

URI - CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**OBTENÇÃO DE GOMA XANTANA EM BIORREATOR UTILIZANDO
MEIO À BASE DE SORO DE QUEIJO: ESTUDO DA PRODUÇÃO E
MODELAGEM MATEMÁTICA**

JAQUELINE SULKOSKI MECCA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS - BRASIL
FEVEREIRO 2010

OBTENÇÃO DE GOMA XANTANA EM BIORREATOR UTILIZANDO MEIO À BASE DE SORO DE QUEIJO: ESTUDO DA PRODUÇÃO E MODELAGEM MATEMÁTICA

JAQUELINE SULKOSKI MECCA

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Helen Treichel, D.Sc. (Orientadora)

Fernanda Corazza, D.Sc. (Orientadora)

Marcio A. Mazutti, D.Sc.

Gean Delise Leal Pasquali Vargas, D.Sc.

Rogério Cansian, D.Sc.

Erechim, Fevereiro de 2010.

NESTA PÁGINA DEVERÁ SER INCLUÍDA A FICHA CATALOGRÁFICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. ESTA FICHA SERÁ ELABORADA DE ACORDO COM OS PADRÕES DEFINIDOS PELO SETOR DE PROCESSOS TÉCNICOS DA BIBLIOTECA DA URI – CAMPUS DE ERECHIM.

AGRADECIMENTOS

De maneira especial, aos meus pais, Solange e Nelson, que sempre me ensinaram qual caminho seguir e a ser uma pessoa leal. Muito obrigada por tudo, por todas as horas em que pensei em desistir e vocês estavam aí para me apoiar. Por se preocuparem com meu futuro e, mesmo depois de formada, darem-me essa oportunidade de continuar estudando e sentirem muito orgulho disso.

A minha família, pelo amor e pelas palavras de incentivo. Mesmo sabendo que não seria fácil para mim, sempre me incentivaram a fazer mestrado. Em vários momentos difíceis, vocês me fizeram erguer a cabeça e seguir em frente. Ao meu marido, Alcione, que me recebeu em sua casa e sempre esteve pronto para ajudar. Muito obrigada por tudo!

A Deus, que me deu força para seguir em frente quando tudo dava errado e para lutar cada vez mais.

Aos meus orientadores Helen Treichel, Marcio Mazutti e Fernanda Corazza pelo apoio e ensinamentos a mim dispensados. Principalmente pela total disponibilidade em ajudar, mesmo quando não estava presente e pelas palavras de incentivo.

Às novas amigas que eu fiz durante o mestrado, principalmente à pessoa e professor Marcio Mazutti e ao colega Giovani. Vocês foram decisivos.

A todos os colegas do mestrado, pela amizade e troca de experiências.

A todos do laboratório de biotecnologia e da vegetal, pela ajuda e amizade.

Aos colegas do Centro Tecnológico da URI - Campus de Erechim e graduandos do Curso de Engenharia de Alimentos, os quais é difícil citar todos, e seria injusto citar apenas alguns, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu amadurecimento profissional e espiritual.

Muito obrigada a todos do fundo do meu coração!

Jaqueline Sulkoski Mecca

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

OBTENÇÃO DE GOMA XANTANA EM BIORREATOR UTILIZANDO MEIO À BASE DE SORO DE QUEIJO: ESTUDO DA PRODUÇÃO E MODELAGEM MATEMÁTICA

JAQUELINE SULKOSKI MECCA

Fevereiro 2010

Orientadores: Marcio Mazzutti; Fernanda Castilhos Corazza; Helen Treichel

A goma xantana é um polissacarídeo produzido por *Xanthomonas*, importante devido à ampla utilização na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica, na recuperação de óleo, apresentando vantagens quando comparada a utilização de outros polímeros, devido, em especial, às suas propriedades reológicas e a não dependência do extrativismo sujeito a sazonalidades. Assim, provavelmente a goma xantana deva continuar sendo o biopolímero mais utilizado nos próximos anos, devido a essas suas características singulares. Diversos estudos que visam à utilização de resíduos agroindustriais na produção de goma xantana são encontrados na literatura, devido ao crescente mercado de aplicabilidade dos polissacarídeos de alto valor agregado e redução de custos na produção. Desse modo, a utilização de substratos alternativos, como o soro de queijo, representa a eliminação de possíveis problemas ambientais, além do fato de que o Brasil poderia suprir sua própria demanda de goma xantana com maior competitividade no preço final, visto que toda goma xantana utilizada no país é importada. Os modelos matemáticos representam uma ferramenta tida como muito importante no aumento de escala de um bioprocessos, controle e otimização de processo. Devido ao alto custo de uma fermentação em escala industrial, torna-se indispensável ter um modelo que consiga descrever quantitativamente as variáveis relevantes do processo. O modelo pode baixar custos e a complexidade envolvida neste tipo de experimento. Neste contexto, esta dissertação apresenta como seu principal objetivo o estudo da produção da goma xantana em biorreator utilizando soro de queijo como substrato e a modelagem matemática da cinética deste processo. Os resultados obtidos neste trabalho com relação aos efeitos da agitação e aeração permitem concluir que, ambas as variáveis apresentam influência sobre a produção de goma xantana e, com relação ao crescimento microbiano, somente a agitação apresentou influência significativa

no processo. Além disso, as maiores produções de goma foram verificadas no período final de fermentação (entre 72 e 96h). Esse fato ocorre devido a bactéria *Xanthomonas campestris* excretar para o meio seu metabólito na sua fase de desaceleração e declínio celular, indicando que a formação de produto é parcialmente associada ao crescimento microbiano. Com relação ao modelo matemático proposto para representar o processo de produção de goma xantana em biorreator batelada, pode-se verificar que o emprego de uma estrutura híbrida, combinando as equações de balanço de massa com as redes neurais, é uma ferramenta interessante para a estimação de parâmetros em bioprocessos. Os resultados obtidos nesse trabalho com relação a qualidade de ajuste foram satisfatório, uma vez que o modelo foi apto para descrever o perfil cinético do crescimento microbiano, consumo de lactose e produção de goma xantana no meio. O modelo híbrido é uma ferramenta interessante a ser utilizada em bioprocessos, principalmente nas situações onde a rota metabólica não é bem conhecida ou elucidada.

Palavras Chave: Modelagem Híbrida; Goma Xantana; Soro de Queijo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS.....	10
2.1.1 Xanthomonas sp.....	13
2.1.2 Goma Xantana	15
2.2 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS POR FERMENTAÇÃO.....	18
2.2.1 Substratos utilizados na produção de biopolímeros	21
2.2.1.1 Soro de Queijo	23
2.3 RECUPERAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS.....	26
2.4 TOXICIDADE E APLICAÇÕES DA GOMA XANTANA.....	27
2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIOPROCESSOS	28
2.6 MODELOS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO MICROBIANO	30
2.7 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS	32
2.8 REDES NEURAIS.....	35
2.9 MODELOS HÍBRIDOS.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO.....	40
3.2 PRODUÇÃO DE CÉLULAS	40
3.3 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO	41
3.4 SORO DE QUEIJO.....	41
3.5 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA.....	41
3.6 RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA.....	48
4.2 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA	54
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
6. REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Os biopolímeros são polissacarídeos de origem microbiana também conhecidos como gomas ou exopolissacarídeos (ESP), que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA et al., 2003).

Os biopolímeros são interessantes do ponto de vista industrial por serem amplamente utilizados como espessantes, geleificantes, agentes de suspensão, colóides protetores, entre outras aplicações. Exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para definir sua aplicação final. Tais propriedades são determinadas por sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, sua massa molar média e sua distribuição (PACE, 1991). Biopolímeros ou polissacarídeos microbianos podem ser intracelulares, da parede celular ou extracelulares (exopolissacarídeos ou EPS), e estes podem ser capsulares ou livres. Os de maior interesse são os extracelulares livres, devido à sua facilidade de obtenção e menor custo para a indústria.

Quatro biopolímeros são aprovados pelo Food and Drugs Administration (FDA), nos Estados Unidos, para uso alimentar: xantana, dextrana, curculana e gelana (PORTILHO, 2002). A Legislação Brasileira, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), prevê o uso de xantana e da dextrana como um aditivo em alimentos, porém, curculana e gelana ainda não são aprovadas (ANVISA, 2007).

Segundo Anderson et al.(1986) resíduos são considerados uma fonte rica de nutrientes e de grande aplicabilidade na indústria, nos mais diversos produtos. Neste contexto o descarte do soro de queijo pode trazer danos à natureza. Entretanto, como o mesmo é fonte de proteínas, lactose e demais compostos, este pode ser utilizado como meio de produção em processos fermentativos, tornando-se muito atrativa econômica e ambientalmente a sua reutilização.

O soro de queijo é um líquido obtido da coagulação do leite na elaboração dos queijos e após a etapa de separação da coalhada e gordura. Ele representa 80% a 90% de volume no leite e contém em torno de 6,0% de extrato seco, 55% dos nutrientes do leite original, sendo, destes, proteínas solúveis, lactose, vitaminas e sais minerais. O soro de leite resultante da fabricação de queijos vem sendo estudado como alternativa promissora, em bioprocessos, para obtenção da goma xantana (Nitschke, 2001; Gollo et al., 2009; Mesomo et al., 2009).

A goma xantana é um polissacarídeo produzido por *Xanthomonas*, importante devido à ampla utilização na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica, na recuperação de óleo, apresentando vantagens quando comparada a utilização de outros polímeros, devido, em especial, às suas propriedades reológicas e a não dependência do extrativismo sujeito a sazonalidades (Casas, 1999). Assim, provavelmente a goma xantana deva continuar sendo o

biopolímero mais utilizado nos próximos anos, devido a essas suas características singulares. Diversos estudos que visam à utilização de resíduos agroindustriais na produção de goma xantana são encontrados na literatura, devido ao crescente mercado de aplicabilidade dos polissacarídeos de alto valor agregado e redução de custos na produção. Desse modo, a utilização de substratos alternativos, como o soro de queijo, representa a eliminação de possíveis problemas ambientais, além do fato de que o Brasil poderia suprir sua própria demanda de goma xantana com maior competitividade no preço final, visto que toda goma xantana utilizada no país é importada. (Nery et. al. 2008).

Os modelos matemáticos representam uma ferramenta tida como muito importante no aumento de escala de um bioprocessos, controle e otimização de processo. Devido ao alto custo de uma fermentação em escala industrial, torna-se indispensável ter um modelo que consiga descrever quantitativamente as variáveis relevantes do processo. O modelo pode baixar custos e a complexidade envolvida neste tipo de experimento (VOLESKY e VOTRUBA, 1991).

Neste contexto, esta dissertação apresenta como seu principal objetivo o estudo da produção da goma xantana em biorreator utilizando soro de queijo como substrato e a modelagem matemática da cinética deste processo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Polissacarídeos microbianos são macromoléculas formadas por monossacarídeos e derivados ácidos, podendo ser sintetizados por bactérias, fungos e leveduras (SUTHERLAND, 1982).

Polissacarídeos microbianos são biopolímeros produzidos por microrganismos, que têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA *et al.*, 2003), mesmo em baixas concentrações.

Muitos microrganismos produzem grandes quantidades de polissacarídeos sob as mais variadas condições. Esses polissacarídeos têm papéis específicos como compostos de armazenamento (glicogênio), compostos estruturais (quitina) e mediadores das interações do microrganismo com o meio ambiente (polissacarídeos extracelulares) (PACE, 1991).

Os polissacarídeos podem ser divididos, de acordo com a sua localização morfológica, em três grupos: intracelular, localizado no interior da célula ou como parte da membrana citoplasmática; da parede celular formados como parte estrutural das células; e polissacarídeos extracelulares, produzidos no interior da célula, sendo posteriormente, secretados para o exterior da mesma (SUTHERLAND, 1982).

A biossíntese de exopolissacarídeos (EPS) está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas de meio ambiente (WILKINSON, 1958 apud MOREIRA, 2002). De acordo com PACE (1991) esses EPS desempenham diferentes papéis, que incluem: proteger o microrganismo contra desidratação; servir de barreira, impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular; acoplar e neutralizar toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuar como fonte de carbono e energia; converter o excesso de substrato em uma massa espumosa que é mais difícil de ser metabolizada por outros microrganismos; interagir com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas.

Os EPS são, geralmente, considerados metabólitos secundários, produzidos quando uma fonte de carboidratos está presente em excesso (PACE e RIGHELATO, 1980). Metabólitos secundários são compostos sintetizados pelos microrganismos quando as células crescem lentamente ou cessam o crescimento. Seu papel no crescimento e metabolismo do microrganismo nem sempre é bem definido.

Os polissacarídeos capsulares são altamente hidratados, e, portanto protegem a bactéria da dessecação, evitando que moléculas hidrofóbicas penetrem na cápsula e cheguem à membrana celular. Os EPSs ácidos produzidos pela maioria das bactérias fitopatogênicas são altamente aniônicos e assim, podem atuar como resinas de troca iônica, concentrando minerais e nutrientes ao redor da célula. Outra função importante do polissacarídeo capsular, no solo ou em ambiente aquáticos, é auxiliar na adesão da bactéria a superfícies biológicas ou inertes, nas quais existem altas concentrações de nutrientes. As bactérias fitopatogênicas precisam crescer ou sobreviver no solo, em folhas ou raízes de plantas para completar seu ciclo de vida, portanto a proteção contra o meio ambiente hostil pode ser um motivo para que a bactéria produza EPS (SILVA *et al.*, 2001).

Os homopolissacarídeos são EPS microbianos constituídos por um único tipo de monossacarídeo, como as gomas dextrana e curculana. Outros EPS, como a goma xantana, possuem estrutura mais complexa podendo, inclusive, conter além de diferentes monossacarídeos, outros compostos químicos (SUTHERLAND, 1994).

Gomas são biopolímeros hidrofílicos de alta massa molar largamente utilizadas na indústria para controlar as propriedades funcionais de produtos alimentícios (KAYACIER *et al.*, 2005).

As gomas podem ser provenientes de plantas terrestres, subdividindo-se em estruturais (amido, celulose, pectina, etc.), exudatos (goma arábica) e oriundos das sementes (goma guar e locusta); de plantas aquáticas (ágar, carragena); e de microrganismos (dextrana, gelana, xantana, etc.), que recebem a denominação de biopolímeros microbianos (BOBBIO e BOBBIO, 1992).

Microrganismos são mais apropriados que macroalgas ou plantas superiores, uma vez que eles exibem alta taxa de crescimento e são mais acessíveis na manipulação das condições para aumentar o crescimento e/ou a produção de exopolissacarídeo (PARIKH e MADAMWAR, 2006).

As gomas microbianas não dependem de condições climáticas, e não estão sujeitas à contaminação marinha ou falha na colheita, que prejudicam a oferta das gomas tradicionais. Além disso, são menos suscetíveis à variabilidade em sua qualidade, pois sua produção pode ser controlada cuidadosamente. Os polissacarídeos obtidos de microrganismos possuem propriedades específicas, sendo uma alternativa válida para o desenvolvimento de novos produtos, pois possuem propriedades similares aos de origem vegetal e animal. Essas gomas têm como principal desvantagem o seu elevado custo, o que se deve aos processos de produção que são intensivos em capital e energia (PACE, 1991; MAUGERI, 2001).

As propriedades dos biopolímeros são determinadas por sua composição química, agrupamentos e ligações moleculares, sua massa molar e sua distribuição. A principal característica dos polímeros é sua capacidade de modificar a reologia de soluções, além de serem, em sua maioria, multifuncionais, isto é, exibem uma combinação de propriedades que são essenciais para definir sua aplicação final. Os EPS microbianos podem ser polímeros de monossacarídeos aniônicos, neutros e catiônicos ou derivados destes e, frequentemente, contêm grupos laterais como acetato, piruvato, succinato, componentes lipídicos, nitrogênio orgânico ou íons inorgânicos. O grau de substituição destes grupos laterais tem um importante efeito sobre as propriedades dos polímeros (PACE, 1991).

As propriedades mais importantes de uma solução de goma são água ligada, viscosidade em termos de gelatinização e capacidade espessante. Em adição a estas funções, elas são também usadas em formulações de alimentos para estabilização de emulsões, prevenção de recristalização do gelo e atributos sensoriais (KAYACIER *et al.*, 2005).

Vários biopolímeros têm sido produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana (*Leuconostoc* e *Streptococcus*), xantana (*Xanthomonas*), curculana (*Alcaligenes faecalis* var. *mixogenes* e *Agrobacterium radiobacter*), alginato bacteriano (*Azotobacter*, principalmente *Azotobacter vinelandii*, e *Pseudomonas*), zanflo (*Erwinia tahitica*), gelana (*Sphingomonas paucimobilis*, anteriormente classificada como *Pseudomonas elodea*), welana (*Alcaligenes*), escleroglucana (*Sclerotium*), pululana (*Aureobasidium pullulans*), celulose bacteriana (*Acetobacter xilinum*) (SUTHERLAND, 1992; MARTINS e SÁ-CORREIA, 1993; GIAVASIS *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; GIAVASIS *et al.*, 2003; KALOGIANNIS *et al.*, 2003; CAMPBELL *et al.*, 2003).

A dextrana e a xantana são os polissacarídeos microbianos comercializados em maior escala, dividindo fatias importantes do mercado de gomas. A goma gelana e curculana também são produzidas comercialmente por biossíntese microbiana e aprovadas pelo *Food and Drugs Administration* (FDA), para uso em alimentos. A xantana foi o segundo polissacarídeo microbiano usado na indústria de alimentos como espessante, emulsificante, estabilizante e agente de suspensão, aprovado pelo FDA em 1969. No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965.

A goma xantana foi descoberta da década de 1950 e comercializada a partir da década de 1960, sendo um polissacarídeo natural e um importante biopolímero industrial (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). É um heteropolissacarídeo produzido por cultivo aeróbico de culturas de *Xanthomonas campestris*, normalmente pelo pv *campestris* (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001).

A instabilidade das linhagens de *Xanthomonas campestris* podem ocasionar uma variação de massa molar do polissacarídeo, e do grau de piruvatação e acetilação. Segundo MAUGERI (2001), através de manipulações genéticas é possível alterar o grau de acetilação, aumentar o grau de piruvatação em 45% e aumentar o rendimento da goma em 20%.

A aplicação da goma xantana em inúmeros segmentos industriais entre eles alimentos, fármacos, químico, petroquímico deve-se, principalmente, às suas propriedades reológicas que permitem a formação de soluções viscosas em baixas concentrações (0,05-1%) e ampla faixa de estabilidade a pH e temperatura, características conferidas devido à sua estrutura ramificada e sua alta massa molar (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; SUTHERLAND, 2002). Quando em conjunto com galactomananas (goma guar, goma de algaroba e goma locuste) a goma xantana apresenta aumento sinérgico de viscosidade, formando géis termorreversíveis (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MAUGERI, 2001; WANG *et al.*, 2002a; WANG *et al.*, 2002b; PARADOSSI *et al.*, 2002; SUTHERLAND, 2002).

A importância e potencialidade do uso de biopolímeros nos mais diversos segmentos industriais como agentes espessantes, estabilizantes, gelificantes e emulsionantes em alimentos, fármacos, tintas, defensivos agrícolas e outros, é um consenso na literatura. Observa-se nesses setores uma contínua substituição dos polissacarídeos convencionais por produtos de origem microbiana, por várias razões, como possibilidade de modificação de suas características reológicas através do controle de parâmetros de fermentação, independência climática, controle de qualidade dos lotes (BOZA, 2002).

