônia isolada, com cultivo sendo conduzido a uma temperatura próxima de 30 °C e 200 rpm. O tempo de cultivo em placa é de aproximadamente 48 horas, enquanto que o pré-inóculo é deixado em cultivo *overnight*.

A cultura foi então distribuída igualmente em quatro tubos Falcon de 15 mL e centrifugada a 10000 xg durante cinco minutos em temperatura ambiente. Os pellets foram ressuspendidos em 1 mL de solução de sacarose e transferiu-se o conteúdo para eppendorfs de 1,5 mL devidamente esterilizados. Foram realizadas sucessivas centrifugações e ressuspensões em 1mL de solução de sacarose ao total de três vezes a 12000 xg em temperatura ambiente por dois minutos e descartando o sobrenadante ao final de cada centrifugação.

Por último, no final da terceira centrifugação, os *pellets* contidos nos *eppendorfs* foram ressuspendidos em 100 µL de solução de sacarose, sendo transferidos para um único *eppendorf* contendo as células concentradas. O volume foi aliqotado em 50 µL em dois *eppendorfs* e armazenado a -80 °C.

Ao final desse procedimento, as células estão prontas para receber o plasmídeo de interesse a partir do processo de transformação, no caso do presente trabalho, por eletroporação (ver Seção 3.4).

Para a cultura em frascos, ou inóculo, fez-se uso do meio de cultura adaptado, SYMP, formulado por Oliveira (2021) a partir do estudo e avaliação dos componentes usualmente utilizados no cultivo de *Xanthomonas*. Os componentes e composição do meio SYMP, tanto para o pré-inóculo como para o frasco estão descritos na Tabela 3.1 a seguir:

Tabela 3.1: Composições do meio de cultura SYMP (pré-inóculo e frasco) em g.L⁻¹

Componentes (g.L ⁻¹)	Pré-inóculo	Frasco
Sacarose	20	35
Extrato de levedura	3	4
Extrato de malte	3	4
Peptona	3	4
K ₂ HPO ₄	-	5,27
KH ₂ PO ₄	-	2,81
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	-	2
NaCl	-	1
Uréia	0,4	0,4
FeSO ₄	-	0,002

Fonte: Adaptado de Oliveira (2021).

Os meios de cultura e soluções utilizadas foram autoclavados a 121 °C durante 15-20 minutos. Especificamente referente ao meio SYMP e no preparo da solução tipo “Frasco”, fez-se a esterilização a partir de duas soluções distintas (denominadas parte A e parte B) com intuito de evitar a formação de produtos insolúveis durante a autoclavagem.

A parte A, que compreende 65% do volume total, contém as fontes de carbono e nitrogênio, magnésio e ureia e os demais 35% da solução, a parte B, contém os fosfatos e o cloreto de sódio. As partes A e B que compreendem o meio SYMP-Frasco foram posteriormente misturadas em capela de fluxo laminar. No cultivo das linhagens recombinantes, os meios (sólido e líquido) possuem antibiótico específico adicionado no momento da inoculação (ver Seção 3.2).

3.2 Vetor de expressão utilizado: pLAC2

Oliveira (2021) testou uma série de plasmídeos para codificar e replicar, de forma independente, os genes *galU* e *ugd* em *Xanthomonas*, e o pLAC2, um vetor de amplo espectro de hospedeiros, mostrou-se eficaz como vetor de expressão em XCC. O autor observou que as células foram capazes de manter a presença do vetor em seu interior após a etapa de transformação, diferente de outros plasmídeos testados, fato este que possibilitou a detecção das colônias positivas por métodos de *screening*. O marcador seletivo do pLAC2 é a gentamicina e o antibiótico foi utilizado na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio sólido e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio líquido.

O plasmídeo pLAC2 tem como base o promotor induzido por arabinose da série *pBAD vectors*. O promotor pBAD faz parte do *operon ara* da bactéria *Escherichia coli*, e é responsável pela utilização do açúcar L-arabinose como indutor para expressão dos genes em seu promotor. Além disso, o monossacarídeo também é utilizado como fonte de carbono para demais vias metabólicas da célula (OLIVEIRA, 2021 apud LACERDA et al., 2017). As induções com L-arabinose ocorreram na fase de cultivo a ser descrita na Seção 3.5.

3.3 Extração, separação e purificação do DNA/plasmídeos

Para extrair os plasmídeos de suas respectivas células hospedeiras, fez-se uso do kit *Wizard® Plus SV minipreps DNA purification system* (Promega®), de acordo com o protocolo presente no kit para lise celular, lavagem de contaminantes e eluição dos plasmídeos em água para biologia molecular (*Sigma Aldrich®*), sendo conduzidas a temperatura próxima de 50 °C, em colunas de filtração, com todas as etapas realizadas em centrífuga (Centrífuga *HERMLE® Z 216 MK*).

A separação das moléculas foi feita por meio de eletroforese em gel de agarose 1% por cerca de 30-45 minutos com voltagem dentro da faixa de 70-90 V e marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* da empresa Thermo Fisher®, ou ainda, o *1kb Plus DNA Ladder* da empresa Cellco®.