Um alto potencial de aplicação nos mais diversos segmentos industriais tem surgido para biopolímeros, destacando-se a indústria alimentícia devido principalmente à propriedade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis. Para DRUZIAN (2000), a pesquisa visando à aplicação industrial está concentrada nos polissacarídeos extracelulares (EPS), pois resultam em processos de extração e purificação mais simples e produtividade mais elevada.

2.1.1 *Xanthomonas* sp

A bactéria *Xanthomonas campestris*, capaz de elevar a viscosidade do meio onde se desenvolve, foi isolada por Vers em 1940. A viscosidade é produzida pela secreção no meio de um heteropolissacarídeo aniônico, denominado goma xantana, produzido em escala industrial por fermentação aeróbica pela *X. campestris* (MAURY e ROQUE, 1986).

As bactérias *Xanthomonas* pertencem à família *Pseudomonaceae*. Microrganismos deste gênero são bactérias fitopatogênicas relativamente comuns responsáveis por causar “black root” em crucíferas, resultando em grandes perdas econômicas (ESGALHADO *et al.*, 1995; CROSMAN *et al.*, 2004).

As *Xanthomonas* são bactérias Gram-negativas, com formato de bastonetes (0,4-0,7µm de largura e 0,7-1,8µm de comprimento), móveis por flagelo único (1,7-3µm de comprimento), com exceção a *X. maltophilia* que possui vários flagelos. As colônias de *Xanthomonas sp* são normalmente amarelas, lisas e viscosas. Os pigmentos amarelos, xantomonadinas, estão presentes em todas as espécies de *Xanthomonas*, porém, podem estar ausentes quando acontece alguma degradação (GARCÍA-OCHOA, 2000). São essencialmente fitopatogênicas, com exceção da *X. maltophilia* que é um patógeno humano (HOLT *et al.*, 1994).

Estes microrganismos são quimiorganotróficos, capazes de usar uma variedade de carboidratos, sais e ácidos orgânicos como fonte de carbono, estritamente aeróbios, com um tipo de metabolismo respiratório que requer oxigênio como o acceptor de elétrons terminal, resistentes à estreptomicina. A bactéria não desnitrifica, é catalase-positiva e oxidase-negativa. A *Xanthomonas sp* pode oxidar a glicose e o caminho de *Entner-Doudoroff* é predominantemente usado para o catabolismo da glicose (o caminho da pentose fosfato também acontece, mas usa só 8-16% da glicose total consumida); o ácido tricarboxílico e os ciclos de glioxilato estão presentes (GARCÍA-OCHOA, 2000).

Grande parte dos patovares de *X. campestris*, e outras espécies de *Xanthomonas* produzem EPS. Por serem bactérias essencialmente fitopatogênicas, a produção de EPS está relacionada com sua sobrevivência, enquanto na superfície do vegetal hospedeiro, pois este é um ambiente inóspito à bactéria. Causam uma variedade de doenças e sintomas, incluindo necrose, gomose e/ou doenças vasculares ou parenquimatosas em folhas, ramos ou frutos de muitas plantas (HAYWARD, 1993). A espécie *X. campestris*, a mais numerosa e abundante, diferencia-se em aproximadamente 125 patovares, que infectam e causam doenças em vários hospedeiros (BRADBURY, 1984).

As bactérias colonizam a superfície dos vegetais pela adesão a certas estruturas. Após invadirem os espaços intercelulares, desenvolvem microcolônias rodeadas de material fibrilar, provavelmente o EPS xantana. Passadas 24 horas encontram-se abundantemente rodeadas por EPS, que preenche os espaços intercelulares. Como o muco secretado pela bactéria apresenta alta capacidade de retenção de água, os espaços tornam-se congestionados; este fenômeno é conhecido como *water soaking*. O tecido é continuamente desintegrado e é o primeiro sintoma da infecção e pré-requisito para a efetiva colonização bacteriana (RUDOLPH, 1993). Como a

congestão é progressiva, os danos vão agravando-se. A planta vai murchando devido à redução da fotossíntese e aumento da permeabilidade da membrana celular. A bactéria utiliza como substrato o tecido necrosado, uma vez que é capaz de secretar diversas enzimas que degradam os polissacarídeos estruturais como a celulose e pectinas (SUTHERLAND, 1993).

Fatores de crescimento geralmente requeridos incluem metionina, ácido glutâmico, ácido nítrico ou a combinação desses. A temperatura ótima de crescimento fica entre 25 a 30°C, e possuem máxima tolerância ao NaCl de 2,0-5,0%. Capaz de fazer proteólise no leite para obter fontes de nitrogênio (HOLT *et al.*, 1994).

As linhagens utilizadas para a produção de goma xantana são selecionadas e cultivadas por muitos métodos convencionais. A modificação genética pode levar a melhorias nas propriedades requeridas para aplicações de recuperação da cepa ou suplementação do meio, ou ainda aumentar a produção, reduzindo o tempo de fermentação e simplificando a recuperação e purificação do produto no processo (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

2.1.2 Goma Xantana

A Goma Xantana é um polissacarídeo sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas*, e um importante biopolímero industrial. A descoberta da goma xantana foi resultado de um programa sistemático de busca ou *screening* iniciada pelo Departamento de Agricultura dos EUA. O resultado deste programa foi a descoberta da xantana na década de 1950 nos Laboratórios de Pesquisa Regionais do Norte (NRRL) no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (MORRIS, 1984). A xantana é completamente atóxica, tendo sido aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA desde 1969, como aditivo em alimentos. No Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965, pelo Decreto Lei nº 55.871, da Legislação Brasileira de Alimentos (LIMA *et al.*, 2001).

A Xantana é um heteropolissacarídeo, cuja unidade básica repetidora é um pentassacarídeo, formado por duas unidades de glicose, duas unidades de manose e uma unidade de ácido glucurônico na proporção molar de 2,8:2,0:2,0 e grupos piruvato e acetil. Sua cadeia principal consiste em unidades de β -D-glucose com ligações nas posições 1 e 4. O trissacarídeo da cadeia lateral contém uma unidade de ácido D-glucurônico entre duas unidades de D-manose ligadas na posição O-3 de resíduos de glicose da cadeia principal. Aproximadamente metade dos resíduos D-manose terminais contém um ácido pirúvico ligado, com distribuição indeterminada. A unidade D-manose ligada à cadeia principal contém um

grupo acetil na posição O-6. A presença dos ácidos acético e pirúvico produz um polissacarídeo do tipo aniônico (SUTHERLAND *et al.*, 1992; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; PORTILHO, 2002). A estrutura molecular da goma xantana pode ser observada na Figura 1.

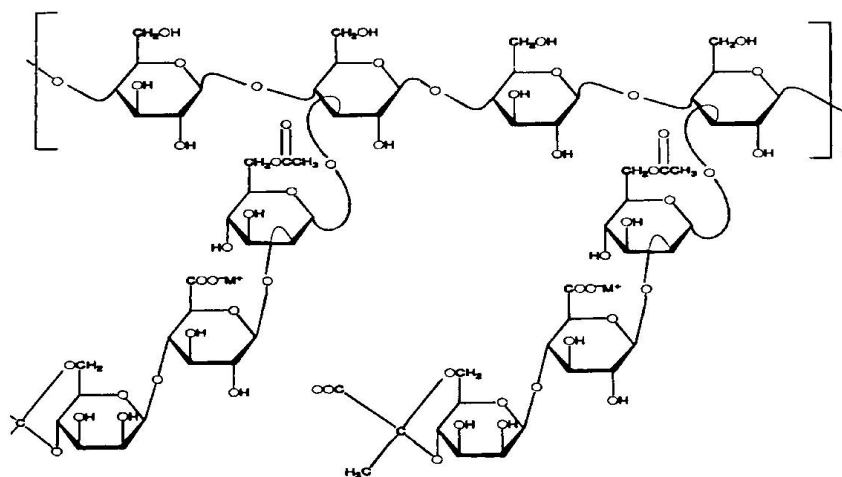


Figura 1. Estrutura da goma xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A massa molar da goma xantana varia de 2×10^6 a 20×10^6 Da (Daltons). Esta distribuição da massa molar depende da associação entre cadeias, dando forma a agregados de diversas cadeias individuais. As variações nas condições de fermentação são fatores que influenciam a massa molar da xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000, LIMA *et al.*, 2001).

A xantana foi o segundo biopolímero bacteriano a ser comercializado e o primeiro utilizado na indústria de alimentos, tendo sido produzida comercialmente em 1961 (MORRIS, 1996). O interesse deve-se às suas propriedades físico-químicas que superam todos os outros polissacarídeos disponíveis no mercado. Dentre estas propriedades destaca-se a sua elevada viscosidade em baixas concentrações (0,05-1%), devido à sua estrutura ramificada e sua alta massa molar, bem como estabilidade em ampla faixa de temperatura e pH (VENDRUSCOLO, 1995; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Existem muitos tipos de gomas as quais podem ser originadas de plantas, algas, microrganismos ou sinteticamente (KAYACIER *et al.*, 2005). Goma xantana é um polissacarídeo extracelular bem conhecido, usado como espessante em indústrias farmacêuticas, cosméticos e de alimentos (KIM *et al.*, 2005).

A principal característica da xantana é sua capacidade de modificar a reologia ou o comportamento de escoamento das soluções (MARGARITIS e PACE, 1985). Suas propriedades são determinadas por sua composição química, arranjos e ligações moleculares (PACE, 1980).

As soluções de xantana mostram um comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da deformação do fluido. A viscosidade das soluções praticamente não se alteram com a temperatura entre 4° e 93°C, com pH entre 1 e 13 e com forças iônicas equivalentes a concentrações de cloreto de sódio entre 0,05% e 1%. Há compatibilidade plena com uma grande diversidade de insumos usados industrialmente, como metais, ácidos, sais, agentes redutores, outros texturizantes, solventes, enzimas, surfactantes e conservantes. Em conjunto com galactomananas (goma guar e goma de algaroba) apresenta um aumento sinérgico de viscosidade e formam géis termorreversíveis (LIMA *et al.*, 2001).

A goma xantana com alto grau de acetilação e especialmente baixo grau de piruvatação, aumenta a viscosidade de suas soluções porque associações intermoleculares são favorecidas. Um problema importante relacionado com a produção de goma xantana deve-se à instabilidade das linhagens de *X. campestris*, resultando em uma variação de massa molar do polissacarídeo, e do grau de piruvatação e acetilação. Com a identificação dos genes responsáveis pela síntese do polissacarídeo é possível, através de manipulações genéticas, alterar o grau de acetilação, aumentar o grau de piruvatação e aumentar o rendimento da goma (LIMA *et al.*, 2001; MAUGERI, 2001).

A demanda por goma xantana produzida por *X. campestris* sp. aumenta constantemente todos os anos e uma taxa anual de crescimento de 5-10% é estimada (ROSALAM e ENGLAND, 2006).

Em 1992 a capacidade mundial de produção de biopolímeros (principalmente xantana) excedia 30.000 toneladas anuais correspondendo a 408 milhões de dólares (KALOGIANNIS *et al.*, 2003). O Brasil segue a tendência mundial de incremento no consumo de xantana, mesmo sendo esta totalmente importada, demonstrando a relevância de se investir em uma produção nacional competitiva, já que o Brasil mostra-se com um grande potencial para a fabricação deste polímero em escala industrial, pois dispõe de matéria-prima básica para a produção: açúcar, e álcool para a recuperação do polímero (MOREIRA, 2002).

No Brasil o substrato representa um baixo custo de produção, entretanto em outros países o custo do meio de fermentação representa um fator crítico sob o aspecto comercial na produção do polissacarídeo. Por esse motivo, vem aumentando muito o interesse por substratos alternativos como, por exemplo, resíduos industriais que podem ser utilizados como uma

alternativa para produção de polissacarídeos diminuindo custos de produção e minimizando problemas ambientais causados pelo seu descarte (ROTTAVA, 2005).

2.2 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS POR FERMENTAÇÃO

A produção de biopolímero depende da composição do meio, da linhagem e das condições de fermentação utilizadas, tais como: temperatura, velocidade de agitação, concentração inicial de nitrogênio. Obtendo-se deste modo uma variação nos rendimentos e na qualidade do polímero, pois influenciam na estrutura molecular e nas propriedades da goma xantana produzida (CASAS *et al.*, 2000; GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

O meio de cultura consiste geralmente de 2-4% glicose ou sacarose como fonte de carbono, 0,05-0,1% de nitrogênio (extrato de levedura, peptona, nitrato de amônio ou uréia), fósforo e traços de outros minerais. O pH deve ser mantido próximo ao da neutralidade (MAUGERI, 2001). O polímero é sintetizado, principalmente ao cessar o crescimento microbiano. Geralmente, a concentração final atinge 20 a 30 g.L⁻¹, com rendimento de 50 a 70% e produtividade típica de 0,5g.L⁻¹.h⁻¹ (LIMA *et al.*, 2001; PORTILHO, 2002).

Segundo GARCÍA-OCHOA *et al.* (2000) o meio de produção ótimo para xantana inclui: sacarose (40 g.L⁻¹), ácido cítrico (2,1 g.L⁻¹), sais de amônia, potássio, magnésio, sódio, zinco, ferro e cálcio, ácido bórico e ácido clorídrico concentrado, sendo o pH ajustado para 7,0. Nitrogênio pode ser fornecido nas formas orgânica ou inorgânica, sendo que a razão C:N usada no meio de produção deve ser menor que a usada durante o crescimento. Glutamato é a melhor fonte de nitrogênio, usada em concentrações de 15 mM. Pequenas quantidades de ácidos orgânicos adicionados ao meio, melhoram a produção (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A relação carbono:nitrogênio no meio de cultura influencia grandemente a produção de goma xantana. Uma elevada concentração de nitrogênio é necessária para um rápido crescimento celular, entretanto, quando a concentração de nitrogênio no meio de cultura for muito elevada, a goma xantana produzida possui propriedades reológicas inadequadas (NITSCHKE *et al.*, 2001).

Para NITSCHKE *et al.* (2001) meios contendo elevado teor de fonte de carbono e baixo teor de nitrogênio favorece o acúmulo de polímero. A goma xantana é produzida como metabólito secundário em processo com duas fases distintas: a fase de crescimento, onde maior concentração de nitrogênio é requerida para o crescimento celular e a fase de produção, onde maior concentração de carbono é necessária, visando o acúmulo de produto.

GARCÍA-OCHOA *et al.* (2000) verificou que nitrogênio, fósforo e magnésio influenciam o crescimento, enquanto nitrogênio, fósforo e enxofre influenciam a produção de goma xantana.

CASAS *et al.* (2000) observou, porém, que a concentração de nitrogênio influencia o aumento de biomassa, primeiramente aumentando conforme aumenta a concentração de nitrogênio, chegando a um máximo quando $1,144\text{g.L}^{-1}$ de NH_4NO_3 são utilizadas, a partir disso ocorre uma diminuição da biomassa com aumento da concentração do nitrogênio. Sobre a produção de goma xantana nenhum efeito foi verificado.

Ácidos orgânicos como succinato, piruvato e α -cetoglutarato tiveram efeito estimulante no crescimento e produção de goma xantana, porém concentrações maiores que 0,3% de piruvato, 0,6% de succinato e 0,4% de α -cetoglutarato mostraram efeitos inibitórios (SOUW e DEMAÏN, 1979).

SOUW e DEMAÏN (1979) utilizaram fosfato de potássio no meio de fermentação alcançando um máximo de produção (25 g/Kg de meio) e de viscosidade na concentração de 50 mM, sendo que acima disso ocorreram decréscimos na produção e viscosidade da goma xantana.

As temperaturas empregadas para a produção de xantana variam de 25 a 34°C. GARCÍA-OCHOA *et al.*, (2000) concluíram que a temperatura ótima para a produção de xantana depende do meio de produção utilizado, sendo esta de 28°C para o meio otimizado por eles. Em temperaturas mais baixas entre 25° e 28°C obtém-se maior conteúdo de acetato do que em temperaturas mais altas compreendidas entre 31° e 34°C. Com aumento da temperatura ocorre também um decréscimo na massa molar média da goma produzida (CASAS *et al.*, 2000).

O pH neutro é apontado pela maioria dos pesquisadores como ótimo para o crescimento da *Xanthomonas campestris*, sendo que este decresce para 5,0 durante a produção de goma xantana, devido aos grupos ácidos presentes no polímero (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000; PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

PAPAGIANNI *et al.* (2001), verificaram que o pH do meio de cultura aumentou durante as fermentações, usando fermentador, quando foi variada a velocidade de agitação, alcançando um máximo de 9,5 quando foi utilizado 600 rpm.

Aeração é requerida para se obter produção de goma em processos fermentativos, aumentos nos níveis de agitação resultam em níveis de produção mais altos, o que ocorre também para o crescimento celular. Em baixas velocidades ocorrem limitações de oxigênio resultando em baixas produções e gomas com baixa massa molar. Os efeitos benéficos do aumento da agitação são atribuídos ao aumento da transferência de nutrientes e oxigênio necessários para a formação de goma xantana (PAPAGIANNI *et al.*, 2001).

A faixa de oxigenação recomendável para a produção de xantana é de 1,5-3,5 mM O₂/minuto, e um bom nível de aeração é requerido para se obter uma boa produção de goma em processos fermentativos, uma vez que ocorre grande aumento da viscosidade do meio ao longo da fermentação (WOICIECHOWSKI, 2001). O tempo de fermentação é de 48 a 96 horas (LIMA *et al.*, 2001).

Na condução de uma fermentação, o preparo do inóculo e a fermentação propriamente dita são as principais fases do processo. Na primeira, multiplica-se o microrganismo em quantidade suficiente e em condições adequadas para assegurar seu desenvolvimento na etapa seguinte (CADMUS *et al.*, 1978; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Durante o desenvolvimento do inóculo o objetivo é aumentar a concentração celular minimizando a produção de goma xantana, pois a goma ao redor das células impede o transporte de nutrientes e estende a fase lag de crescimento (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

A produção de biopolímeros por microrganismos pode ser em meio líquido contendo fonte de carbono e sais minerais, como visto, ou por via enzimática, utilizando enzimas purificadas, sem adição do microrganismo (RODRIGUES, 1989 apud PADILHA, 1997). A fermentação em cultivo submerso é a mais comumente utilizada para obtenção de goma xantana por ser de fácil controle, possibilitando a variação do meio de cultivo, fácil esterilização do meio, aeração estéril menos dispendiosa e a superfície bacteriana fica inteiramente exposta ao meio facilitando as trocas metabólicas (REGULY, 2000 apud PINTO, 2005).

O processo de fermentação pode ser efetuado de maneira descontínua ou contínua. No procedimento descontínuo ou em batelada, o cultivo das bactérias é adicionado ao um meio contendo os substratos necessários ao desenvolvimento do microrganismo e são fornecidas as condições ideais para que as reações ocorram. No momento em que a concentração do produto atingir o valor máximo o processo é finalizado. Em escala laboratorial este método pode ser realizado em agitadores orbitais ou em bioreatores. Nos agitadores orbitais apenas pode-se controlar a temperatura, o tempo e a agitação do processo fermentativo, enquanto que em bioreatores o controle é mais rigoroso sendo possível monitorar outros parâmetros como pH e a concentração de oxigênio dissolvido (TAIT *et al.*, 1986).

Dos poucos resultados publicados visando otimização em biorreator em batelada, o tempo final de fermentação foi normalmente fixado. O objetivo foi maximizar o valor de algumas variáveis de estado avaliadas no tempo final de fermentação, e as variáveis controladas foram temperatura e pH do caldo de fermentação (CACIK *et al.*, 2001).

O grande interesse de produção de goma xantana no país despertou o interesse no desenvolvimento de pesquisas que melhorassem geneticamente as linhagens produtoras de

goma xantana, visando aumentar a sua produção e qualidade. Estudos dos genes responsáveis pela síntese de goma xantana vêm sendo realizados há muitos anos, sempre tendo como enfoque o processo de biossíntese da goma e os fatores que a relacionam com a virulência quando infectam as plantas (PADILHA, 2003).

O conhecimento das vias biossintéticas, bem como de seus mecanismos de controle é importante para aumentar a eficiência de conversão e a produtividade da fermentação, assim como para alterar a massa molar e a composição molecular do polímero (PACE, 1991). A goma xantana é o único biopolímero do qual se conhece a via metabólica e a enzima indutora do processo, sendo que para os demais, esta via tem sido apenas sugerida (RODRIGUES, 1989 apud PADILHA, 1997; GIAVASIS *et al.*, 2000; SÁ-CORREIA *et al.*, 2002).

O caminho de biosíntese da xantana envolve três estágios: (i) conversão do açúcar simples para derivados de nucleotídeos precursores, (ii) união de subunidades de pentassacarídeos ligado à membrana interna portadora de fosfato poliprenol, com adição de grupos acetil e piruvato, e (iii) polimerização das unidades repetidas de pentassacarídeos e secreção do polímero (IELPI *et al.*, 1993 apud SILVA *et al.*, 2001).

Uma qualidade interessante na produção industrial de goma xantana é a versatilidade nutricional da *X. campestris*, a qual pode utilizar diferentes substratos, porém com o inconveniente da variação da massa molar da goma sintetizada, interferindo nas qualidades reológicas e na qualidade do biopolímero sintetizado nestes meios (SUTHERLAND, 1993).

A industrialização e comercialização extensiva da xantana tiveram início a partir de 1964. Atualmente, os maiores produtores de goma são Merck, Kelco e Pfizer nos Estados Unidos, Rhône-Poulenc, Mero-Rousselot-Satia e Sanofi-Elf, na França e Jungbunzlauer na Áustria (GARCÍA-OCHOA, 2000; LIMA *et al.*, 2001).

2.2.1 Substratos utilizados na produção de biopolímeros

A glicose e a sacarose são citadas na literatura como fontes preferenciais de carbono para a produção de biopolímeros (SUTHERLAND, 2002), porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como melaço, resíduo da indústria de soja, soro de leite, casca de café e bagaço de mandioca, água residual de moinho de azeitona, entre outros (LOPEZ *et al.*, 2001; NITSCHKE *et al.*, 2001; WOICIECHOWSKI, 2001; KALOGIANNIS *et al.*, 2003).

Utilizando meios alternativos em processos fermentativos, tais como resíduos agroindustriais, é possível reduzir os custos de produção, além de minimizar problemas

ambientais, pois auxilia na destinação desses resíduos. Diversos trabalhos referentes à produção de biopolímeros utilizam resíduos da agroindústria.

A produção de goma xantana em meios alternativos vem sendo estudada visando melhorias no rendimento e na qualidade da goma produzida com diminuições expressivas nos custos de produção. NITSCHKE *et al.* (2001) estudaram diferentes formulações de meio de cultura a base de soro de queijo (integral, filtrado e hidrolisado) para a produção de goma xantana pelo isolado *X. campestris* C₇L e verificaram que essa linhagem demonstrou capacidade de produzir goma com alta viscosidade em soro de queijo. Em um sistema combinando soro integral e soro filtrado obtiveram um rendimento geral do processo de 55%.

O soro de queijo, resultante da fabricação de queijos vem sendo estudado como uma fonte alternativa para a produção de goma xantana. A produção diária de soro de leite atinge quantidades muito elevadas e seu descarte representa um sério problema ambiental. Possui alto teor de lactose além de proteínas e sais minerais, constituindo um meio de cultura rico e de fácil obtenção (STAUFFER e LEEDER, 1978 apud NITSCHKE *et al.*, 2001).

ANTUNES *et al.* (2000a) estudaram a relação entre viscosidade e composição química da goma xantana sintetizada por *X. campestris* pv *pruni* cepa 06 em meios convencionais MPI, composto por 1,5 g.L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 2,5 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,6 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 2,0 g.L⁻¹ ácido cítrico; 5,0 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 0,006 g.L⁻¹ Bo₃; 2,0 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,0024 g.L⁻¹ FeCl₃; 0,002 g.L⁻¹ ZnSO₄ e 50 g.L⁻¹ de sacarose, e MPII composto por 1,5 g.L⁻¹ NH₄H₂PO₄; 2,5 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 0,2 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O e 50 g.L⁻¹ de sacarose, e em meios alternativos como soro de queijo adicionado de sacarose, soro de queijo adicionado de sacarose e sais e farelo de arroz e soro de queijo adicionado de sais, sacarose e farelo de trigo. Esses autores verificaram que em meios convencionais a goma xantana produzida possui qualidade superior à goma sintetizada em meio de soro de queijo em relação à viscosidade.

A produção de goma xantana a partir de um meio otimizado composto de 175 g.L⁻¹ de melaço, 4 g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e um pH inicial neutro foi estudada por KALOGIANNIS *et al.* (2003). Seus resultados indicaram que o K₂HPO₄ serve como um agente tamponante e também como um nutriente para o crescimento da *X. campestris* e ainda, que o melaço de açúcar de beterraba parece ser um substrato industrial adequado para fermentações desta goma.

Segundo WOICIECHOWSKI (2001) hidrolisados de casca de café pré-tratados ou não, bem como hidrolisados de bagaço de mandioca suplementados com várias fontes de nitrogênio, são substratos viáveis para a produção de goma xantana por fermentação com *X. campestris*. A melhor produção de xantana foi obtida com o uso de nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, com um fator de conversão de substrato em produto da ordem de 75%.

Resíduo de grão de soja, um subproduto da indústria de molho de soja, quando utilizado como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono, na produção de goma gelana, apresentou uma produção maior de goma ($7,5 \text{ gL}^{-1}$) do que em meio convencional que continha peptona e nitrato de amônio como fontes de nitrogênio. A caracterização deste resíduo mostra valores de 17,2% de carboidratos e 33,4% de proteína (JIN *et al.* 2003).

BAE e SHODA (2004) pesquisaram a produção de celulose bacteriana por *Acetobacter xylinum* BPR 2001, usando melaço como fonte de carbono, em processos em batelada e batelada alimentada. Para melhorar a produção de celulose bacteriana, utilizaram o melaço pré-tratado com calor e ácido sulfúrico, obtendo um aumento na concentração de polímero de 76% quando comparado com a produção obtida com melaço que não passou por pré-tratamento.

O maior rendimento de pululana produzido por levedura, 5,9% em 60 horas, 28°C, 180 rpm, foi obtido por CHI e ZHAO (2003), utilizando glicose (8% p/v), hidrolisado de torta de soja (2% p/v), além de sais de potássio, magnésio, sódio e amônio, pH 7,0.

Sabe-se que os meios industriais utilizados para a produção de polissacarídeos são bastante complexos e alguns de seus componentes podem ser responsáveis pela inibição da produção destes, ou ainda, dificultar sua posterior recuperação e purificação (TREICHEL, 2004). Entretanto, contaminantes como metais pesados e inibidores específicos são removidos parcialmente com pré-tratamentos (STOPPOCK e BUCCHOLZ, 1996 apud KALOGIANNIS *et al.*, 2003). Estes pré-tratamentos clarificam o meio sem provocar prejuízos na fermentação, garantindo maior facilidade na extração e purificação de bioprodutos, como mostrado nos trabalhos de TREICHEL (2004) e BAE e SHODA (2004).

2.2.1.1 Soro de Queijo

O soro de queijo é um líquido opaco, amarelo-esverdeado, resultante da precipitação de gorduras e caseína do leite durante a fabricação de queijos. Contém cerca de 55% dos sólidos existentes no leite integral original e representa cerca de 80% a 90% do volume de leite utilizado na fabricação de queijo (ANDRADE e MARTINS, 2002). É o maior subproduto da indústria leiteira e é caracterizado por elevados valores de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), na faixa de $30\text{-}60 \text{ kg/m}^3$. Seu descarte diretamente em rios ou esgotos públicos atualmente não é permitido, mas em média, cada tonelada de soro não tratado despejado por dia

no sistema de tratamento de esgoto equivale à poluição diária de cerca de 470 pessoas (HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005).

Por se tratar de um produto com alta percentagem de água inviabiliza economicamente sua desidratação, e o fato de ser perecível agrava o problema, impossibilitando seu armazenamento prolongado, direcionando as pesquisas a seu aproveitamento na produção de biogás, etanol, proteínas concentradas, além de produção de fermento de panificação e antibióticos (ALMEIDA, *et al.*, 2001).

As aplicações do soro são inúmeras, englobando as indústrias de lácteos, carnes, misturas secas (para condimentar), panificação, chocolate, aperitivos, bebidas, entre outras. Nos Estados Unidos 90% do soro, quando transformado em pó, é destinado à alimentação humana, o que em 2001 representou mais de 500.000 toneladas (CNPGL/EMBRAPA, 2002). Ainda assim, aproximadamente 50% do soro mundialmente produzido já se encontra industrializado. Uma parcela é comercializada como fonte energética e nutritiva sob a forma de pó, pois o mesmo retém aproximadamente 75% dos nutrientes do leite, além de ser responsável por uma parcela que varia entre 80 a 90% de sua composição total (ALMEIDA *et al.*, 2001).

No Brasil o soro de queijo ainda é considerado um produto de qualidade inferior e de pouca importância sob o ponto de vista nutritivo. O RIISPOA (Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – Decreto 30.691/52) considera o soro de queijo como um produto para alimentação animal (CNPGL/EMBRAPA, 2002).

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite bovino, com uma taxa anual de aumento da produção na faixa de 4%. Cerca de 35% da produção é destinada à fabricação de queijos, onde as maiores produções são de queijo mussarela, prato e minas frescal (FARRO e VIOTTO, 2003).

A Tabela 1 apresenta a composição centesimal média do soro de queijo, subproduto utilizado como substrato no presente estudo.

O principal problema encontrado na produção de goma xantana a partir de soro de queijo é a baixa capacidade de utilização da lactose pela *X. campestris*, fato esse que se deve pouca expressão da enzima β -galactosidase da bactéria (NITSCHKE *et al.*, 2001).

As β -galactosidases, popularmente conhecidas como lactases e classificadas como hidrolases, são responsáveis por catalisar o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose para formar glicose e galactose, obtendo assim, alimentos com baixos teores de lactose. As β -galactosidases podem ser encontradas na natureza, distribuídas entre vegetais, em órgãos animais e também são produzidas por grande quantidade de microrganismos, tais como fungos

filamentosos, bactérias e leveduras, sendo as leveduras e fungos as fontes preferidas destas enzimas para aplicações comerciais (SANTIAGO *et al.*, 2004).

Em decorrência de a *X. campestris* ser um microrganismo lactose negativo, ANTUNES *et al.* (2000a) acrescentou outra fonte de carbono ao meio de soro de queijo, que foi a adição de farelo de arroz e trigo que visou elevar a quantidade de carbono e micronutrientes. NITSCHKE *et al.* (2001) utilizaram glicose e galactose concomitantemente e verificaram que não houve preferência do microrganismo por um destes açúcares, já a lactose residual foi consumida mais lentamente.

Tabela 1. Composição centesimal média do soro de queijo.

Componentes	Quantidade
Água (%)	93,39 ± 0,44
Gordura (%)	0,43 ± 0,19
Proteína (%)	0,78 ± 0,25
Lactose (%)	4,90 ± 0,11
Minerais (%)	1,59 ± 0,02
Sódio (%)	0,13
Potássio (%)	0,14
Cálcio (%)	0,12
Fósforo (%)	0,10
Nitrato (ppm)	45
Ferro (ppm)	1

Fonte: Franco (1982); Farro e Viotto (2003)

Ao adicionar glicose ao meio contendo soro de queijo, SCHAWARTZ e BODIE (1986) verificaram que a lactose deixava de ser utilizada pela bactéria *X. campestris*.

Devido às características nutricionais do soro de queijo e sua abundância no Brasil, pesquisas que visem à utilização desse subproduto são de fundamental importância.

Pesquisas mostram a utilização de soro de queijo como meio básico para vários processos fermentativos, como produção de etanol, metano e goma xantana (FU *et al.*, apud HATZINIKOLAOU *et al.*, 2005).

GOLLO (2006) trabalhou com meio à base de soro de queijo mussarela avaliando a influência da adição de sais ao meio na produção de goma xantana. Bons resultados foram

encontrados, demonstrando que a bactéria tem a capacidade de utilizar a lactose presente no meio.

2.3 RECUPERAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

As etapas de recuperação da goma xantana envolvem remoção de células microbianas, precipitação do biopolímero, secagem e moagem. O método específico de purificação a ser utilizado é determinado pelo uso final do polissacarídeo (GALINDO, 1994).

O caldo pode ser esterilizado, após a fermentação, para eliminação das células e para melhorar as características da goma em solução. Uma vez as células eliminadas, a precipitação da goma xantana é feita com álcool ou sais quaternários de amônio ou separada por ultrafiltração (MAUGERI, 2001; LIMA *et al.*, 2001).

O processo de recuperação de goma xantana apresentado por GARCÍA-OCHOA *et al.* (2000) envolve etapas de: desativação ou lise das células, através de processos químicos, mecânicos ou térmicos; remoção das células por filtração; recuperação do polímero por precipitação com solventes orgânicos (etanol, álcool isopropílico, misturas de sais e álcool); separação do precipitado e do solvente, sendo o precipitado lavado várias vezes com o solvente que é evaporado posteriormente; secagem do biopolímero em secadores contínuos ou em batelada, a vácuo ou com circulação forçada de gás inerte.

As células podem ser eliminadas fisicamente através de centrifugação (GIAVASIS *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2003; CHI e ZHAO, 2003; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003; BOZA *et al.*, 2004) ou filtração (KANG *et al.*, 1982; GIAVASIS *et al.*, 2000). Métodos químicos ou enzimáticos podem ser usados como alternativa, complementados com operações posteriores de purificação/ concentração (PACE, 1991; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Os polímeros são recuperados por centrifugação e precipitados preferencialmente com solventes orgânicos solúveis em água como álcool ou acetona (KANG *et al.*, 1982; MARTINS e SÁ-CORREIA, 1993; GIAVASIS *et al.*, 2000; NAMPOOTHIRI *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003; CHI e ZHAO, 2003; BOZA *et al.*, 2004). A quantidade de solvente necessário para a completa precipitação depende da força iônica e da composição do polímero apesar de não depender de sua concentração. A precipitação com solventes também resulta em purificação parcial do polímero por eliminação dos componentes solúveis no solvente (PACE, 1991).

Como métodos alternativos de recuperação primária do polímero, a literatura cita a precipitação seletiva com detergentes catiônicos e ainda a produção de uma forma insolúvel de polímero por adição de certos sais ou por ajuste de pH (PACE, 1991; GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; DRUZIAN, 2000).

Os polímeros precipitados são purificados e secos em estufa, a baixas temperaturas (MOREIRA *et al.*, 2003) ou liofilizados (GIAVASIS *et al.*, 2000) e, então armazenados ou preparados para as análises subseqüentes de determinação da estrutura e reologia. A purificação dos EPS pode ser feita por sucessivas diálises contra água deionizada (CHI e ZHAO, 2003), ou com detergentes catiônicos, pelo uso de métodos cromatográficos ou ainda com agentes químicos ou enzimas que interagem de forma específica com certos grupos (DRUZIAN, 2000).

Segundo PACE (1991) a secagem rápida a altas temperaturas pode resultar em um produto com baixa solubilidade ou com reologia pobre em solução. Porém, o aquecimento controlado da goma xantana pode resultar em um produto com melhor reologia em solução.

O polímero depois de seco pode ser moído, algumas gomas comerciais são diferenciadas por tamanho de partículas. Deve-se ter em conta que na moagem o calor gerado não degrade ou possa descolorir o produto (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

2.4 TOXICIDADE E APLICAÇÕES DA GOMA XANTANA

Os aspectos toxicológicos e de segurança da goma xantana foram investigadas intensamente para determinar sua aplicação em alimentos e fármacos. A goma xantana é um produto atóxico, não provoca sensibilização nem irritação na pele ou nos olhos (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

Os biopolímeros bacterianos, em razão de sua origem, para serem utilizados em produtos para consumo humano devem, além de ter a aprovação prévia dos órgãos competentes, passar por rigoroso controle de qualidade (MOREIRA *et al.*, 1998). A *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA aprovou em 1969 o uso da goma xantana como aditivo em alimentos. Em 1980 a xantana foi agregada à lista de emulsificantes/estabilizantes alimentícios permitidos pela comunidade econômica européia (MORRIS, 1984).

O uso de hidrocolóides em muitas áreas industriais tem aumentado significativamente. A xantana é o polímero de maior importância econômica e sujeito de numerosos estudos (MOREIRA *et al.*, 2001).

A goma xantana tem sido empregada numa variedade de produtos alimentícios devido às suas características, incluindo a estabilização de emulsões, estabilidade térmica, compatibilidade com ingredientes alimentícios e suas propriedades reológicas (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000). Ela encontra aplicações em molhos prontos (*French dressings*), alimentos congelados, suco de frutas e coquetéis, sobremesas instantâneas, produtos cárneos, etc. Fora da indústria de alimentos incluem-se aplicações como agente de suspensão e espessante em pasta de dentes, desodorantes em forma de géis, impressão em tecidos, suspensão de compostos químicos de uso agrícola e aumento na recuperação de petróleo (LIMA *et al.*, 2001; MAUGERI, 2001).

Gomas e estabilizantes são incorporados na formulação de diversos alimentos. Em particular, eles são usados para oferecer resistência a um processo físico indesejado como cristalização, sedimentação gravitacional e desagregação mecânica que podem ocorrer durante a distribuição ou estocagem (MARCOTTE *et al.*, 2001).

Resistência e estabilidade ao congelamento-descongelamento, capacidade espessante, facilidade de cozimento, aderência proveitosa, aumento na penetração de calor e outros efeitos positivos, são reconhecidos quando certos polissacarídeos são misturados e aplicados. Diferentes combinações de polissacarídeos estão sendo aplicadas em pastas de amido, géis, produtos processados de amido, bebidas, produtos lácteos, emulsificados e cremosos, carnes e outros produtos (SOKORA *et al.*, 2006).

A obtenção de biopolímeros para o consumo humano é uma tarefa mais complexa do que para a utilização em outros produtos, uma vez que devem ser considerados seguros do ponto de vista alimentar e, portanto, satisfazer os severos códigos e legislações alimentares, atualmente em vigor. Uma amostra disso é que, apesar da pesquisa em polímeros produzidos por microrganismos ter sido iniciada há mais de três décadas, poucos biopolímeros foram aprovados para uso alimentar nos EUA (PORTILHO, 2002).