A purificação foi feita a partir do uso do kit *Wizard® SV gel and PCR clean-up system* (Promega®), que possibilita a obtenção do DNA de interesse a partir da sua banda no gel. O protocolo de purificação é descrito no próprio kit e, assim como no protocolo de extração, utilizam-se colunas de filtração no processo de lavagem e eluição (*H₂O Biomol Sigma Aldrich®*) a 50 °C através de centrifugações em temperatura ambiente. A concentração para cada amostra de DNA é obtida a partir de um espectrofotômetro (*Nanodrop 2000*, Thermo Scientific®), a partir da leitura de 1 µL de cada amostra. O equipamento é calibrado com 1 µL de água livre de nucleases e é utilizado o software *Nanodrop 2000* para leitura da concentração (em ng/µL). Em seguida, as amostras são armazenadas a -20 °C em *freezer*.

3.4 Transformação das células competentes

O procedimento para transformação das células de *Xanthomonas* baseou-se no protocolo descrito por WANG et al. (2016) e GOTO et al. (2016). A partir de 1 *ependorff* contendo uma solução de volume total de 50 µL que contém as células competentes (preparo descrito na seção 3.1), descongeladas e com cerca de 100-200 ng de DNA, adicionou-se não mais que 10 µL desta solução e, com auxílio de cubetas para eletroporação, com gap de 0,1 cm e em gelo, misturou-se a solução contendo as células eletrocompetentes e os plasmídeos de interesse em um eletroporador *BIO-RAD® Gene-Pulser Xcell*. A função do eletroporador utilizada é "*Exponential Protocol*" e o pulso dado é de 15 kV/cm, resistência de 200 Ω e capacitância próxima de 25 µF.

O pulso no eletroporador é feito quase que instantaneamente após misturar os plasmídeos com as células competentes. Posteriormente, adiciona-se 1 mL de meio LB na cubeta de eletroporação e a solução é misturada de forma sutil até que o conteúdo das cubetas é finalmente transferido para um *ependorf* de 1,5 mL devidamente esterilizado. Ao final do procedimento as células recém transformadas são incubadas à temperatura de 28 °C em *shaker* agitado a 200 rpm durante 2 horas. Passado o tempo programado, foram plaqueados 100 µL da solução contendo as células transformadas em LB Ágar com gentamicina.

3.5 Cultivos

Num primeiro momento, os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer aletados com capacidade de 1 L, em triplicata, para cada uma das células de *Xanthomonas campestris pv. campestris* transformadas. Em cada frasco, acrescentou-se 95 mL de meio SYMP-Frasco, inoculados com 5 mL de um pré-inóculo de células cultivadas *overnight* com meio SYMP-Pré-inóculo e antibiótico marcador de resistência (gentamicina).

Nessa etapa, é importante que o crescimento celular esteja na fase exponencial, que pode ser observada através da estimativa da densidade óptica (DO) pela leitura da absorbância a 600 nm. A absorbância observada deve estar próxima de 1,0 e para o padrão branco do espectrofotômetro (*UV-Visible Spectrophotometer Ultrospec® 2100 pro*), utiliza-se não mais do que 1 mL de SYMP-Pré-inóculo em cubetas de vidro para leitura da DO. A leitura das amostras é feita a partir da diluição em cinco vezes no respectivo meio SYMP.

Figura 3.5: Exemplo de um erlenmeyer aletado utilizado. Foto tirada após a autoclavagem.



Fonte: Autor.

As induções com L-arabinose são feitas após cerca de 12 horas de cultivo em frasco, período em que a medida da DO em comprimento de onda de 600 nm é próxima de 5,0. A concentração de indutor utilizada é de 0,005 % (m/v). Para obtenção e construção da curva de crescimento de biomassa, foram coletadas amostras de 5 mL do cultivo, diluindo esse conteúdo oito vezes em solução salina 0,9 % (m/v). Em seguida, a centrifugação da amostra é feita com solução salina a 16000 xg por 12 minutos e 4 °C. O sobrenadante é separado para análise posterior da produção de goma xantana e as células são lavadas outras duas vezes em solução salina 0,9 %. Após a segunda lavagem, faz-se a ressuspensão celular da solução e a leitura da DO é conduzida no mesmo espectrofotômetro utilizado anteriormente. Os pontos para construção da curva são coletados em períodos de tempo aproximadamente iguais.

A curva de crescimento da biomassa de *Xanthomonas* é construída a partir do método citado (de densidade óptica) e, também, a partir da equação da reta obtida por Oliveira (2021), em que o autor correlaciona os dados de densidade óptica e massa seca de biomassa (Equação 3.1 a seguir).

$$\text{massa seca (em g/L)} = 0,4686 \cdot \mathbf{D.O} \quad (3.1)$$

Onde a massa seca corresponde a biomassa de *Xanthomonas campestris pv. campestris* em g/L e a $D.O_{600nm}$ corresponde a absorvância lida em espectrofotômetro a 600 nm. O cultivo é conduzido a 29 °C e 230 rpm por cerca de 40-45 horas com a coleta de nove pontos espaçados de forma homogênea. A extração e quantificação da goma produzida ao longo dos cultivos é descrita na Seção 3.6 a seguir.