2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIOPROCESSOS

O objetivo da engenharia bioquímica é o desenvolvimento de métodos para melhorar a capacidade metabólica de microorganismos industrialmente relevantes. Para alcançar este objetivo é necessário fazer uso de processos de manipulação genética do metabolismo celular e melhorar as condições de operação do processo. Dentro de uma perspectiva de engenharia, o desenvolvimento de modelos matemáticos é uma das mais poderosas ferramentas científicas disponíveis para estas tarefas (WIECHERT *et al.*, 2002).

Com o desenvolvimento científico e industrial de modernos bioprocessos, melhores métodos de medidas, monitoramento e modelagem tornam-se necessários, com o objetivo de gerar informações mais detalhadas sobre o processo, melhorando o controle e o entendimento do mesmo (MANDENIUS *et al.*, 2004). Nos processos biológicos ao menos duas características são bem distinguíveis: o meio de cultivo e a biomassa. As propriedades das células individuais são determinadas pelos mecanismos de transporte da membrana extracelular, a qual separa o meio extracelular do interior das células, e pelos mecanismos de transportes das membranas intracelulares, as quais são responsáveis pelo metabolismo celular. O metabolismo intracelular é caracterizado por um grande número de etapas de reações reguladas por enzimas intracelulares (HAAG *et al.*, 2005).

Em contraste com a alta complexidade do metabolismo celular, modelos matemáticos simples têm sido desenvolvidos, baseados, principalmente, em observações experimentais descrevendo os fenômenos, tais como: limitação, ativação, inibição, saturação, consumo de múltiplos substratos, gargalos do processo, múltiplos estados estacionários. Estes modelos são geralmente válidos para uma limitada, mas freqüentemente ampla faixa de condições operacionais. O nível de complexidade da descrição matemática do sistema depende da aplicação. Se a proposta de controle do sistema é manter o mesmo com pequenas perturbações em torno de um valor constante, geralmente o uso de um modelo linear é suficiente. Porém, mudanças nesse valor de referência necessitariam a derivação de um novo modelo. Em outras aplicações, como no controle de um processo dinâmico, onde há um grande número de condições operacionais, é necessária a formulação de um modelo não linear mais abrangente.

Muito freqüentemente, as propriedades do sistema, tais como constantes de Michaelis ou taxas de reações, não são conhecidas quantitativamente nem qualitativamente. Nesses casos, uma abordagem matemática flexível e sistemática é requerida para encontrar as características do processo. Por outro lado, o modelo deve ser suficientemente geral, com um conjunto de parâmetros capaz de representar bem o fenômeno observado. No entanto, o modelo não deve ter um número excessivo de parâmetros, o que facilita o ajuste aos dados experimentais, porém não confere ao mesmo uma característica geral (HAAG *et al.*, 2005). Um modelo deve ser sempre o mais simples possível e tão complexo quanto o necessário. A complexidade de um modelo crescerá se a abrangência e a eficiência são estendidas. Assim, a complexidade do modelo sempre estará relacionada com o problema a ser resolvido (WIECHERT, 2002).

Segundo VOLESKY e VOTRUBA (1991) a análise do sistema é um método básico para a descrição de fenômenos complexos e interações entre variáveis observadas do processo sob

estudo. Na prática, para um sistema fermentativo, a análise do processo é representada pelas seguintes etapas:

- Especificação matemática do problema para dadas condições físico-químicas, bioquímicas e fisiológicas;
- Desenvolvimento de estratégias detalhadas resultando na obtenção de adequados modelos matemáticos representando o processo;
- Síntese dos resultados e projeto das estratégias de otimização para o controle do processo.

No desenvolvimento de modelos matemáticos de bioprocessos devem-se especificar alguns itens que necessitam serem identificados para melhorar a precisão e qualidade dos modelos, tais como (WIECHERT, 2002):

- Compreensão estrutural: Modelos matemáticos devem fornecer todas as informações para que se possa conhecer o comportamento do processo, principalmente, partes essenciais do sistema;
- Simulação: A maior aplicação dos modelos é a exploração do possível comportamento do sistema. A simulação do processo pode levar ao correto entendimento do comportamento do processo, eliminando hipóteses que possam reproduzir resultados ruins;
- Análise do sistema: Baseado num dado modelo matemático é possível obter informações da estrutura do sistema e seu comportamento qualitativo;
- Predição e Projeto: Baseado num modelo validado, experimentos futuros podem ser previstos sem a realização dos mesmos. O objetivo desta ferramenta é fornecer embasamento para um projeto racional e eficiente do bioprocessos;
- Otimização: Uma vez que os modelos são preditivos e estão disponíveis, o último objetivo da engenharia bioquímica é o cálculo de um projeto metabólico ótimo.

2.6 MODELOS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

O desenvolvimento de um modelo matemático de um processo fermentativo normalmente inicia a partir de um simplificado esquema de reações advindas do conhecimento das rotas metabólicas envolvidas. Cada etapa da reação metabólica é caracterizada pela reação estequiométrica ou pelo fluxo, representada pela velocidade de reação ou pela taxa. As taxas de

reações em bioprocessos são aproximadas por relações originadas da teoria enzimática ou reações químicas (VOLESKY e VOTRUBA, 1991).

Na literatura são reportados diversos modelos de crescimento microbianos não estruturados e não segregados, ou seja, que consideram uma população homogênea de células com propriedades médias. Os modelos cinéticos não estruturados são equações matemáticas propostas para representar a velocidade específica de crescimento (μ), dispondo de poucas informações a cerca do metabolismo microbiano. De uma maneira geral, os modelos cinéticos são funções da concentração de substrato limitante. No entanto, alguns modelos propostos levam em conta a concentração de células dentro do biorreator, concentração de produto e concentração de inibidor (VOLESKY e VOTRUBA, 1991).

Os modelos cinéticos de crescimento microbiano são divididos em três grandes grupos: único substrato limitante, inibição por substrato e inibição por produto. Dependendo das condições operacionais, do microorganismo, e da forma de operação do bioprocessos, um ou outro modelo apresenta um melhor desempenho. No entanto, é necessário investigar qual o melhor modelo para representar o processo em estudo, uma vez que existem inúmeros modelos não estruturados. Muitos trabalhos publicados têm por objetivo selecionar o melhor modelo cinético.

BIROL *et al.* (1998), trabalhando com a produção de etanol a partir de fermentação de glicose em processo batelada através de células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*, testou onze modelos diferentes encontrados na literatura para cultivo com células suspensas livres e a aplicabilidade destes modelos para cultivos com leveduras imobilizadas. Os autores verificaram que os modelos de Monod e de Hinshelwood foram os mais apropriados para descrever o comportamento do crescimento microbiano em concentrações de glicose inicial de 8 a 10%.

ZELIC *et al.* (2004) investigaram a influência de 10 modelos cinéticos não estruturados no ajuste do crescimento celular, consumo de substrato e formação de piruvato através de *Escherichia coli* YYC202 em biorreator batelada alimentada. O modelo que melhor descreveu o processo levava em conta a inibição pela formação de produto.

BURHAN *et al.* (2005), objetivando aumentar a escala de produção da enzima ciclodextrina-glucanotransferase (CGTase), determinaram o modelo cinético que melhor representasse o processo. Foram investigados dois modelos cinéticos com inibição pelo substrato: modelo de Andrews e modelo de Aiba. Os resultados apresentados mostraram que o modelo de Andrews melhor representa os dados experimentais, sendo escolhido como o modelo cinético do processo de produção da CGTase.

2.7 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

A otimização matemática pode ser usada como uma ferramenta computacional que surgiu para encontrar a melhor solução para um dado problema num caminho sistemático e eficiente (MOLES *et al.*, 2003). A otimização de processos é uma das áreas da engenharia que mais cresce, devido ao seu grande impacto de mercado, tanto para indústrias quanto para centros de pesquisas. A principal razão que motiva o emprego das técnicas de otimização é o fato que muitos problemas apresentam muitas soluções e, portanto, é muito difícil encontrar a melhor solução (BIEGLER e GROSSMANN, 2004a). No contexto de sistemas bioquímicos, o acoplamento da otimização com módulos de simulação abre muitas possibilidades. As duas principais aplicações das ferramentas de otimização podem ser descritas como (MOLES *et al.*, 2003):

- Resolução de problemas de projeto: como melhorar uma rota metabólica de forma que maximize a produção de um determinado produto de interesse e minimize a produção de produtos indesejáveis;
- Estimação de parâmetros: Dado um conjunto de dados experimentais, ajustar o modelo de tal forma que reproduza os resultados da melhor maneira possível.

A otimização contínua, de variáveis ou de parâmetros, é apresentada na seguinte forma geral (BIEGLER e GROSSMANN, 2004a):

$$\begin{array}{ll} \text{Minimizar à } F(x), \text{ sujeita à:} & \begin{array}{l} h(x) = 0 \\ g(x) \leq 0 \end{array} \end{array} \quad (\text{II.1})$$

Em engenharia bioquímica, os problemas de otimização normalmente trabalham com funções não convexas e com múltiplos estados estacionários. A estimação de parâmetros cinéticos de modelos biológicos é geralmente muito complexa, principalmente devido a não-linearidade do sistema, grande número de parâmetros e interações entre eles, além do pouco conhecimento inicial sobre os coeficientes estequiométricos (RIVERA *et al.*, 2006). Uma abordagem sistemática é necessária para encontrar a melhor estrutura do modelo e o melhor conjunto de valores para os parâmetros desse modelo, com relação a algumas restrições (HAAG *et al.*, 2005).

A estimação de parâmetros de sistemas dinâmicos não lineares está baseada na minimização da FO, a qual determina o quão bom está o ajuste do modelo em relação aos dados experimentais, sujeita as restrições da dinâmica do sistema (conjunto de equações diferenciais) e

a outras restrições (equações algébricas). Matematicamente, a formulação do problema de estimação de parâmetros pode ser definida como (MOLES *et al.*, 2003):

Encontrar $\mathbf{p}$ que minimize:

$$J = \int_0^{t_f} (\mathbf{y}_{\text{exp}}(t) - \mathbf{y}(\mathbf{p}, t))^T W(t) (\mathbf{y}_{\text{exp}}(t) - \mathbf{y}(\mathbf{p}, t)) dt \quad (\text{II.2})$$

Sujeita à:

$$\mathbf{f}(\mathbf{z}, \mathbf{y}, \mathbf{p}, t) = 0 \quad (\text{II.3})$$

$$\mathbf{y}(t_0) = \mathbf{y}_0 \quad (\text{II.4})$$

$$\mathbf{h}(\mathbf{z}, \mathbf{y}, \mathbf{p}) = 0 \quad (\text{II.5})$$

$$\mathbf{g}(\mathbf{z}, \mathbf{y}, \mathbf{p}) \leq 0 \quad (\text{II.6})$$

$$\mathbf{p}^L \leq \mathbf{p} \leq \mathbf{p}^U \quad (\text{II.7})$$

onde J é a FO a ser minimizada, $\mathbf{p}$ é o vetor dos parâmetros a serem estimados, $\mathbf{y}_{\text{exp}}$ é o vetor dos dados experimentais, $\mathbf{y}(\mathbf{p}, t)$ é o vetor das variáveis de estado calculados pelo modelo, $\mathbf{z}$ é o vetor diferencial das variáveis de estado, $\mathbf{f}$ é o conjunto de equações diferenciais e algébricas descrevendo a dinâmica do sistema e $\mathbf{h}$ e $\mathbf{g}$ são as restrições de igualdade e desigualdade que estão relacionadas com restrições de rota metabólica ou restrições físicas. Finalmente, $\mathbf{p}$ é mantido dentro de um limite inferior e superior, $\mathbf{p}^L$ e $\mathbf{p}^U$, respectivamente.

A formulação acima com restrições algébrico-diferenciais forma um problema de programação não linear. Devido a esta natureza não linear e restrita da dinâmica do sistema, estes problemas apresentam com frequência mínimos locais, apresentado uma FO não convexa. Dessa forma, a resolução desse problema através de métodos locais, provavelmente, a solução encontrada será de natureza local (MOLES *et al.*, 2003). Uma solução para esse impasse é o emprego de métodos globais para a resolução desse problema, os quais foram amplamente estudados a partir dos anos 90. Muitos trabalhos publicados retratam as inúmeras vantagens desses métodos em relação aos métodos de otimização local.

Métodos de otimização global podem ser classificados em dois grandes grupos: determinísticos e estocásticos. Métodos estocásticos trabalham com uma abordagem probabilística, ou seja, há o envolvimento de elementos aleatórios, estes métodos somente têm uma garantia teórica de convergência para a solução global (MOLES *et al.*, 2003; BIEGLER e GROSSMANN, 2004b). A principal vantagem dos métodos estocásticos é a facilidade de implementação e são muito usados em problemas onde há poucas avaliações da FO. Soluções refinadas requerem um alto custo computacional (BANGA *et al.*, 2005). Uma vasta revisão

bibliográfica contemplando os métodos estocásticos pode ser encontrada em SCHWAAB (2005).

Métodos determinísticos são aqueles que provém um nível de garantia que o ótimo global será encontrado. Estes métodos apresentaram avanços importantes em certos tipos de problemas de otimização global. Porém, deve ser notado que, apesar dos métodos determinísticos poderem garantir encontrar o ótimo global de alguns tipos de problemas, o esforço computacional associado aumenta rapidamente (freqüentemente exponencialmente) com o tamanho do problema, tornando difícil a sua utilização prática e o seu fácil entendimento dentro da indústria (MOLES *et al.*, 2003).

Entre as técnicas estocásticas de otimização global, o método de *Simulated Annealing* (SA) é, talvez, o mais empregado para uma ampla faixa de aplicação nas mais diferentes disciplinas (GENOVESE *et al.*, 20005). O SA é um método de busca direto que pode ser conectado a pacotes de simulação disponíveis. Assim, a otimização pode ser realizada ao longo de sucessivas simulações. O SA tem sido empregado no projeto e controle de processos químicos, biológicos e alimentícios, mas sua integração com softwares comerciais ainda não foi reportada na literatura (LI *et al.*, 2000).

O método do SA foi desenvolvido em 1980 por KIRKPATRICK *et al.* (1983) e é consideravelmente mais simples que abordagens baseadas no gradiente. Particularmente, o SA tem um número de abordagens promissoras (FABER *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2000):

- O algoritmo somente usa o valor da função objetivo, sem o uso de derivadas;
- O algoritmo tem um grande potencial de encontrar o ótimo global;
- Sua complexidade é baixa;
- O método não é afetado pela descontinuidade do modelo.

FABER *et al.* (2005) apresentam dois estudos de caso da aplicação do SA na otimização de processos. No primeiro estudo de caso é apresentada a otimização dinâmica de um reator batelada visando maximizar a produção de um produto B qualquer. Os resultados mostraram que o SA encontra o mínimo global com um número menor de iterações, quando comparado com os métodos determinísticos.

KOOKOS (2004) usou o *simulated annealing* para encontrar o perfil ótimo da vazão de alimentação num biorreator batelada alimentada para a produção de etanol. Além disso, apresenta a possibilidade de utilizar o SA para maximizar o potencial econômico da produção de penicilina. No primeiro caso os resultados obtidos foram significativamente melhores que os

reportados na literatura. No segundo caso o SA exibiu uma excelente robustez e a solução foi facilmente encontrada apesar da complexidade da função objetivo.

No trabalho de LI *et al.*, (2000) o SA foi acoplado a uma rotina de simulação de processos para determinar a operação ótima de uma coluna de destilação de uma solução binária. O desenvolvimento desta abordagem permitiu a predição da taxa de refluxo minimizando o tempo de operação para a recuperação do produto.

O uso do SA em bioprocessos está restrito basicamente à determinação do perfil ótimo de alimentação em biorreatores operando no modo batelada alimentada. No entanto, há uma carência muito grande do emprego do SA para a otimização de parâmetros cinéticos do sistema de equações algébrico diferencial em processos biológicos.

O *simulated annealing* pode ser usado para otimizar problemas que envolvem equações algébrico-diferenciais (DAE) na forma de (II.2-II.7) se algumas etapas forem entendidas. Um algoritmo para a resolução de DAE deve ser acoplado ao SA, com as variáveis de controle necessitando serem discretizadas e os limites e as restrições de desigualdade necessitando serem implementadas (FABER *et al.*, 2005).

2.8 REDES NEURAIS

A aplicação de redes neurais na modelagem e controle de processos vem aumentando muito nos últimos anos. Seu uso é especialmente útil na modelagem de sistemas complexos ou que apresentam alguma incerteza quanto à cinética ou parâmetros do modelo. Em indústrias químicas e alimentícias, modelos não lineares são requeridos para controle, otimização e predição do comportamento de processos. O desenvolvimento desses modelos é uma tarefa difícil, principalmente quando o processo é muito complexo ou quando o mesmo é pouco compreendido. A maior vantagem em elaborar um modelo matemático com redes neurais artificiais reside no fato que sua síntese não requer o conhecimento detalhado do processo. Tipicamente, o principal objetivo em desenvolver modelos com redes neurais é o de prever de forma confiável comportamentos transientes e permanentes, de forma a monitorar e melhorar a performance do processo (SIMÕES, 2001).

Redes neurais são métodos matemáticos baseados na estrutura neurológica do cérebro utilizada para criar modelos de entrada/saída do tipo “caixa preta”. Trata-se, portanto de uma técnica de inteligência artificial, cuja característica é o “aprendizado” de uma lógica existente num determinado conjunto de dados e com isso ser capaz de prever valores diferentes

daqueles utilizados para o treinamento da rede (SIMÕES, 2001). Os modelos são construídos juntando-se várias funções em camadas ou níveis. Estas funções são chamadas de neurônios e são funções não lineares da combinação linear de entradas (SALAS, 2003).

Cada função ou neurônio tem vários parâmetros que necessitam serem ajustados, para que a rede possa representar devidamente o modelo. O ajuste destes parâmetros é feito treinando-se a rede neural com dados de entrada e saída do sistema a ser modelado. Os parâmetros são ajustados de modo a reproduzir o sistema a ser modelado, utilizando-se uma técnica de otimização que tem como variáveis independentes os parâmetros e, como função objetivo, a minimização do erro entre o valor de saída medido do sistema e o valor calculado pela rede (SALAS, 2003).

Uma vez atendidos os critérios para o ajuste dos parâmetros, o modelo reproduzirá o comportamento do sistema. No entanto, ressalta-se que a falta de condições para a extrapolação dos dados é uma das principais desvantagens da utilização de redes neurais (SALAS, 2003).

Na definição da arquitetura do modelo podem ser utilizados três tipos de ligações entre neurônios: ligações entre neurônios de uma mesma camada; ligações entre neurônios de camadas diferentes e ligações recorrentes do próprio neurônio. A arquitetura da rede mais utilizada para modelagem de processos químicos, alimentícios e biotecnológicos é a do tipo *feedforward*, com conexão de neurônios de um nível anterior para o posterior. Uma rede neural típica apresenta três camadas de neurônios: camada de entrada (*input*), intermediária (*hidden*) e de saída (*output*). A Figura 2 apresenta um diagrama esquemático de uma arquitetura de rede do tipo *feedforward* com 3 entradas, 4 neurônios na camada intermediária e 3 saídas (SALAS, 2003).