3.6 Produção e extração da goma xantana

A concentração da GX produzida ao longo dos cultivos é estimada pelo método gravimétrico, um método analítico quantitativo. O procedimento a ser descrito é citado por Oliveira (2021) e adaptado de Subhash et al. (2015) e Savvides et al. (2012).

O sobrenadante obtido a partir da centrifugação para separação das células, descrito anteriormente, não é descartado e recebe a adição de um álcool, o isopropanol P.A. 99 % em proporções de 2:1 ou 5:1 (álcool:sobrenadante), com intuito de precipitar a goma presente na

solução. Tal proporção, na medida em que a viscosidade da goma aumenta, é alterada juntamente com o volume da amostra coletada, que passa a ser menor (cerca de 2 mL). A mistura é levada por 20 min ao *freezer* com temperatura de aproximadamente -20 °C.

A separação da goma é feita após esse período através da centrifugação a 16000 xg por 15 minutos a 4 °C. Por último, o sobrenadante é devidamente descartado e a goma precipitada passa por secagem em estufa a 50 °C por cerca de 72 horas.

A massa de GX produzida é estimada em balança analítica (*Bel Engineering*®) através da aferição da massa total após a secagem (recipiente e goma) subtraindo o valor do recipiente vazio. Em um processo industrial, após a etapa de secagem, a goma xantana produzida passaria ainda por um processo de refino, que inclui a moagem. A partir da massa obtida, estimou-se a concentração da goma *versus* tempo para os cultivos em triplicata.

A produtividade volumétrica (P_r) é estimada pela concentração de produto produzido por hora de cultivo e reflete a eficiência do cultivo como um todo. É dada pela Equação 3.2 a seguir:

$$P_r = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P - P_0}{t - t_0} \quad (3.2)$$

Em que P e P_0 correspondem à concentração inicial e final, respectivamente, em g/L. Outro importante fator avaliado neste trabalho foi a produtividade específica (δ_p) para cada linhagem recombinante utilizada. A produtividade específica é um parâmetro de produção de GX por biomassa de células por hora do cultivo (Equação 3.3), que possibilita a verificação da efetividade da produção celular da goma, por grama de biomassa celular e com relação ao tempo de cultivo. Assim sendo, ao avaliar a produtividade específica conjuntamente com os valores de produtividade volumétrica, pode-se checar se os ganhos em produtividade do processo como um todo também correspondem às células mais produtivas entre as linhagens recombinantes.

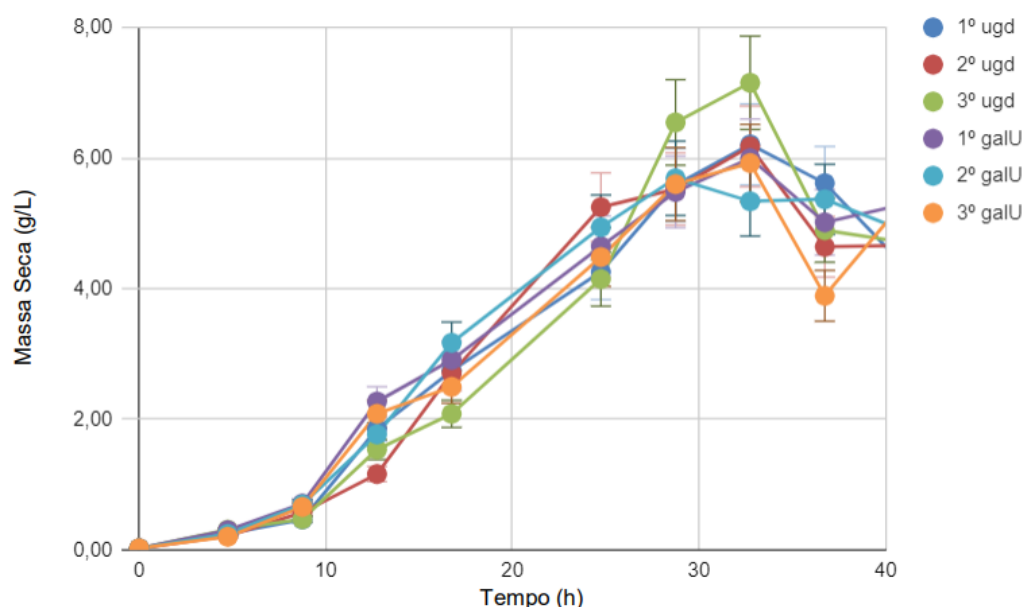
$$\delta_p = \frac{P_r}{\Delta x} \quad (3.3)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gráfico apresentado na Figura 4.1 mostra o resultado do crescimento de biomassa de *Xanthomonas campestris pv. campestris* (XCC) pelo método da massa seca (em g/L) para cada umas linhagens utilizadas com os genes *ugd* e *galU* amplificados individualmente e em triplicata. A medida de crescimento é feita pela densidade óptica para possibilitar a indução com L-arabinose 0,005 % (m/v) no tempo necessário para a DO atingir cerca de 5,0 (após aproximadamente 12 horas de cultivo). A temperatura média do cultivo foi de 29 °C com 230 rpm de velocidade de agitação.

Por meio da Equação 3.1 obtida por Oliveira (2021), os valores de biomassa de XCC para cada cultivo foram estimados através da relação obtida pelo autor em que **massa seca** (g/L) = 0,4686***DO**_{600 nm}. A curva de crescimento da massa seca, por tempo de cultivo, dado em horas, é mostrada na Figura 4.1, com seus respectivos valores de desvio padrão:

Figura 4.1: Curva de crescimento de biomassa por tempo de cultivo pela equação que relaciona a massa seca (em g/L) com densidade óptica a 600 nm

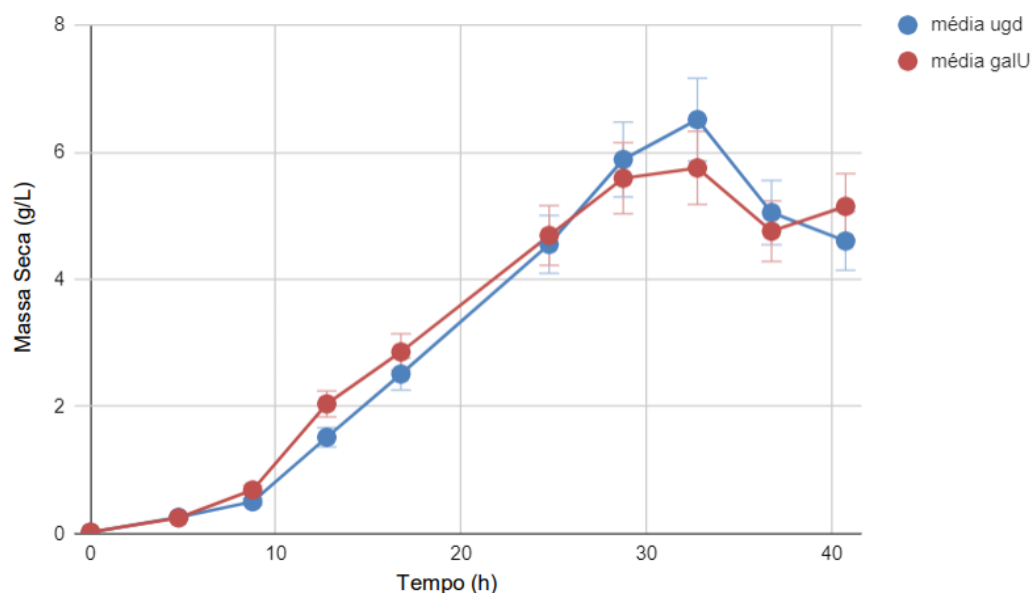


Fonte: Autor.

A partir do gráfico construído, observa-se logo no início do cultivo que as curvas de crescimento se entrelaçam, independente da linhagem, e que o crescimento celular apresenta perfis similares para ambas linhagens de XCC utilizadas. A maior concentração de células de *Xanthomonas campestris pv. campestris* foi observada na linhagem com o gene *ugd* amplificado (nº 3), com pico de 7,15 g/L de concentração, em massa seca por L de cultivo.

Expressando os resultados médios para cada linhagem de forma individual, com seu respectivo desvio padrão, foi construído o gráfico apresentado na Figura 4.2 a seguir:

Figura 4.2: Crescimento médio de biomassa de XCC para cada linhagem recombinante, por tempo de cultivo

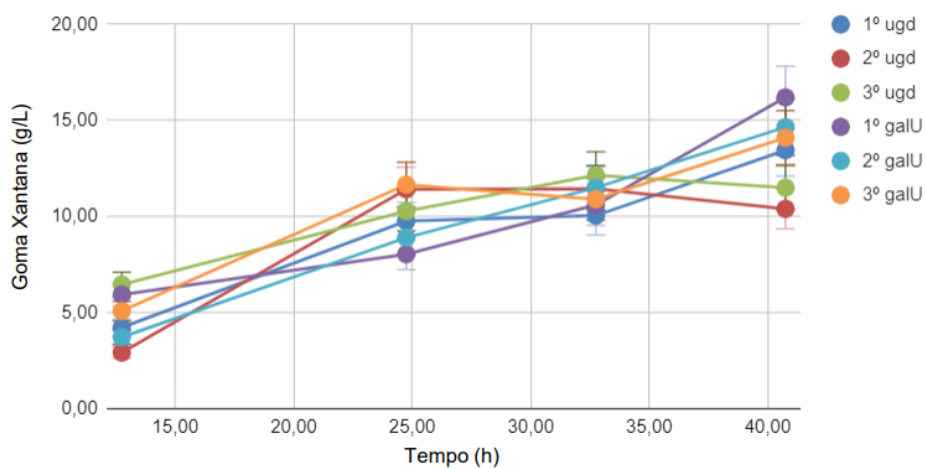


Fonte: Autor.