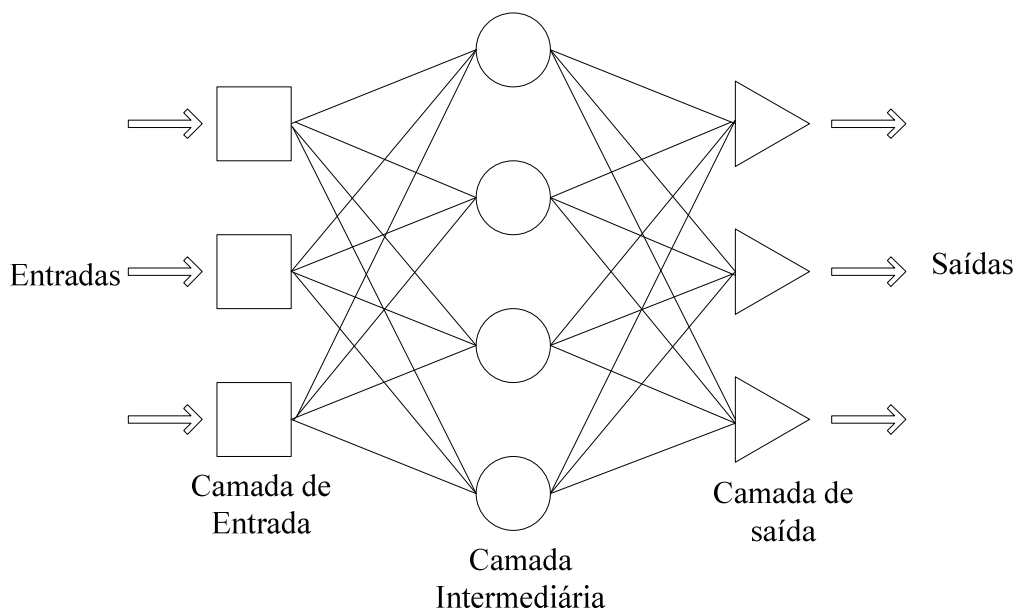


Figura 2. Estrutura de uma rede neural do tipo *feedforward*

As redes neurais encontraram nos processos biotecnológicos uma vasta área de atuação, devido à dinâmica altamente complexa e não linear. LINKO *et al.* (1997) usaram três diferentes funções de transferência na estimação da atividade de lipase. Com a tangente hiperbólica como função de transferência e variando o número de neurônios na camada intermediária de 5 – 9 houve pouca diferença nos resultados; com uma função sigmoideal mono-polar, 5 neurônios apresentaram melhor efeito; com uma função sigmoideal bipolar 9 neurônios apresentou melhores resultados. No entanto, o R^2 foi próximo a 0,9 em todos os casos.

YE *et al.* (1994) usaram uma rede neural com 5 camadas em combinação com controle *fuzzy feedforward-feedback* de um biorreator batelada alimentada contendo *Escherichia coli* para a produção de β -galactosidade. A mudança no pH do meio de cultura e o crescimento específico foram usados com entrada para a rede neural *fuzzy* calcular a taxa de alimentação de glicose.

BAS *et al.* (2007a) descreveram a aplicação de redes neurais para a determinação da cinética de reações enzimáticas e estimar constantes cinéticas. Uma reação enzimática modelo, a hidrólise da maltose catalisada pela amiloglucosidade, foi realizada num reator batelada. As redes neurais foram treinadas com dados de sete cinéticas e a validação foi realizada com 8 cinéticas. Os resultados obtidos mostraram que as redes neurais foram eficientes na estimação de parâmetros, apresentando melhores resultados em comparação com o método convencional. BAS *et al.* (2007b) usaram redes neurais para estimar a taxa de reação enzimática sem a

existência de um modelo cinético. O estudo foi realizado no mesmo sistema descrito acima. A rede neural usada foi do tipo *feedforward* com três entradas, 4 neurônios na camada interna e uma saída. Os resultados obtidos mostraram boa eficiência das redes na regressão dos dados experimentais, apresentando um coeficiente de regressão superior a 0,90 para todas as cinéticas.

DESAI *et al.* (2005) usaram redes neurais para modelar o crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* e a produção de β -glucano. As entradas para a rede foram: concentração de glicose, peptona, extrato de levedura, extrato de malte, Mn^{2+} e Mg^{2+} . O erro encontrado entre os valores preditos e experimentais foi inferior a 5% para as duas variáveis de estado.

2.9 MODELOS HÍBRIDOS

Genericamente, um modelo fenomenológico pode ser uma ferramenta poderosa devido a sua ampla faixa de aplicabilidade. Contudo, a necessidade de estimar um grande número de parâmetros e resolver complexos sistemas de equações constitui uma grande desvantagem na sua aplicação (SIMÕES, 2001).

O modelo híbrido busca superar as desvantagens apresentadas nos modelos fenomenológicos e puramente empíricos. A modelagem híbrida visa à fusão de todo o conhecimento do processo com a metodologia das redes neurais. O conhecimento pobre ou desconhecimento de propriedades do processo, como cinéticas reacionais, podem ser minimizados, ou superados, com a adição de metodologias de inteligência artificial, como as redes neurais (SIMÕES, 2001).

A inclusão prévia do conhecimento é investigada como uma maneira de melhorar as predições da rede. O conhecimento prévio do sistema, nesse caso, são as equações do balanço dos fenômenos que se quer representar. A utilização desse modelo fenomenológico, juntamente com uma rede neural, ajuda a controlar a precisão dos resultados dentro da faixa de aceitabilidade de treinamento da rede. De acordo com a literatura, a utilização de conhecimentos prévios aumenta a capacidade de generalização do modelo puramente neural. Sabe-se ainda que a modelagem híbrida necessita de menos dados para a estimativa de parâmetros, produz predições mais consistentes e precisas, além de fornecer predições mais realísticas (SIMÕES, 2001).

ZORZETTO *et al.* (2000) apresentaram uma comparação entre o emprego de redes neurais e modelos híbridos na modelagem do processo de produção de cerveja. Um modelo fenomenológico foi usado para simular o comportamento de uma planta real, sendo adicionados

níveis de ruídos aos dados gerados para o modelo com o objetivo de tornar os mesmos mais reais possíveis. Primeiramente, foram usadas 2 redes neurais distintas para modelar o processo. No segundo momento, as equações de balanço foram incorporadas em cada um dos dois modelos baseados nas redes, com o objetivo de gerar modelos híbridos. As redes neurais foram usadas para estimar a taxa de crescimento microbiano. O modelo híbrido apresentou melhores resultados comparados com as redes neurais puras ou modelo fenomenológico.

TEIXEIRA *et al.* (2005) desenvolveram um modelo híbrido com objetivo de minimizar as complexidades do metabolismo do BHK-21 e otimizar o estudo. Devido às incertezas apresentadas pelo modelo cinético, as redes neurais foram usadas em paralelo para fornecer um fator de correção desse desvio. Sendo assim, a taxa de reação era fornecida para as equações fenomenológicas. Os resultados obtidos foram satisfatórios, mostrando que o uso de redes neurais como uma alternativa de correção de desvios do modelo cinético do processo é interessante.

COSTA *et al.* (1999) propuseram um modelo híbrido, combinando as equações de balanço de massa com redes neurais do tipo FLN (*Functional Link Networks*) para estimar a taxa de reação da produção de penicilina e etanol em biorreator do tipo batelada alimentada. O modelo híbrido conseguiu prever a dinâmica do processo com precisão.

SILVA *et al.* (2000) propuseram o desenvolvimento de um modelo híbrido como uma alternativa de medidas diretas de processos fermentativos. O processo estudado foi à produção de cefalosporina C em biorreator batelada alimentada. As equações de balanço de massa foram acopladas a uma rede neural do tipo *feedforward*, onde a rede foi usada para estimar o crescimento celular e a taxa de formação de produto, as quais são inseridas nas equações de balanço. Os resultados obtidos encorajam o uso de modelos híbridos no desenvolvimento de algoritmos de controle de processos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO

Para produção da goma xantana foi utilizada uma linhagem da bactéria *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, obtida a partir da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico – Campinas – SP. Este microrganismo foi utilizado por já ter sido avaliado pelo grupo de pesquisa Processos Tecnológicos e Biotecnológicos da URI-Campus de Erechim como bom produtor da goma xantana utilizando soro de queijo como substrato (Gollo et al., 2006).

A linhagem foi mantida em meio YM (Yeast Malt), contendo (g.L⁻¹): extrato de levedura 3,0; extrato de malte 3,0; peptona 5,0; glicose 10,0; agar 20,0; água destilada q.s.p.; pH 7,2 (JEANNES *et al.*, 1976). Meio YM líquido acrescido de glicerol (agente crioprotetor) foi utilizado para armazenamento da cultura a -80°C com a finalidade de preservar a cultura e diminuir o risco de alteração no perfil genético (ROTTAVA, 2005). Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica. A linhagem inoculada em ágar YM foi incubada para o crescimento celular em estufa por 24 horas a 28°C ± 2°C e, após este período, armazenadas a 4°C. Foram realizados repiques a cada 30 dias. Através de semeadura em estrias, em ágar YM, foi possível caracterizar visualmente as colônias de *X. campestris* estudadas verificando algumas de suas características morfológicas.

3.2 PRODUÇÃO DE CÉLULAS

A produção de células foi realizada em duas etapas. Primeiro preparou-se um pré-inóculo, partindo de três alçadas de cultura crescida sobre ágar YM e incubada em estufa por 24 a 48 horas, até atingir uma DO_{560nm} entre 3,0 a 4,0, a 28° ± 2°C. Esta foi inoculada em 50 mL de meio YM líquido, em erlenmeyer de 250 mL, incubado em agitador orbital, a 120 rpm, 28°C ± 2°C, até atingir uma DO_{560nm} entre 3,0-4,0, o que ocorre entre 22 a 26 horas.

Transcorrido este período, preparou-se o inóculo, através da transferência asséptica de 2 mL de pré-inóculo para erlenmeyeres de 300 mL, contendo 100 mL de meio YM líquido e incubou-se em agitador orbital, 120 rpm, a 28°C ± 2°C, até DO_{560nm} entre 3,0 a 4,0, que correspondem ao ótimo da fase de crescimento exponencial do microrganismo. Essa faixa de

absorbância é atingida em aproximadamente 20 a 24 horas de incubação e corresponde a uma concentração celular em torno de 10^8 UFC/mL.

3.3 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO

A curva foi realizada em triplicata, a partir da transferência asséptica de 2 mL de inóculo inicial ($DO_{560nm} = 3,5$) em 100 mL de meio YM líquido. Este foi incubado em agitador orbital, com agitação de 120 rpm, $28^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. Foram retiradas amostras a cada 4 horas, de forma asséptica, para verificação do crescimento microbiano.

O crescimento celular foi avaliado através da leitura de absorbância, em comprimento de onda de 560 nm, em espectrofotômetro, contra um branco constituído do meio YM sem inóculo; e do plaqueamento em ágar YM através da técnica do *pour-plate*. As curvas de crescimento microbiano foram construídas a partir dos dados de absorbância e contagem total de células.

3.4 SORO DE QUEIJO

O soro de queijo mussarela utilizado neste trabalho foi cedido pelo laticínio da COCEL (Cooperativa Central do Alto Uruguai) em Erechim – RS. O soro de queijo foi utilizado líquido e logo após coletado. Em cada um dos experimentos retirou-se uma amostra de soro de queijo para monitorar as características pH (IAL, 1985), acidez total, gordura, proteína e lactose (Tronco, 1997). O soro era coletado em condições reais do processamento do queijo, a aproximadamente 40°C , sendo armazenado sob refrigeração e utilizado para análises e para fermentação no mesmo dia.

3.5 PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

Para os ensaios de produção de goma xantana, foi utilizado meio industrial à base de soro de queijo obtido a partir de queijo mussarela. Foi utilizado um biorreator de bancada (Figura 3) de 2,5 L (BIOSTAT[®] B – B. Braun Biotech International GmbH), contendo 900 mL de meio de fermentação composto por: soro de queijo, 0,1 % (m/v) sulfato de magnésio e 2 % (m/v) fosfato de potássio, referentes às concentrações otimizadas para produção de goma xantana em

agitador orbital, conforme descrito por GOLLO et al. (2006). O pH inicial do meio foi ajustado para 7,2 e mantido livre durante a fermentação. O meio foi autoclavado a 121°C/15min. Ao meio de fermentação foi adicionado 100 mL de inóculo sendo, portanto, o volume final utilizado nos experimentos de 1000 mL.

Foram realizados 11 experimentos com acompanhamento cinético, sendo variadas as condições de aeração e agitação conforme descrito na Tabela 2. Todos os ensaios foram realizados a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, sendo retiradas amostras a cada 12 horas (GOLLO et al. 2009). As respostas avaliadas foram produção de biopolímero, células, açúcares redutores totais, oxigênio dissolvido e pH.

Tabela 2. Condições experimentais avaliadas no estudo cinético realizado.

Ensaio	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)
1	0,5	180
2	2,5	180
3	0,5	600
4	2,5	600
5	0	410
6	2,9	410
7	1,5	101
8	1,5	693
9	1,5	390
10	1,5	390
11	1,5	390

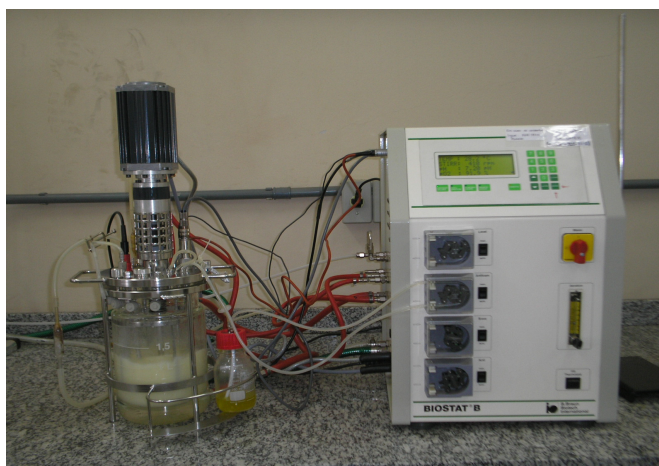


Figura 3. Ilustração do aparato experimental utilizado no estudo da produção da goma xantana

3.6 RECUPERAÇÃO DO BIOPOLÍMERO

A recuperação do biopolímero do caldo fermentado foi realizada através centrifugação a 9625 x g por 30 minutos a 4°C, para a sedimentação das células. As células sedimentadas foram colocadas em placas de petri previamente pesadas e secas em estufa, a uma temperatura de 50-60°C $\pm$ 5°C, até massa constante, aproximadamente 24 horas, sendo calculada a massa seca de células para o volume total de caldo (GIAVASIS *et al.*, 2003).

Após a retirada das células, ao sobrenadante que continha o polissacarídeo, foi adicionado etanol 92,6°GL (1:4 v/v) para precipitação da goma. Essa solução foi armazenada sob refrigeração $\pm$ 4°C, durante 24 horas. Transcorrido o tempo de refrigeração, as amostras foram centrifugadas a 9625 x g, durante 30 minutos, a 4°C, para recuperação do biopolímero precipitado. O precipitado foi colocado em placas petri - previamente pesadas - e seco em estufa (50°C/24 horas) até massa constante. A massa seca foi ressuspensa em água ultrapura (sistema milli-Q, milipore) e liofilizadas. O polissacarídeo liofilizado foi armazenado em frascos plásticos vedados. Para realização das análises reológicas (viscosidade aparente), o polissacarídeo foi dialisado por 48 horas contra água ultrapura estéril, sendo novamente liofilizado e armazenado em frascos vedados (PACE, 1991; FIALHO, *et al.*, 1999).

3.7 FORMULAÇÃO DO PROBLEMA DE MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

O desenvolvimento de um modelo matemático para qualquer processo depende da maneira como são coletados os dados experimentais que serão usados na estimação de parâmetros. No caso deste trabalho, onde foi avaliado a influência da agitação e aeração sobre o consumo de lactose, crescimento microbiano e produção de goma xantana, inviabiliza a proposição de um modelo puramente fenomenológico para o processo, o qual é baseado nas equações de balanço de massa mais o modelo cinético de crescimento. A dificuldade reside no fato que a condição inicial (em termos de concentração de células, lactose e goma) é sempre a mesma em todos os experimentos, não sendo possível avaliar o efeito das variáveis operacionais estudadas.

Por outro lado, a aplicação de um modelo puramente empírico baseado em redes neurais é inviável, devido à baixa quantidade de dados experimentais coletados. Conforme já apresentado

na revisão deste trabalho, as redes neurais apresentam como principais desvantagens a necessidade de grande quantidades de dados para o seu treinamento e a baixa capacidade de extrapolação. Uma alternativa é combinar as duas estratégias no desenvolvimento de um modelo híbrido.

O modelo híbrido consiste em agrupar numa única abordagem as vantagens da modelagem fenomenológica e as vantagens das redes neurais. As equações do balanço de massa governam o comportamento do sistema e as redes neurais fornecem os valores dos parâmetros para os modelos. A Figura 4 apresenta um diagrama esquemático do funcionamento do modelo híbrido empregado neste trabalho. Por exemplo, para calcular o valor das variáveis de estado (X , S , P) em $t + \Delta t$ é necessário fornecer para a rotina de integração numérica uma condição inicial (X_0 , S_0 , P_0) e o valor de μ (o qual é dependente de X , S , P). Os valores das variáveis de estado são fornecidos pelo usuário (quando é condição inicial) ou pela própria rotina de integração, sendo calculados e re-alimentados no programa. Tanto a equação para μ quanto as equações de balanço são dependentes de um conjunto de parâmetros cinéticos. Esses parâmetros serão calculados pelas redes, a partir de um conjunto de dados de entrada, e fornecidos para a rotina de integração numérica.

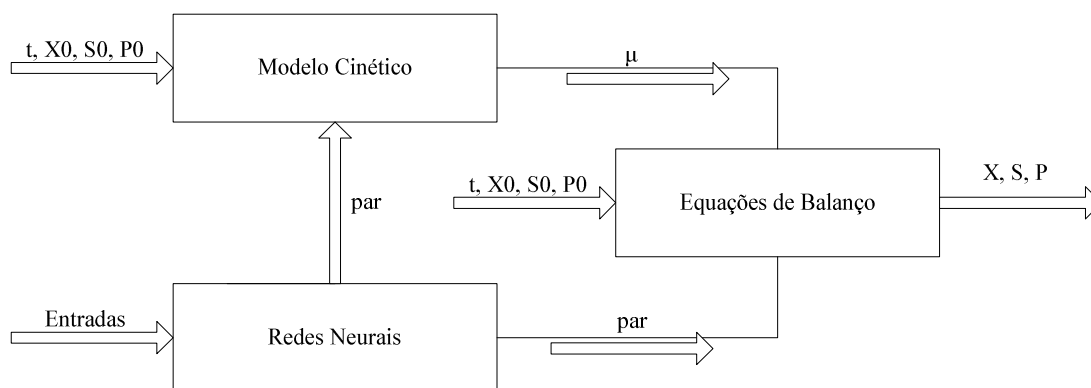


Figura 4: Diagrama esquemático do funcionamento do modelo híbrido

3.7.1 Parte Fenomenológica

A parte fenomenológica do modelo híbrido que descreve a produção de goma xantana em biorreator batelada é baseada nas seguintes hipóteses:

- O biorreator é considerado como um tanque de mistura perfeita;

- O balanço energético foi desconsiderado, uma vez que todo o processo foi realizado sob um rígido controle de temperatura;
- O único substrato limitante no meio é a concentração de lactose. Todos os outros nutrientes, tais como: nitrogênio, fosfato e fatores de crescimento foram considerados em excesso, não sendo incluídos nas equações de balanço;
- O crescimento celular ocorre exclusivamente devido ao consumo de lactose;
- A produção de goma xantana é parcialmente associada ao crescimento microbiano;

O modelo matemático proposto consiste de um conjunto de equações algébrico-diferenciais levando em consideração o crescimento microbiano (X), o consumo de substrato (S) e a produção de goma xantana (P), conforme descrito pelas seguintes equações:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \mu X \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = (\alpha\mu + \beta)X \quad (3)$$

De acordo com simulações preliminares foi verificado que o modelo cinético de crescimento microbiano que melhor representou o processo foi o modelo de Contois, sendo descrito conforme:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s X + S} \quad (4)$$

3.7.2 Parte Empírica

A rede proposta neste estudo é uma rede do tipo *feedforward*, a qual é composta por três camadas denominadas de camada de entrada, intermediária e de saída. O número de neurônios na camada de entrada será definido como sendo igual ao número de variáveis de entrada; o número de neurônios na camada intermediária será definido por tentativa e erro, buscando-se o número mínimo de neurônios que fornece o menor erro quadrático e, ao mesmo tempo, que apresente resultados satisfatórios; a camada de saída será composta por 5 neurônios, os quais correspondem aos parâmetros do modelo. A função de ativação usada na aplicação de redes

neurais no modelo híbrido será a tangente hiperbólica. Como a função de transferência usada neste trabalho apresenta respostas normalizadas entre -1 e 1, os dados de saída da rede, ou seja, os parâmetros do modelo foram denormalizados, conforme apresentado na tabela seguinte. A Tabela 6 apresenta os limites máximos e mínimos para cada parâmetro do modelo. Os mesmos limites apresentados na Tabela 6 foram usados para a denormalização dos parâmetros da rede.