É possível observar que ora a curva de crescimento médio indica um valor absoluto de biomassa (de massa seca, em g/L) superior pela linhagem contendo cópia adicional do gene *galU*, ora o valor de concentração de massa seca para a linhagem contendo o gene *ugd* amplificado possui concentração de células maior. Portanto, apenas com essas informações, não é possível fazer qualquer afirmação de qual linhagem transformada apresenta maior crescimento celular.

A curva da concentração de goma xantana (em g/L) para cada cultivo *versus* tempo é apresentada a seguir na Figura 4.3 abaixo. Após o momento da indução com L-arabinose, coletou-se quatro amostras, no total, para cada linhagem em triplicata até o fim do cultivo, que durou pouco mais de 40 horas.

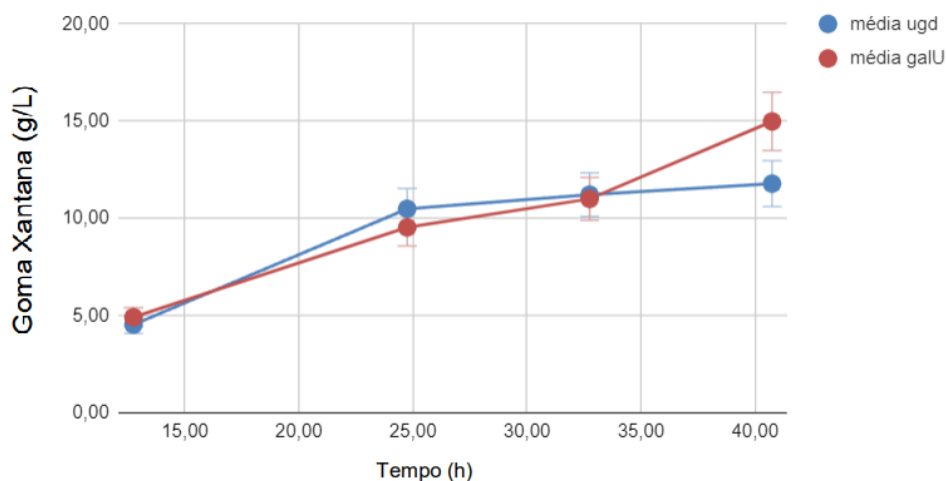
Figura 4.3: Concentração de goma xantana (g/L) para diferentes linhagens de *Xanthomonas campestris pv. campestris*



Fonte: Autor.

Analogamente ao que foi feito para a concentração de biomassa por tempo de cultivo, construiu-se também um gráfico contendo os valores médios de concentração de GX para cada linhagem recombinante utilizada e o resultado está representado na Figura 4.4 a seguir:

Figura 4.4: Concentração média de goma xantana (g/L) para linhagens recombinantes de XCC



Fonte: Autor

Ao final do cultivo e a partir da análise do gráfico contido na Figura 4.4, a maior concentração de goma foi observada na linhagem contendo o gene *galU* amplificado, que codifica a enzima UDPG-PP. Apesar desse fato, não é possível afirmar que a linhagem citada é de fato mais produtiva do que com o gene *ugd* amplificado, uma vez que não foi realizado o cultivo com as células não transformadas, por exemplo, e seria necessário repetir, nas mesmas condições, o cultivo por mais vezes.

A produtividade volumétrica, P_r , definida pela quantidade de produto produzido por hora de cultivo é calculada para cada linhagem transformada e seus valores encontram-se na Tabela 4.1 abaixo:

Tabela 4.1: Valores de produtividade volumétrica (P_r) de goma xantana para linhagens recombinantes na concentração de 0,005 % de indutor L-arabinose

	1° <i>ugd</i>	2° <i>ugd</i>	3° <i>ugd</i>	1° <i>galU</i>	2° <i>galU</i>	3° <i>galU</i>
P_r (gP.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,329± 0,075	0,267± 0,075	0,180± 0,075	0,366± 0,035	0,390± 0,035	0,322± 0,035

Fonte: Autor.

Os dados contendo as concentrações médias finais de goma xantana e o valor ponderado de produtividade volumétrica para cada cultivo estão apresentados na Tabela 4.2 a seguir:

Tabela 4.2: Valores médios de produtividade volumétrica (P_r) e concentração de goma xantana para linhagens recombinantes na concentração de 0,005% de indutor L-arabinose.

	<i>ugd</i>	<i>galU</i>
Concentração média de produto final (gP.L ⁻¹)	11,78 ± 1,54	14,98 ± 1,08
Produtividade volumétrica média (gP.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,259 ± 0,075	0,360 ± 0,035

Fonte: Autor.

A maior produtividade volumétrica obtida no presente trabalho foi observada no terceiro cultivo para a linhagem recombinante de *Xanthomonas campestris pv. campestris* contendo o gene *galU* amplificado, XCC_pLACR1_pp, linhagem esta que possui em média, um valor absoluto de P_r maior quando comparada a linhagem contendo uma cópia adicional do gene *ugd* (UDPG-deH). Da mesma forma, a linhagem citada apresentou um valor de concentração final de goma superior à linhagem contendo o gene *ugd* amplificado. Apesar disso, não é possível afirmar com base apenas nessas informações que o cultivo seja mais produtivo com a linhagem recombinante em questão, pois se faz necessário uma análise estatística mais aprofundada, além de ser preciso repetir os cultivos nas mesmas condições operacionais por mais vezes.

A produtividade específica, δ_p , foi estimada para cada cultivo com seus respectivos valores ponderados apresentados na Tabela 4.3:

Tabela 4.3: Valores de produtividade específica (δ_p) de goma xantana para linhagens recombinantes

	1° <i>ugd</i>	2° <i>ugd</i>	3° <i>ugd</i>	1° <i>galU</i>	2° <i>galU</i>	3° <i>galU</i>
δ_p (gP.L ⁻¹ .gX ⁻¹ .h ⁻¹)	0,128 ± 0,037	0,076 ± 0,037	0,056 ± 0,037	0,122 ± 0,018	0,124 ± 0,018	0,102 ± 0,018
Média:	0,0870			0,116		

Fonte: Autor

Pela Tabela 4.3, nota-se que a maior produtividade específica (em gP.L⁻¹.gX⁻¹.h⁻¹) foi observada no cultivo das células transformadas contendo o gene *ugd* amplificado com valor de 0,128 gP.L⁻¹.gX⁻¹.h⁻¹. Porém, ao analisar a média de δ_p para o mesmo conjunto amostral de dados, observa-se que o valor médio de produtividade específica para a linhagem que contém o gene *galU* amplificado possui valor superior, se comparado a outra linhagem, e com desvio padrão menor entre os dados. Mesmo assim, apenas com informações de um único experimento em triplicata, como é o caso do presente trabalho, não é possível afirmar que uma linhagem seja superior a outra.

Fazendo agora um breve comparativo com os valores disponíveis atualmente na literatura, e utilizando o tempo de cultivo, composição do principal substrato do meio, plataforma (biorreator ou *shaker* agitado) utilizada e produtividade volumétrica como parâmetros, reuniram-se os dados para diferentes linhagens de *Xanthomonas campestris* utilizadas por diferentes autores na Tabela 4.4 a seguir. Para efeito de comparação, foi selecionado o valor de produtividade obtido pelo cultivo de XCC_pLACR1_pp, que contém o gene *galU* amplificado.

Tabela 4.4: Comparativo de parâmetros estabelecidos e obtidos no presente estudo com dados disponíveis na literatura

	Este estudo	Oliveira (2021)	Serrano-Carreón et al. (1998)	Amanullah et al. (1998)	García-Ochoa et al. (1995)
Parâmetros\ Linhagem	XCC <i>galU</i> ATCC 33913	XCC ATCC 33913	NRRL B-1459	NRRL B-1459	NRRL B-1459
Tempo cultivo (h)	41	48	42	75	70
Plataforma usada	Shaker	Shaker	Biorreator	Biorreator	Biorreator
Substrato* (g.L ⁻¹)	35 (S)	35 (S)	40 (S)	50 (G)	40 (S)
P _r (gP.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,390	0,356	0,799	0,44	0,343

*Substrato: (S) - Sacarose; (G) - Glicose

Fonte: Adaptado de Oliveira (2021).

Como pode ser observado na Tabela 4.4, os diferentes parâmetros de fermentação de cada autor influenciam de maneira considerável na produtividade volumétrica final e, assim sendo, são múltiplos os fatores que alteram e colaboram para a produtividade da goma xantana pelas células de *Xanthomonas*. Oliveira (2021), por exemplo, realizou o cultivo de células de *Xanthomonas campestris* *pv. campestris* transformadas e não transformadas em situações similares ao do presente trabalho (com sacarose como principal substrato a 35 g.L⁻¹, cultivo em Erlenmeyer conduzido em *shaker*, a 29 °C e com um tempo de cultivo ligeiramente maior) e obteve uma produtividade volumétrica menor (para o caso de células

não transformadas, como pode ser visto na Tabela 4.4), o que torna factível a hipótese de que o uso de linhagens recombinantes favoreça a produtividade de goma xantana.