Tabela 3: Limites dos Parâmetros usados na denormalização das saídas da rede neural

Parâmetros	Limite Inferior	Limite Superior
$Y_{x/s}$ (-)	0,0	0,65
α (U.mL ⁻¹)	0,0	10,0
β (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	0,0	10,0
$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	0,0	1,0
k_s (g.L ⁻¹)	0,0	10,0

Os dados de entrada que serão utilizados para o treinamento da rede são: tempo de fermentação, agitação e aeração, as quais são as variáveis manipuladas do processo de produção de goma xantana. O número de neurônios da camada intermediária foi determinado por tentativa e erro, sendo considerado o número de unidades que possibilitou a obtenção do menor valor da função objetivo.

No modelo híbrido, a rede fornece o valor dos parâmetros do modelo. Ou seja, os pesos e bias são otimizados de maneira que se encontre o conjunto de parâmetros ótimos que minimize o erro quadrático entre o valor da variável de estado calculada pelas equações do modelo fenomenológico e o valor experimental, conforme definido pela equação:

$$FO = \min \sum_{i=1}^n (Y_i - Y_{i\text{calc}})^2 \quad (7)$$

As equações dos modelos foram resolvidas numericamente pelo algoritmo LIMEX e os pesos ótimos da rede foram determinados pelo algoritmo simulated annealing. Os valores das variáveis de estado calculados e experimentais usados no cálculo da FO foram normalizados entre 0 – 1, devido a ordem de grandeza entre as variáveis.

Durante a etapa de treinamento da rede foi usado um conjunto experimental composto por 9 fermentações com agitação e aeração variando na faixa de 101 a 693 rpm e 0 a 2,5 vvm, respectivamente. Para a validação do modelo foram usadas 2 fermentações adicionais com

agitação e aeração de 390 rpm e 1,5 vvm, respectivamente e 600 rpm e 2,5 vvm, respectivamente.

Os dados experimentais usados nesse trabalho foram determinados em períodos igualmente espaçados de 12h. Portanto, as entradas da rede serão alimentadas a cada 12h de fermentação. Como a LIMEX fornece várias saídas densas dentro desse intervalo, optou-se por empregar o mesmo conjunto de parâmetros dentro de cada intervalo. Por exemplo, no período entre 0h – 11,999h a rede é alimentada com os dados determinados experimentalmente em $t = 0$. A rede só será re-alimentada quando o tempo for igual á 12h. Ou seja, no período de 0h – 11,999h tem-se o mesmo conjunto de parâmetros; no período de 12h – 23,999h tem-se um novo conjunto de parâmetros, seguindo o mesmo raciocínio no decorrer da fermentação.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DA PRODUÇÃO DA GOMA XANTANA

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados obtidos nos experimentos cinéticos, em diferentes condições de agitação e aeração (Tabela 2).

Tabela 4. Cinética da produção de goma, formação de células e consumo de substrato para os experimentos 1 a 6. Unidades: [g.L⁻¹].

Tempo	Lactose	Células	Goma	Tempo	Lactose	Células	Goma
0	4,422	0,5	0	0	4,52	0,7	0
12,00	4,469	0,8	3,2	12,00	3,78	1,1	5,4
24,00	3,734	1,2	4,5	24,00	2,81	1,6	6,6
36,00	3,094	3,0	6,3	36,00	2,45	3,2	7,1
48,00	2,905	3,2	10,1	48,00	2,31	4,5	12,3
72,00	1,440	4,0	20,0	72,00	2,22	4,0	24,0
96,00	1,500	4,1	19,8	96,00	2,00	4,1	21,0

Experimento 1				Experimento 2			
Tempo	Lactose	Células	Goma	Tempo	Lactose	Células	Goma
0	4,61	0,7	0	0	4,61	0,7	0
12,00	4,30	2,3	8,2	12,00	3,10	3,1	11,1
24,00	3,50	2,5	8,9	24,00	2,90	3,9	15,7
36,00	2,30	3,2	9,1	36,00	1,30	4,1	16,2
48,00	2,40	4,0	11,1	48,00	1,40	4,4	18,3
72,00	2,20	4,0	18,0	72,00	1,50	4,5	29,0
96,00	1,90	4,1	18,9	96,00	1,20	4,6	28,2

Experimento 3				Experimento 4			
----------------------	--	--	--	----------------------	--	--	--

Tempo	Lactose	Células	Goma	Tempo	Lactose	Células	Goma
0	4,5	0,8	0	0	4,5	0,8	0,0
12,00	4,3	2,9	8,2	12,00	3,5	2,9	10,1
24,00	3,8	3,0	9,3	24,00	3,0	3,0	11,4
36,00	2,9	4,0	10,2	36,00	2,9	4,0	12,4
48,00	1,4	4,2	11,3	48,00	1,4	4,2	15,1
72,00	1,5	4,5	15,0	72,00	1,3	4,5	20,2
96,00	1,2	4,6	16,0	96,00	1,2	4,6	21,2
Experimento 5				Experimento 6			

Tabela 5. Cinética da produção de goma, formação de células e consumo de substrato para os experimentos 7 a 11. Unidades: [g.L⁻¹].

Tempo	Lactos	Célula	Goma	Tempo	Lactos	Célula	Goma
	e	s			e	s	
0	4,5	0,8	0,0	0	4,5	0,8	0,0
12,00	4,0	1,5	11,1	12,00	4,0	3,2	14,1
24,00	2,5	3,0	13,3	24,00	2,5	3,8	15,5
36,00	2,9	4,2	14,9	36,00	2,9	4,5	16,3
48,00	1,1	4	15,1	48,00	1,1	4,8	21,2
72,00	1,3	3,8	15,3	72,00	1,3	3,8	25,7
96,00	1,2	3,9	15,0	96,00	1,2	3,9	31
Experimento 7				Experimento 8			
Tempo	Lactos	Célula	Goma	Temp	Lactos	Célula	Goma
	e	s		o	e	s	
0	4,8	0,8	0	0	4,8	0,8	0
12,00	3,2	3,2	14,1	12,00	4,3	3,1	14,1
24,00	2,9	3,8	15,5	24,00	2,9	3,6	15,5
36,00	1,8	4,5	16,3	36,00	1,9	4,0	16,3
48,00	1,3	4,8	21,2	48,00	1,1	4,5	21,2
72,00	1,5	3,8	36,0	72,00	1,3	3,8	35,3
96,00	1,6	3,9	35,3	96,00	1,5	3,9	35,7
Experimento 9				Experimento 10			

Tempo	Lactose	Células	Goma
0	4,8	0,8	0
12,00	4,1	2,9	14,1
24,00	2,7	3,5	15,5
36,00	2,1	4,3	16,3
48,00	1,2	4,7	21,2
72,00	1,3	3,8	36,2
96,00	1,2	3,9	35,9

Experimento 11

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4 pode-se perceber que a maior produção de goma xantana ocorre entre 72 h e 96 h. Esse fato ocorre devido a bactéria *Xanthomonas campestris* excretar para o meio seu metabólito na sua fase de desaceleração e declínio celular, sendo a formação de produto parcialmente associada ao crescimento da biomassa. Segundo Casas *et. al.* (2000), as variáveis temperatura, velocidade de agitação e concentração inicial de oxigênio afetam a taxa e rendimento da produção de goma xantana. A produção de células é máxima já em 48 h para alguns experimentos e em 72 h a 96 h de fermentação para o restante.

Nos experimentos 1, 3, 4, 5 e 6 a máxima produção de células ocorre no final da fermentação, o que indica ser a aeração o fator determinante. Nesses experimentos a aeração é a dos níveis experimentais mais baixos, repercutindo num tempo mais longo de crescimento celular devido à disponibilidade de oxigênio para a manutenção e duplicação celular ser menor. Já para os experimentos 2, 7, 8, 9, 10 e 11 a aeração é a dos níveis mais altos, resultando num tempo mais curto de produção celular máxima e, ainda, tendo uma formação de produto mais acentuada. Verifica-se que a lactose foi consumida no decorrer da fermentação, evidenciando que a bactéria *X. campestris* pv é capaz de utilizar a lactose como fonte de carbono para produção de goma xantana, comprovando os resultados encontrados por GOLLO (2006).

A análise estatística dos resultados apresentados na Tabela 4 referentes a máxima produção de células e concentração de goma xantana possibilita a avaliação dos efeitos das variáveis estudadas (agitação e aeração). A Figura 5 apresenta os efeitos principais, quadráticos e de interação entre as variáveis para a concentração máxima de goma xantana (Figura 5a) e máxima concentração celular obtida (Figura 5b).

Conforme pode ser visualizado, tanto aeração quanto agitação apresentam influência estatisticamente significativa ($p < 0.1$) na produção de goma xantana. O incremento no valor das duas variáveis pode levar a um incremento na produção de goma xantana, uma vez que os

efeitos lineares dessas variáveis foram positivos. Com relação aos termos quadráticos, os mesmos apresentaram valores negativos que, do ponto de vista matemático, indicam a presença de um ponto de máximo. Do ponto de vista de bioprocessos, este resultado é interessante, pois indica que existe um conjunto de valores para as variáveis operacionais (agitação e aeração) em que a produção de goma xantana é ótima. Sendo assim, a otimização do processo pode ser obtida através da aplicação da metodologia de planejamentos de experimentos ou através do desenvolvimento de um modelo matemático que possa ser usado como ferramenta de otimização.

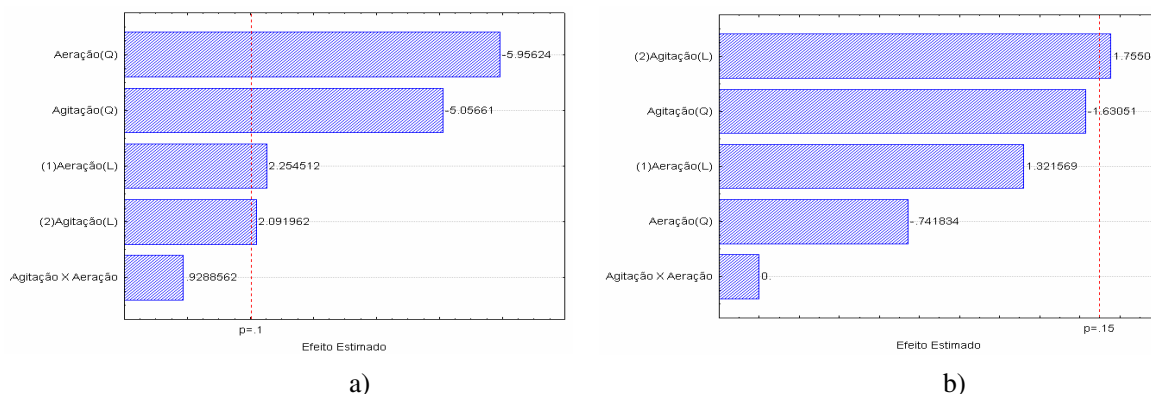


Figura 5: Análise dos efeitos das variáveis estudadas sobre a máxima concentração de goma xantana (a) e a máxima concentração celular (b) obtidas nos experimentos da Tabela 4.

Com relação ao crescimento microbiano, pode-se perceber que a única variável que apresenta efeito significativo positivo ($p < 0.15$) é a agitação do sistema. Este resultado é esperado, devido ao fato que a produção de goma aumenta a viscosidade do meio, exigindo um incremento na agitação para tornar o meio uniforme. Os demais efeitos não foram estatisticamente significativos.

Alguns autores também relataram a influência do tempo de fermentação na produção da goma, onde um maior tempo de fermentação acarreta uma maior produtividade, como (SOUZA e VENDRUSCULO, 2000; ANTUNES *et al.*, 2000b; MOREIRA, *et al.*, 2001). Isto também foi observado por PADILHA, (2003) trabalhando com *X. axonopodis* pv *manihotis* onde obteve produção de $6,9 \text{ g.L}^{-1}$ e $7,9 \text{ g.L}^{-1}$ com 72 h e 96 h de fermentação, respectivamente.

NITSCHKE, *et al.* (2001) utilizando agitação de 180 rpm e 28°C alcançou uma produção de $14,7 \text{ g/kg}$ em meio a base de soro de leite integral 4% (soro de queijo em pó) adicionando 0,01% de sulfato de magnésio e 0,5% de fosfato de potássio, porém com outra bactéria (*C₇L*). Sabe-se que diferentes linhagens de *X. campestris* podem produzir goma xantana com diferentes composições, viscosidade e rendimento. Por esse motivo salienta-se a

importância de pesquisas de novas linhagens que possam produzir goma xantana em meio de soro de queijo com alto rendimento e de boa qualidade.

Meio à base de soro de queijo diluído 1:4 com água foi utilizado para a produção de gelana, obtendo-se $7,9 \text{ g.L}^{-1}$ do polissacarídeo. Ao aumentar a diluição do soro de queijo, ocorrem diminuições na produção de gelana (FIALHO *et al.*, 1999).

Resíduos agroindustriais estão sendo utilizados em muitos trabalhos envolvendo a produção de polissacarídeos, entre eles pode-se citar a produção de goma xantana em água residual de moinho de azeitona, onde foi obtida uma produção de 7 g.L^{-1} de goma utilizando-se 20% do rejeito (LÓPEZ, *et al.*, 2001); em meio contendo melaço, chegando a uma produção de 53 g.L^{-1} (KALOGIANNIS, *et al.*, 2003) e $38,16 \text{ g.L}^{-1}$ de goma xantana (MAYESKI, 2005). Esses resultados confirmam o que foi descrito por MOREIRA, *et al.*, (2001), que os rendimentos de goma xantana dependem da composição do meio e da linhagem da bactéria *X. campestris* utilizada.

GOLLO (2006), utilizando a mesma linhagem e o mesmo meio de produção em experimentos realizados em shaker a 28°C e 180 rpm, obteve um máximo de produção de $25,42 \text{ g.L}^{-1}$ em 72 horas de fermentação. Esses valores foram superiores aos obtidos por ROTTAVA (2005), que, entre outras, utilizou a mesma cepa, mas em meio sintético MPI+II (g.L^{-1}) contendo $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2,5; K_2HPO_4 5,0; H_3BO_3 0,006; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,0; FeCl_3 0,0024; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002; ZnSO_4 0,002; sacarose 50,0, pH 7,0, no qual obteve $8,83 \text{ g.L}^{-1}$ de polissacarídeo.

MAYESKI (2005), trabalhando com meio sintético e *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230, obteve uma produção de $30,27 \text{ g.L}^{-1}$. MOREIRA *et al.*, (2001) trabalhando com 18 linhagens diferentes de *X. campestris*, encontraram rendimentos que variaram de 2,3 a $8,3 \text{ g.L}^{-1}$ utilizando meio PMII composto por $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ K_2HPO_4 ; $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 50 g.L^{-1} de sacarose, após 72 horas de fermentação, 28°C e 200 rpm.

ESGALHADO *et al.* (1995) trabalharam com *X. campestris* NRRL B-1459 nas seguintes condições: temperatura entre 25 e 30°C e pH entre 7,0 e 8,0 com meio contendo extrato de malte, extrato de levedura, peptona e acrescido de sais e glicose, obtiveram produção máxima de goma xantana de 18 g.L^{-1} .

PAPAGIANNI *et al.* (2001) chegaram a um máximo de produção média de 7 g.L^{-1} de goma xantana em meio LBG composto por 1% m/v tripeptona, 0,5% m/v extrato de levedura, 0,5 m/v NaCl e 0,2% m/v glicose utilizando a bactéria *X. campestris* ATCC 1395. Esse valor foi obtido após 72 horas de incubação com velocidade de agitação de 600 rpm trabalhando em

fermentador. Verificaram que com a diminuição da velocidade de agitação ocorrem diminuições na produção de goma xantana. BERWANGER (2005) observou que níveis maiores de agitação na obtenção de polissacarídeos sintetizados por *Sphingomonas capsulata* acarretavam maiores produtividades, chegando a um limite de 208 rpm em agitador orbital.

De acordo com GARCÍA-OCHOA *et al.* (2000), a produção de xantana é acompanhada por um grande aumento na viscosidade do meio devido o acúmulo do exopolissacarídeo, provocando uma redução significativa na taxa de transferência de oxigênio. Com o aumento na viscosidade, a velocidade de agitação não deve ser mantida constante durante o processo, pois a transferência mássica de oxigênio pode ser afetada, alterando a produção de goma xantana.

De acordo com CHI e ZHAO (2003) pesquisas feitas com pululana indicam que diferentes velocidades de rotação dos frascos tiveram grande efeito na biosíntese do biopolímero, indicando que um aumento na agitação acarreta um aumento no rendimento. Assim a literatura cita que o coeficiente de transferência de oxigênio está correlacionado com a velocidade de agitação e velocidade superficial do gás, e no caso de fluidos não-newtonianos, a viscosidade do meio também deve ser levada em conta (GARCÍA-OCHOA, 2000). A produção máxima de goma ocorre quando a produção de células atinge seu máximo(96 horas) e a produção de goma xantana tem seu máximo em 96 horas.

A agitação e a aeração são parâmetros necessários para evitar condições de anaerobiose decorrentes de alta viscosidade do meio devido a formação do polissacarídeo, visto que a bactéria é estritamente aeróbia. Os microorganismos conseguem manter bom desempenho e, quando cultivados em baixas concentrações de oxigênio dissolvido, são interessantes para o ponto de vista econômico. A manutenção de altas concentrações de oxigênio dissolvido demanda um maior consumo de energia, em virtude de uma maior agitação e aeração (SCHMIDELL, 2001).

NITSCHKE, *et al.* (2001) utilizando agitação de 180 rpm e 28 °C, alcançou uma produção de 14,7 g/kg em meio a base de soro de leite integral 4% (soro de queijo em pó), adicionando 0,01% de sulfato de magnésio e 0,5% de fosfato de potássio, porém com outra bactéria (C₇L). Sabe-se que diferentes linhagens de *X. campestris* podem produzir goma xantana com diferentes composições, viscosidade e rendimento. Por esse motivo salienta-se a importância de pesquisas de novas linhagens que possam produzir goma xantana em meio de soro de queijo com alto rendimento e de boa qualidade.

Meio à base de soro de queijo, diluído 1:4 com água foi utilizado para a produção de gelana, obtendo-se 7,9 g.L⁻¹ do polissacarídeo. Ao aumentar a diluição do soro de queijo, ocorrem diminuições na produção de gelana (FIALHO *et al.*, 1999).

Resíduos agroindustriais estão sendo utilizados em muitos trabalhos envolvendo a produção de polissacarídeos. Entre eles pode-se citar a produção de goma xantana em água residual de moinho de azeitona, onde foi obtida uma produção de 7 g.L^{-1} de goma, utilizando-se 20% do rejeito (LÓPEZ, *et al.*, 2001); em meio contendo melaço, chegando a uma produção de 53 g.L^{-1} (KALOGIANNIS, *et al.*, 2003) e $38,16 \text{ g.L}^{-1}$ de goma xantana (MAYESKI, 2005). Esses resultados confirmam o que foi descrito por MOREIRA, *et al.*, (2001), que os rendimentos de goma xantana dependem da composição do meio e da linhagem da bactéria *X. campestris* utilizada.

Alguns autores também relataram à influência do tempo de fermentação na produção da goma, em que um maior tempo de fermentação acarreta uma maior produtividade (SOUZA e VENDRUSCULO, 2000; ANTUNES *et al.*, 2000b; MOREIRA, *et al.*, 2001). Isso também foi observado por PADILHA, (2003), trabalhando com *X. axonopodis* pv *manihotis*, onde obteve produção de $6,9 \text{ g.L}^{-1}$ e $7,9 \text{ g.L}^{-1}$ com 72 horas e 96 horas de fermentação respectivamente.

4.2 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA

No desenvolvimento do modelo híbrido é necessário definir a arquitetura da rede neural mais adequada para representar o processo. As entradas da rede foram definidas como sendo o tempo de fermentação e as duas variáveis operacionais, agitação e aeração, totalizando três entradas. As saídas da rede são os parâmetros do modelo matemático proposto, que corresponde a 5 unidades. O número ótimo de neurônios da camada intermediária deve ser determinado para que a rede possa estimar de maneira satisfatória os parâmetros do modelo. Neste trabalho, foi avaliada a influência de 1-10 neurônios na camada intermediária, cujos resultados são apresentados na Figura 6. Como pode ser visto, a partir de 2 neurônios na camada intermediária há pouca influência sobre o valor da função objetivo. No entanto, a configuração com 8 neurônios internos apresentou os melhores resultados em termos do ajuste global, sendo que a arquitetura ótima da rede utilizada neste estudo foi 3-8-5.

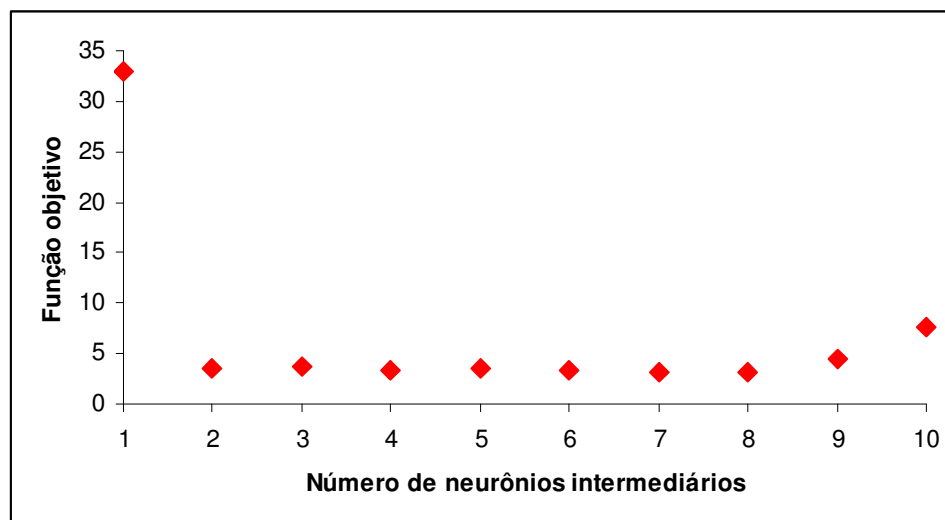


Figura 6: Influência do número de neurônios intermediários no valor da função objetivo.

A partir da escolha da melhor arquitetura da rede neural, a próxima etapa é a simulação do processo. As Figuras 7 e 8 apresentam os resultados referentes ao desempenho do modelo híbrido proposto para simular o processo de produção de goma xantana no biorreator batelada. Como pode ser visto, o modelo apresentou resultados satisfatórios com relação ao ajuste dos dados experimentais, principalmente no que diz respeito ao consumo de lactose no meio. Com relação ao crescimento microbiano, o modelo foi apto para prever a tendência de crescimento, com exceção do experimento 2, onde o modelo apresentou resultados insatisfatórios. Com relação a produção de goma xantana, o modelo representou de maneira satisfatória a tendência do processo.

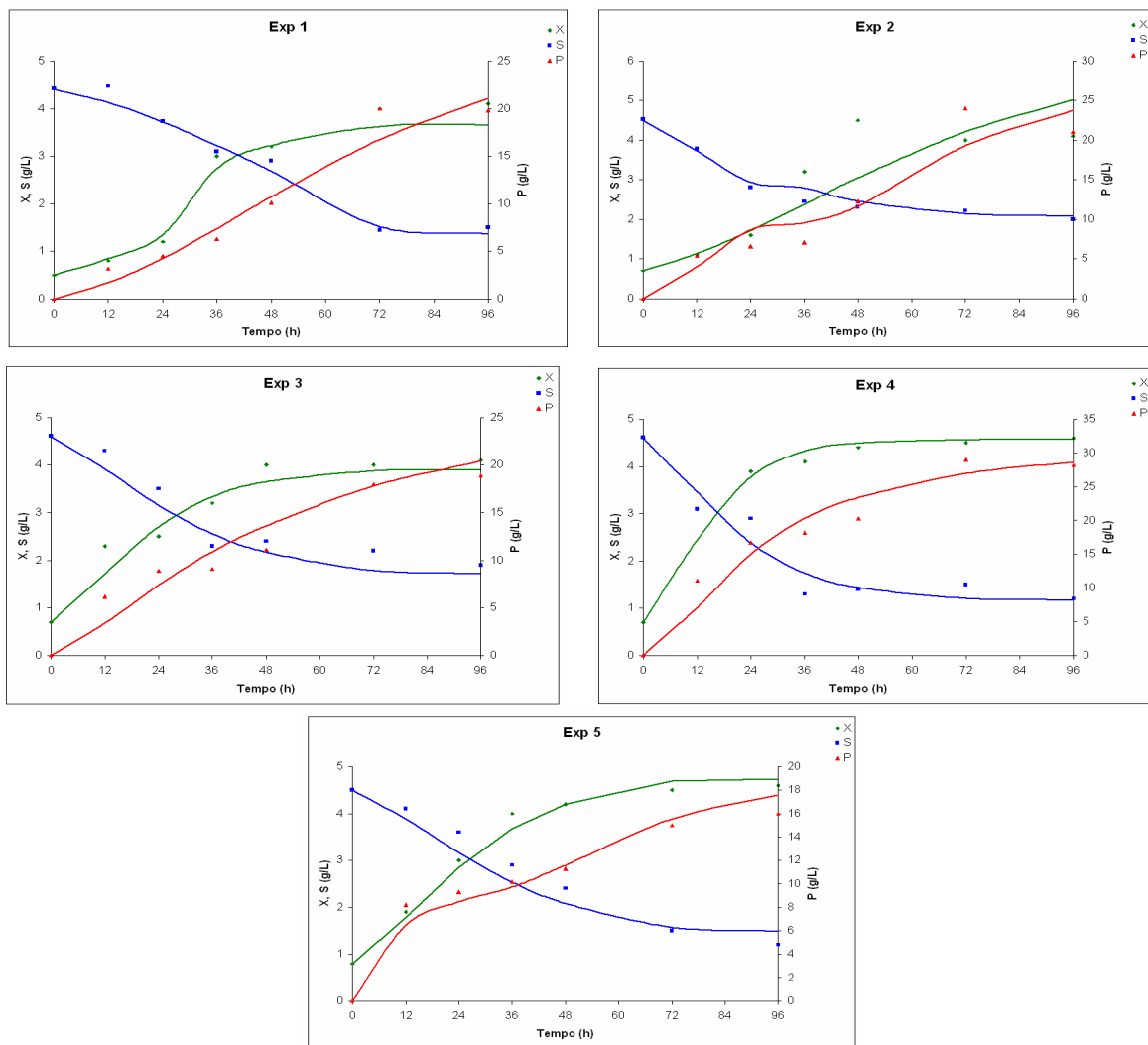


Figura 7: Avaliação do desempenho do modelo híbrido proposto para simular o processo de produção de goma xantana nos experimentos 1-5.

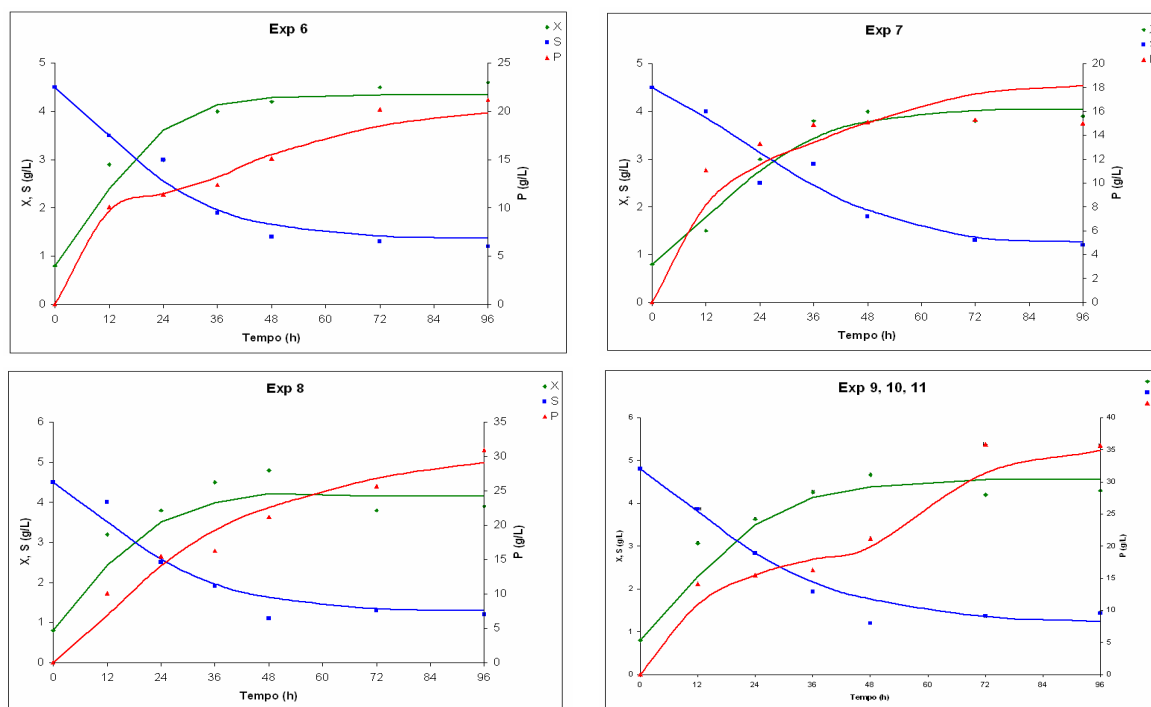


Figura 8: Avaliação do desempenho do modelo híbrido proposto para simular o processo de produção de goma xantana nos experimentos 6-11.

Os resultados obtidos na modelagem matemática do processo de produção de goma xantana usando o modelo híbrido proposto foram satisfatórios. Estes resultados indicam que a estratégia de combinar redes neurais e modelo fenomenológico em uma estrutura híbrida é uma ferramenta interessante para a simulação de bioprocessos, principalmente nos casos onde se tem pouca informação a cerca dos mecanismos envolvidos no crescimento microbiano. Resultados similares com relação a aplicação de modelos híbridos para a estimação de parâmetros de bioprocessos foram obtidos por Mazutti (2006), onde o modelo híbrido apresentou melhor desempenho em relação ao modelo puramente fenomenológico e com relação a aplicação de redes neurais puras (Mazutti et al., 2010).

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos neste trabalho com relação aos efeitos da agitação e aeração permitem concluir que, ambas as variáveis apresentam influência sobre a produção de goma xantana e, com relação ao crescimento microbiano, somente a agitação apresentou influência significativa no processo. Além disso, as maiores produções de goma foram verificadas no período final de fermentação (entre 72 e 96h). Esse fato ocorre devido a bactéria *Xanthomonas campestris* excretar para o meio seu metabólito na sua fase de desaceleração e declínio celular, indicando que a formação de produto é parcialmente associada ao crescimento microbiano.

Com relação ao modelo matemático proposto para representar o processo de produção de goma xantana em biorreator batelada, pode-se verificar que o emprego de uma estrutura híbrida, combinando as equações de balanço de massa com as redes neurais, é uma ferramenta interessante para a estimação de parâmetros em bioprocessos. Os resultados obtidos nesse trabalho com relação a qualidade de ajuste foram satisfatório, uma vez que o modelo foi apto para descrever o perfil cinético do crescimento microbiano, consumo de lactose e produção de goma xantana no meio. O modelo híbrido é uma ferramenta interessante a ser utilizada em bioprocessos, principalmente nas situações onde a rota metabólica não é bem conhecida ou elucidada.

O desenvolvimento desta dissertação teve como um dos principais objetivos de propiciar um incremento no conhecimento da modelagem de bioprocessos, com grande apelo ao uso de meio alternativo, neste caso, o soro de queijo para que uma série de trabalhos possam ser realizados no futuro. A seguir serão apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Usar dados de consumo de oxigênio para estimar os parâmetros do modelo híbrido verificando seu comportamento.
- Desenvolver estratégias de controle de processos, a partir do modelo matemático.
- Uso do modelo matemático para a otimização da produção de goma xantana.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, K.E.; BONASSI, I.A.; ROÇA, R.O. Características físico e químicas de bebidas lácteas. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v 21, p.187-192. 2001
- ANDRADE, R.L.P de; MARTINS, J.F.P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, 22:3, 2002
- ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Síntese de Biopolímeros xantana em meios convencionais e alternativos: viscosidade x composição. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.6 nº12. p.123-125. 2000. (a)
- ANTUNES, A.E.C.; MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; VENDRUSCOLO, C.T. Viscosidade aparente de biopolímeros produzidos por diversas cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Ciência e Engenharia**, v.9 nº 1, p. 83-87. 2000. (b)
- Association of Official Agricultural Chemists, **Official methods of analysis of the AOAC**. 16 ed, Gaithersburg, USA, Rhaps, v. 45, pp.16-17. 1997
- BAE, S. & SHODA, M. **Bacterial cellulose** production by fed-batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, 20, 1366-1371, 2004
- BANIK, R.M.; KANARI, B.; UPADHYAY, S.N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16. p.407-414. 2000
- BAS, D.; DUDAK, F. C.; BOYACI, I. H., Modeling and optimization IV: investigation of reaction kinetics and kinetic constants using a program in which artificial neural network (ANN) was integrated. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 1152 – 1158, 2007a.
- BAS, D.; DUDAK, F. C.; BOYACI, I. H., Modeling and optimization III: reaction rate estimation using artificial neural network (ANN) without a kinetic model. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p. 622-628, 2007b.
- BECKER, A., KATZEN, F., PÜHLER, A., IELP, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. **Applied Microbiology Biotechnology**, v50, p-145-152. 1998.
- BERWANGER, A. L. da S. **Produção e caracterização de biopolímeros sintetizados por *Sphingomonas capsulata***. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões campus de Erechim. 2005
- BIEGLER, L. T.; GROSSMANN, I. E., Future perspective on optimization. **Computers and Chemical Engineering**, v. 28, p. 1193 – 1218, 2004b

- BIEGLER, L. T.; GROSSMANN, I. E., Retrospective on optimization. **Computers and Chemical Engineering**, v. 28, p. 1169-1192, 2004a.
- BILANOVIC, D., GREEN, M. & SHELF, G. **Xanthan fermentation of citrus waste. Bioresource Technology**, 48(1994), 169-172.
- BIROL, G.; DORUKER, P.; KIRDAR, B.; ÖNSAN, I.; ÜLGEN, K., Mathematical description of ethanol fermentation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 763 – 771, 1998.
- BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos**, São Paulo: Varela, 1992.
- BOZA, Y.; NETO, L. P.; COSTA, F. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Exopolysaccharide production by encapsulated *Beijerinckia* cultures. **Process Biochemistry**, 39, 1201-1209, 2004
- BOZA, Yolanda E. A. G. **Encapsulamento *Beijerinckia* sp utilizando spray-drier**. Departamento de Ciência de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2002
- BRADBURY, J. F. **Xanthomonas dowson**. In: KRIEG, N. R., HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, v. 1, 1984
- BREZOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules** v.23, pp.263-275. 1998
- BREZOLIN, T.M.B.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; GANTER, J.L.M.S. Xanthan-galactomannan interactions as related to xanthan conformations. **International Journal of Biological Macromolecules** v.23, pp.263-275. 1998
- BURHAN, N.; SAPUNDZHIEV, T.; BESCHKOV, V., Mathematical modeling of cyclodextrin-glucanotransferase production by batch cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 73 – 77, 2005.
- CACIK, F.; DONDO, R.G.; MARQUÉS, D. Optimal control of a batch bioreactor for the production of xanthan gum. **Computers and Chemical Engineering** v.25, p. 409-418, 2001
- CADMUS, M. C.; KNUTSON, C. A.; LAGODA, A. A.; PITTSLEY, J. E.; BURTON, K. A. Synthetic media for production of quality xanthan gum in 20 liter fermentors. **Biotechnology and Bioengineering**, v.20, p.1003-1014, 1978
- CAMPBELL, B. S.; McDOUGALL, B. M.; SEVIOUR, R. J. Why do exopolysaccharide yield from the fungus *Aureobasidium pullulans* fall during batch culture fermentation?. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 33, p. 104-112, 2003