Oliveira (2021), em seu trabalho, utilizou linhagens transformadas e obteve valores de produtividade volumétrica superiores aos de células não transformadas para condições idênticas de cultivo. García-Ochoa (1995) obtiveram uma produtividade volumétrica equivalente a $0,343 \text{ gP.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em biorreator e com mais de 60 horas de cultivo, num tempo de cultivo bem superior ao do presente trabalho. Dessa forma, tudo indica que a utilização de linhagens recombinantes é um dos fatores que podem auxiliar no aumento da produtividade do biopolímero juntamente aos demais parâmetros da fermentação realizada pelas células de *Xanthomonas*, como, por exemplo, tempo de cultivo e plataforma a ser utilizada.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

A partir dos resultados obtidos com os cultivos em frasco agitado de linhagens recombinantes de *Xanthomonas campestris pv. campestris*, com cópia extra dos genes que codificam as enzimas que se comportam como *bottlenecks* na via de síntese de goma xantana, conclui-se que as linhagens modificadas podem contribuir favoravelmente para produção do produto de interesse, com produtividade volumétrica de goma xantana obtida igual a 0,259 e 0,360 gP.L⁻¹.h⁻¹, em média, para linhagens contendo os genes *ugd* e *galU* amplificados, respectivamente. Quando se compara a produtividade volumétrica obtida por linhagens recombinantes com dados disponíveis atualmente na literatura, sobretudo por linhagens não transformadas, nota-se que a utilização de ferramentas biotecnológicas pode colaborar positivamente para produção de goma xantana.

Entretanto, demais parâmetros do cultivo como, por exemplo, a plataforma utilizada, a fonte de carbono e o tempo total do cultivo devem ser levados em consideração se o intuito é maximizar a produção de goma xantana pelas células, pois o uso de células modificadas é apenas um dos fatores importantes no processo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, R. S. A. **Efeitos de alguns nutrientes na formação de goma xantana por *Xanthomonas campestris***. Dissertação de mestrado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1991.
- AMANULLAH, A. et al. Reproducibility of pilot scale Xanthan fermentations. **Biotechnology Progress**, v. 12, n. 4, p. 469–472, 1996.
- ANVISA. **Resolução – RDC 45, de 03 de novembro de 2010**. Sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as boas práticas de fabricação. Diário Oficial da União, Poder Executivo. Brasília, DF, 2010.
- BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 50, n. 2, p. 145 – 150, 1998.
- BORGES, C. D.; VENDRUSCOLO, C. T. **Xanthan gum: characteristics and operational conditions of production**. Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 29, n. 2, 17 p., 2008.
- BRANDÃO L V. **Goma xantana obtida por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel: produção, caracterização e aplicação para fluido de perfuração de poços de petróleo**. Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Salvador, p. 12-15, 2012.
- COMEXSTAT. **Exportação e Importação Geral**. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>>. Acesso em: 07/07/2022.
- COSTERTON, J. W., et al. **Bacterial biofilms in nature and disease**. **Annual Review Microbiology**, v. 41, p. 440-462, 1987.
- DEY, S.; MAZUMDER, B.; CHATTOPADHYAY, S.; DAS, M.K., SINHA, S., GANGULY, S., De, K., MISHRA, M. Polymers derived from *Xanthomonas campestris* and *Cyamopsis tetragonolobus* used as retardant materials for the formulation of sustained release floating matrix tablet of atenolol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, n. 1, p. 346-356, 2014.
- DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C.; SCHORR-GALINDO, S. **Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction**. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951–962, 2012.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. **Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção**. Semina, Ciências Agrárias, v. 26, n. 1, p. 71-82, 2005.

FERREIRA, G. M.; GUIMARÃES, M. J. O. C; MAIA, M. C. A. **Estudo das Propriedades Viscoelásticas de Polissacarídeos em Suspensão de Polpa de Fruta**. UFRJ. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – , p.1-3 Outubro/2009.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCÓN, A. **Xanthan gum production: An unstructured kinetic model**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17, n. 3, p. 210– 216, 1995.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMES, E. **Xanthan gum: production, recovery, and properties**. *Biotechnology Advances*. v 18, p.560-569, 2000.

GOMES, G. V. P. **Produção Simultânea de Goma Xantana e Microfibrilas de Celulose Pela Bioconversão de Bagaço de Cana Por *Xanthomonas***. Tese de PhD, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil, p.30-43, 2014.

GOTO, L. S. et al. **Structural and functional characterization of the phosphoglucomutase from *Xanthomonas citri subsp. citri***. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1864, n. 12, p. 1660–1667, 2016.

HARDING, N. E.; CLEARY, J. M.; CABANAS, D. K.; ROSEN, I. G.; KANG, K. S. **Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris***. *Journal of bacteriology*, v. 169, n. 6, p. 2854–2861, 1987.

HOLT, J.G; KRIEG, N.R.; SNEATH, P. H. A; STALEY, J.T. – **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. Philadelphia (USA): Lippinott Williams & wilkins. 9 edição, 120-170p. 1994.

KI-WON S.; SEOK-YONG, K.; GAP-SHIK, C. **Rheology of concentrated xanthan gum solutions: steady shear flow behavior**. *Fibers and Polymers*, 7 (2), p. 129–138, 2006.7

KÖPLIN, R.; ARNOLD, W.; HÖTTE, B.; SIMON, R.; WANG, G.; PÜHLER, A. **Genetics of xanthan production in *Xanthomonas campestris*: the xanA and xanB genes are involved in UDP-glucose and GDP-mannose biosynthesis**. *Journal of bacteriology*, v. 174, n. 1, p. 191–199, 1992.

KUNDLATSCH, G. E. **Desenvolvimento de um modelo determinístico para análise e otimização da via biossintética de produção de goma xantana em bactérias do gênero *Xanthomonas***. Universidade Federal de São Carlos, Trabalho de conclusão de curso. São Carlos. 2006.

LACERDA, L. A. et al. **Protein depletion using the arabinose promoter in *Xanthomonas citri subsp. citri***. *Plasmid*, v. 90, n. February, p. 46–50, 2017.

LIMA, U. A.; AQUARONI, E.; BORZANI, W.; SCMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, v 3, p.130-144, 2001.

MAUGERI, F. Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, v. 3, p.135-145, 2001.

MAURY, A; & ROQUE, J. **Lês Polysaccharides**. Biofutur, p. 17-31, 1986.

MENEZES, J. D. S.; DRUZIAN, J. I.; PADILHA, F. F.; DE SOUZA, R. R. **Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações**. Universidade de Santa Maria. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, vol.8, n.8, 2012.

MERCADO LIVRE. **Goma xantana: resultado de pesquisa**. Disponível em: <lista.mercadolivre.com.br/goma-xantana>. Acesso em 07 de agosto de 2022.

MESOMO, M, C. **Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo**. Dissertação de mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões campus de Erechim. 2007.

OLIVEIRA, D. B. **Construção de Linhagens Recombinantes de *Xanthomonas sp.* para Produção de Goma Xantana**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de São Carlos, p.8-40, 2021.

PACE, G. **Polímeros microbianos**. In : BU“LOOCK, John ; KRISTIANSEN, Bjorn. **Biotecnología Básica**. Traducción : Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, p. 455-462, 1991.

PIERI, C. D.; **Expressão, purificação e caracterização das enzimas GumD e GumC na produção do exopolissacarídeo da Bactéria *Xylella fastidiosa***. Dissertação de mestrado em Física Biomolecular - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, p.4-10, 2002.

QIAN, F.; AN, L.; HE, X.; HAN, Q.; LI, X. **Antibacterial activity of xantho-oligosaccharide cleaved from xanthan against phytopathogenic *Xanthomonas campestris pv. campestris***. Process Biochemistry, v. 41, p.1582-1588, 2006

ROSALAM, S. & ENGLAND, R. **Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris sp.*** Enzyme Microb. Technol. 39, p.190-201, 2006.

ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas sp* para a produção de goma Xantana**. Dissertação de mestrado. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil. p.8-10, 2005.

SADDLER, G. S.; BRADBURRY, J. F. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 2 The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria Phylum XIV. Xanthomonadales ord. nov. Springer Science + Business Media. p.70-120, 2015.

SAVVIDES, A. L. et al. **Xanthan production by *Xanthomonas campestris* using whey permeate medium**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, n. 8, p. 2759–2764, 2012.

SERRANO-CARREÓN, L. et al. **Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing.** Process Biochemistry, v. 33, n. 2, p. 130–145, 1998.

SILVA, L. C. C.. **Utilização do soro de leite em bioprocesso para a produção de goma xantana.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

SOUZA, J. D. **Produção biotecnológica de goma xantana em alguns resíduos agroindustriais, caracterização e aplicações.** Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 8, n. 8, p. 1765-1773, 2012.

SUBHASH, Magar et al. **Microbial production of Green polymer Xanthan Gum from *Xanthomonas campestris*.** International Journal of Scientific & Engineering Research, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 1045–1052, 2015.

SUTHERLAND, I. W. **Extracellular polysaccharide.** In: REHM, H. J.; REED, G. (Ed.). Biotechnology. Weinheim: Verlag Chemie, v. 3, p. 531-555, 1983.

SWORN, G. Xanthan gum –functionality and application, In: Norton, I. T., Spyropoulos, F. and Cox, P. (Eds.), **Practical Food Rheology: an interpretive approach**, Blackwell Publishing, 2011.

TESSMANN, C. **Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris pv pruni* pela técnica de RAPD e relação com a planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química da xantana.** Dissertação mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

VORHÖLTER, F.-J. et al. **The genome of *Xanthomonas campestris pv. campestris* B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis.** J. Biotechnol. 134, 35–43 (2008).

WANG, X.; ZHENG, D.; LIANG, R. An Efficient Electro-Competent Cells Generation Method of *Xanthomonas campestris pv. campestris*: Its Application for Plasmid Transformation and Gene Replacement. **Advances in Microbiology**, v. 06, n. 02, p. 80–87, 2016.

WANKENNE, Michel A. (org.). **Os tipos de gomas e suas aplicações na indústria.** Revista **Aditivos & Ingredientes**. São Paulo, SP, v. 116, p. 37-39, 2015.

WHISTLER, R. L.; BeMILLER, J. N. **Industrial gums**, 3 ed. San Diego: Academic Press, p.642, 1993.

WOICIECHOWSKI, A. L. ; SOCCOL, C. R. ; CAMARGO, F. ; PANDEY, A. . **Produção de Goma Xantana a partir de Resíduos da Agroindústria do Café.** In: Anais do I SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 2000, Poços de Caldas v. 1. p. 677-680, 2000.