- CASAS, J.A.; SANTOS, V.E.; GARCIA-OCHOA, F. Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.282-291, 2000
- CHI, Z. & ZHAO, S. Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.206-211, 2003
- CNPGL – **Centro Nacional de Pesquisa em Gado Leiteiro** – EMBRAPA: MG. 2002
- COSTA, A. C.; HENRIQUES, A. S. W.; ALVES, T. L. M.; MACIEL FILHO, R.; LIMA, E. L., A hybrid neural model for the optimization of fed-batch fermentations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16 n. 1, p. 53-63, 1999.
- CROSSMAN, L. & DOW, J.M.. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and Infection**, v.6, p.623-629, 2004
- DESAI, K. M.; VAIDYA, B. K.; SINGHAL, R. S.; BHAGWAT, S. S., Use of an artificial neural network in modeling yeast biomass and yield of β -glucan. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1617-1626, 2005.
- DILTZ, S.; ZELLER, S.G. **Location of O-acetyl groups in S-657 using the reductive cleavage method**. Carbohydrate Research, 331, 265-270, 2001
- DRUZIAN, J. I. **Estudo da estrutura de exopolissacarídeos produzidos por duas espécies de *Rhizobium* e uma de *Bradyrhizobium* isolados de solo de cultivar de feijão de corda (*Vigna unguiculata* L.)** Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2000
- ESGALHADO, M.E.; ROSEIRO, J.C.; AMARAL COLLAÇO, M.T. **Interactive effects of pH and temperature on cell growth and polymer production by *Xanthomonas campestris***. **Process Biochemistry**. V. 30. nº 7. p.667-671. 1995
- FABER, R.; JOCKENHOVEL, T.; TSATSARONIS, G., Dynamic optimization with simulated annealing. **Computers and Chemical Engineering**, v. 29, p. 273-290, 2005.
- FARRO, A.P.C.; VIOTTO, L. A. **Redução do teor de gordura do soro de queijo pré-tratado por ultrafiltração. 4º Congresso ibero-americano em ciência e tecnologia de membranas**. Florianópolis. CITEM. 2003
- FENTANES, E.G. **Polisacáridos microbianos**. In: RAMIREZ, R.Q., (Ed.), **Prospectiva de la biotecnología em México**. México: Fundación Javier Barros Sierra, 1985. p.73-92.
- FIALHO, A.M.; MARTINS, L.O.; DONVAL, M.L.; LEITÃO, J.H.; RIDOUT, M.J.; JAY, A.J.; MORRIS, V.J.; SÁ-CORREIA, I. Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from

- glucose and from cheese whey. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65 n°6, p.2485-2491. 1999
- FLORES,F.,TORRES,L.G.,GALINDO,E. Effect of the dissolved oxygen tension during cultivation of *X. Campestris* on the production and quality of xanthan gum. **Journal of Biotechnology**,v.34,p.165-173,1994.
- FRANCO, G. **Nutrição – Texto básico e tabela de composição química dos alimentos**. 6ª edição. Editora Atheneu, 227p. 1982
- GALINDO, E. Aspects of the process for xanthan production. **Institution of Chemical Engineers**, v.72, part. C, p.227-237, 1994
- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v.18, p.549-579, 2000
- GENOVESE, K.; LAMBERTI, L.; PAPPALETTERE, C., Improved global-local simulated annealing formulation for solving non-smooth engineering optimization problems. **International Journal of Solids and Structures**, v. 42, p. 203-237, 2005.
- GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; McNEIL, B. Gellan gum. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 20:3, p. 177-211, 2000
- GIAVASIS, I.; ROBERTSON, I.; McNEIL, B.; HARVEY, L.M. Simultaneous and rapid monitoring of biomass and biopolymer production by *Sphingomonas paucimobilis* using Fourier transform-near infrared spectroscopy. **Biotechnology Letters**, 25: 975-979, 2003
- GLAZER,N.,NIKAIDO,H.**Microbial biotechnology-fundamentals of applied microbiology**.2 ed.New Iork:W.H. Freeman and Company,1995.p642.
- GLICKSMAN,M.**Gelling hydrocolloids in food product** applications.In BLANSHARD,J.M.M.,MITCHELL,J.R.Polysaccharides in food.London:Bitterworths,1979.p.185-204.
- GOLLO, R. C. **Aproveitamento de soro de queijo para produção de goma xantana**. Dissertação de Mestrado – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões- Campus Erechim (URI), Erechim, p.79, 2006
- GOUGH,C.L.,J.M.,BAEBER,C.E.,et al.**Cloning of two endoglucanase genes of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*:Analysis of the role of the major endoglucanase in pathogenesis**.The American Phytopathological Society,v.1,n.7,p.275-281,1988.
- HAAG, J. E.; VANDE WOUWER, E. A.; REMY, E. M., **A general model of reaction kinetics in biological systems**. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 27, p. 303-309, 2005b.
- HAAG, J. E.; WOUWER, A. V.; BOGAERTS, P., **Dynamic modeling of complex biological systems: a link between metabolic and macroscopic description** Mathematical Biosciences,

v. 193, n. 1, p. 25-49, 2005a.

HATZINIKOLAOU, D.G.; KATSIFAS, E.; MAMMA, D.; KARAGOUNI, A.;
CHRISTAKOPOULOS, P.; KEKOS, D.. **Modeling of the simultaneous hydrolysis-ultrafiltration of whey permeate by a thermostable β -galactosidase from *Aspergillus niger***, v.24, p.161-172, 2005

HAYWARD, A. C. **The hosts of *Xanthomonas***. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, 1993

HOLT, J.G.; KRIEGER, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. – **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. Philadelphia (USA): Lippincott Williams & Wilkins. 9 edição, 100-174p. 1995.

HSU, C.-H.; LO, Y.M. Characterization of xanthan gum biosynthesis in a centrifugal, packed-bed reactor using metabolic flux analysis. **Process Biochemistry**, 2003. 1-9

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3º ed., São Paulo, 1985

JEANNES, A. R.; ROGOVIN, P.; CADMUS, M. C.; SILMAN, R. W.; KNUTSON, C. A. **Polyssaccharide of *Xanthomonas campestris* NRRL B - 1459: procedures for culture maintenance and polysaccharide production, purification and analysis. ARS-NC-51**.

Washington, D. C., **Agriculture Research Service**, U. S. Department of Agriculture, 1976

JIN, H.; LEE, N-K.; SHIN, M-K.; KAPLAN, D. L.; LEE, J-W. Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p.357-360, 2003

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D.A.; SKARACIS, G.N. Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**, v.39, p.249-256, 2003

KANG, K. S.; VEEDER, G. T.; MIRRASOUL, P. J.; KANEKO, T. & COTTRELL, I. W. **Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties**. **Applied and Environmental Microbiology**, 43:5, 1086-1091, 1982

KAYACIER, A.; DOGAN, M. **Rheological properties of some gums-salep mixed solutions**. **Journal of Food Engineering**. 2005

KIM, C. & YOO, B. Rheological properties of rice starch-xanthan gum mixtures. **Journal Food Engineering**. 2005

KIRKPATRICK, S.; GELLAT, C. D. JR.; VECCHI, M. P., Optimisation by simulated annealing. **Science**, v. 220, p. 671 – 680, 1983.

- KOOKOS, I. O., Optimization of batch and fed-batch bioreactors using simulated annealing. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1285-1288, 2004.
- LANARA – **Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II-Métodos Físico e Químicos- Ministério da Agricultura- Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária – Laboratório Nacional de Referência Animal**. Brasília, 1981
- LEE, K.Y.; SHIM, J.; BAE, I.Y.; CHA, J.; PARK, C.S.; LEE, H.G. Characterization of gellan/gelatin mixed solutions and gels. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, 36, 795-802, 2003
- LEWIS. M.J. **Propriedades Físicas de los Alimentos y los Sistemas de Processado**. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1993
- LI, P.; LOWE, K.; ARELLANO-GARCIA, H.; WOZNY, G., Integration of simulated annealing to a simulation tool for dynamic optimization of chemical process. **Chemical Engineering and Processing**, v. 39, p. 357-363, 2000.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda., V.3, 125-154p. 2001
- LINKO, S.; LUOPA, J.; ZHU, Y. H., Neural networks as 'software sensors' in enzyme production. **Journal of Biotechnology**, v. 52, p. 257-266, 1997.
- LÓPEZ, M. J.; MORENO, J.; RAMOS-CORMENZANA, A. Xanthomonas campestris strain selection for xanthan production from olive mill wastewaters. **Elsevier Science Ltd Wat. Res.** v.35, n. 7, p.1828-1830, Great Britain, 2001
- LÓPEZ. M. J.; VARGAS-GARCÍA, M.C.; SUAREZ-ESTRELLA, F.; MORENO, J. Properties of xanthan obtained from agricultural wastes acid hydrolysates. **Journal of Food Engineering** v.63. p.111-115. 2004
- MANDENIUS, C. F., Recent developments in the monitoring, modeling and control of biological production systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 347-351, 2004.
- MARCOTTE, M. HOSHAHLI, A.R.T.; RAMASWAMY, H.S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**. v.34, p.695-703. 2001
- MARGARITIS, A.; PACE, G. W. Microbial polysaccharides. In : Moo-Young, M. **Comprehensive Biotechnology**. Oxford: **Pergamon Press**, v. 3, p. 1005-1041, 1985
- MARTINS, L. O.; SÁ-COREIA, I. Temperatura profiles of gellan gum synthesis and activities of biosynthetic enzymes. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 20, p. 385-395, 1993

- 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.125-150. 2001
- MAURY, A; & ROQUE, J. Lês **Polysaccharides**. **Biofutur**, p. 17-31, Sep. 1986
- MAYESKI, E.; **Produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* utilizando resíduo industrial**. Monografia de graduação. Curso de Biologia URI - campus de Erechim, 2005
- MAZUTTI, M. A.; BENDER, J. P.; DI LUCCIO, M. TREICHEL, H., Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugar cane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 56-59, 2006b.
- MAZUTTI, M. A.; CENI, G.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M., **Production of inulinase by solid state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations**. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Aceito para publicação, v.30, p.297-304, 2007.
- MAZUTTI, M.A.; CORAZZA, M.L.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I.; OLIVEIRA, J.V., TREICHEL, H.; CORAZZA, F.C., **Hybrid modeling of inulinase bio-production process**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, in press, DOI: 10.1002/jctb.2319.
- MOLES, C. G.; MENDES, P.; BANGA, J. R., Parameter estimation in biochemical pathways: a comparison of global optimization methods. **Genome Research**, v. 13, p. 2467-2474, 2003.
- MORAINÉ, R.A.; ROGOVIN, P. Kinetics of the Xanthan Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol. XV, p.225-237. 1973
- MOREIRA, A. da S.; SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C.T. Determinação da composição de biopolímeros por cromatografia em camada delgada: metodologia. *Revista Brasileira de Agrociência*. v. 4, nº3, p.222-224.1998
- MOREIRA, A. N.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, nº2, p.300-305, 2003
- MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; GIL-TURNES, C.; VENDRUSCOLO, C.T. **Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. **Food Hydrocolloids**. v.15, p.469-474. 2001
- MOREIRA, Angelita da S. **Produção, caracterização e aplicação de biopolímero sintetizado por cepas de *Xanthomonas campestris* pv *pruni***. Tese de Doutorado – Programa de Doutorado em Biotecnologia, Centro de Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, 2002

- MORRIS, E. R. **Rheology of hydrocolloids**. In: PHILLIPS, G. O.; WEDLOCK, D. J.; WILLIAMS, P. A. Ed. Gums and stabilisers for the food industry. Oxford: Pergamon Press, p. 57-78, 1984
- MORRIS, E. R. **Rheology** of xanthan: suspension of particles and stabilization of emulsions. **Food & Ingredients Journal of Japan**, v.167, p.31-36, 1996
- NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C. & PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, 38, 1513-1519, 2003
- NAVARRETE, R. C. & SHAH, S. N. New **Biopolymer for coiled tubing applications**. Society of Petroleum Engineers 68487, Richardson, TX, USA. p. 1-10, 2001
- NAVARRO, F. N. **Fundamentos de Reologia de Polímeros**, EDUCS: Caxias do Sul, 1997
- NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C₇L. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.21 n°1, p.82-85, 2001
- PACE, Gary W.; RIGHELATO, Renton C. Production of extracellular microbial polysaccharides. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 15, p. 41-70, 1980
- PACE, Garyw. **Polímeros microbianos**. In: BU'LOOCK, John; KRISTIANSEN, Bjorn. Biotecnologia Básica. Traducción: Paloma Liras Padín. Zaragoza: Acribia, p. 449-462, 1991
- PADILHA, F.F. **Produção de Biopolímeros sintetizados por Microorganismos Modificados Geneticamente**. Tese de Doutorado – Departamento de Ciências de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2003
- PADILHA, F.F. **Síntese e caracterização de biopolímeros por *Beijerinckia* sp 7070**, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, 1997
- PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S.K.; BATSIKAS, 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
- PARADOSSI, G.; CHIESSI, E.; BARBIROLI, A.; FESSAS, D. Xanthan and glucomannan mixtures: synergistic interactions and gelation. **Biomacromolecules**, v.3, p.498-504, 2002
- PARIKH, A. & MADAMWAR, D.. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 97, p.1822-1827, 2006
- PASQUEL, Antonio. **Gomas: utilização e aspectos reológicos**. Boletim SBCTA, v.33, n°1, p.86-97, 1999

- PIERCE, L., PALLENT, J. L. Viscosity test for preliminary identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Plant Disease**, v.74, p.646-647, 1990.
- PINTO, E. P., **Desacetilação de Xantana: influência no comportamento reológico**. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, 2005
- POPLAWSKI, A. R.; URBAN, S. C.; CHUN, W. Biological role of Xanthomonadin pigments in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Applied and Environmental Microbiology** v.66, n°12, p.5123-5127, 2000
- PORTILHO, M. **Avaliação da produção de exopolissacarídeo insolúvel por duas linhagens de *Agrobacterium* sp**, Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, UNICAMP, p. 86, 2002
- RAMÍREZ, M. E., FUCIKOVSKI, L., GARCÍA-JIMÉNEZ, F. et al. Xanthan gum production by altered pathogenicity variants of *Xanthomonas campestris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.5-10, 1988.
- RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURAIISKUMAR, G. K. Free radical aspects of *Xanthomonas campestris* cultivation with liquid phase oxygen supply strategy. **Process Biochemistry**, v.38, p.1301-1310, 2003
- ROSALAM, S. e ENGLAND, R.. Reviw of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas camestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.197-207, 2006
- ROSEIRO, J. C., ESGALHADO, M. E. COLLAÇO, M. T. et al. Medium development for xanthan production. **Process Biochemistry**, v.27, p.167-175, 1992.
- ROTTAVA, I. **Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp para produção de goma xantana**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões campus de Erechim. 79p. 2005
- RUDOLPH, K. **Infection of the plant by *Xanthomonas***. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. Londosn: Chapman & Hall, 1993, p. 193-245
- SÁ-CORREIA, I.; FIALHO, A. M.; VIDEIRA, P.; MOREIRA, L. M.; MARQUES, A. R. & ALBANO, H. Extracellular polysacharides review - Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolisaccharides production engineering. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.29, p.170-176, 2002
- SALAS, E. F. M., **Identificação de processos dinâmicos não lineares: desenvolvimento de software e aplicação a uma coluna fracionadora de eteno**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

- SANTIAGO, P.A.; MARQUEZ, L.D.S.; CARDOSO, V.L.; RIBEIRO, E.J. – Estudo da produção de B-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.24, nº4, 2004
- SCHWAAB, M., **Avaliação de algoritmos heurísticos de otimização em problemas de estimação de parâmetros**. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- SCHWARTZ, R.D.; BODIE, E.A. Production of high-viscosity whey-glucose broths by a *X. campestris* strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 51, nº1 p.203-205. 1986
- SERPA, L. **Concentração de proteínas de soro de queijo por evaporação a vácuo e ultrafiltração**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões campus de Erechim. 95p. 2005
- SILVA F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidious gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters** v.203, p.165-71, 2001
- SIMÕES, P, S. R. **Estudo sobre a viabilidade da simulação e predição de efeitos difusivos em reações de polimerização através de modelos determinísticos e redes neurais**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- SMITH, J. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.32, p.119-129, 1982.
- SOKORA, M.; KOWALSKI, S.; TOMASIK, P.; SADY, M.. **Reological and sensory properties of dessert sauces thickened by starch-xanthan gum combinations**. Journal of Food Engineering, In Press
- SOUW, P.; DEMAIN, A.L. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRRL B1459. **Applied and Environmental Microbiology** v.37, nº6 p.1186-1192, 1979
- SOUZA, A. da S.; VENDRUSCOLO, C. T. Produção e caracterização dos biopolímeros sintetizados por *Xanthomonas campestris* pv. Pruni cepas 24 e 58. **Ciência e Engenharia**. V. 8, n. 2, p. 115-123, 2000
- SUTHERLAND, I. **A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends**. Microbiology Today, 29, 70-71, 2002
- SUTHERLAND, I. W. & TAIT, M. I. **Biopolymers**. Encyclopedia of Microbiology. v. 1, 1992
- SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**. v. 23, p. 80-142, 1982

- SUTHERLAND, I. W. **Xanthan**. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: Chapman & Hall, p.363-388. 1993
- SUTHERLAND, Ian W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 12, p. 393-448, 1994
- TAIT, M. I.; SUTHERLAND, I. W.; CLARKE-STURMAN, A. J. Effect of growth conditions on the production composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. **Journal of General Microbiology**, v.132, p.1483-1492, 1986
- TEIXEIRA, A.; CUNHA, A. E.; CLEMENTE, J. J.; MOREIRA, J. L.; CRUZ, H. J.; ALVES, P. M.; CARRONDO, M. J. T.; OLIVEIRA, R., Modeling and optimization of a recombinant BHK-21 cultivation process using hybrid grey-box systems. **Journal of Biotechnology**, v. 118, p. 290-303, 2005.
- TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**, Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, 2004
- TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Guaíba: UFSM. 144pp. 1997
- VEISSEYRE, R. **Lactologia Técnica: composicion, recogida, tratamiento y transformación de la leche**. Zaragoza, España: Acribia, 629p. 1998
- VENDRUSCOLO, C. T. **Produção e caracterização do Biopolímero produzido por *Beijerinckia* sp isolada do solo cultivado com cana de açúcar da região de Ribeirão Preto-São Paulo-Brasil**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1995
- VOLESKI B.; VOTRUBA, J., **Modeling and optimization of fermentation processes**. Elsevier, 2001.
- WANG, F. WANG, Y. J.; SUN, Z. Conformational role of xanthan in its interection with locust bean gum. **Journal of Food Science**, v. 67-7, p.2609-2614, 2002.
- WANG, F. WANG, Y. J.; SUN, Z. Conformational role of xanthan in its interection with locust bean gum. **Journal of Food Science**, v. 67-9, p.3289-3294, 2002.
- WIECHERT, W., Modeling and Simulation: tools for metabolic engineering. **Journal of Biotechnology**, v. 94, p. 37-63, 2002.
- WOICIECHOWSKY, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de goma xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca**, Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

- XUEWU Z.; XIN L.; DEXIANG, G.; WEI, Z.; TONG, X. YONGHONG, M. Rheological Models for Xanthan Gum. **Journal of Food Engineering**. v.27. p.203-209. 1996
- YASEEN, E.I.; HERALD, T.J.; ARAMOUNI, F.M.; ALAVI, S. Rheological properties of selected gum solutions. **Food Research Internacional** v.38, p.111-119. 2005
- YE, K.; JIN, S.; SHIMIZU, K., **Journal of fermentation and Biotechnology**, v. 77, p. 663-673, 1994.
- ZAGALLO,A.C.,WANG,C.H.Comparative glucose catabolism of Xanthomonas species. **Journal of Bacteriology**,v.93,p.970-975,1967.
- ZELIC, B.; VASIC-RACKI, D.; WANDREY, C.; TAKORS, R., Modeling of the piruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor. **Bioprocess and Biosystem Engineering**, v. 26, p. 249-258, 2004.
- ZORZETTO, L. F. M.; MACIEL FILHO, R.; WOLF-MACIEL, M. R., Process modeling development through artificial neural networks. **Computers and Chemical Engineering**. v. 24, p. 1355-1360, 2000.