

URI - CAMPUS ERECHIM
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS - CPGEAL

**PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM BIORREATOR UTILIZANDO
MEIO À BASE DE SORO DE QUEIJO**

MICHELE CRISTIANE MESOMO

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

JANEIRO DE 2007

PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM BIORREATOR UTILIZANDO MEIO À BASE DE SORO DE QUEIJO

MICHELE CRISTIANE MESOMO

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado 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:

Prof^a. Helen Treichel, D.Sc.
Orientadora

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.
Orientador

Prof^a. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert, D.Sc.

Prof^a. Eunice Valduga, D.Sc.

Erechim, 30 de Janeiro de 2007.

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.

Dedico este trabalho:

As pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Marilene e Pedro e a minha irmã Aliandra, com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

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

A minha irmã, Aliandra, pelo amor e pelas palavras de incentivo. Mesmo sabendo que não seria fácil para mim, sempre me incentivou a fazer mestrado e deu exemplos de vida. Em vários momentos difíceis você me fez erguer a cabeça e seguir em frente. Ao meu cunhado, David, 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 a lutar cada vez mais.

A toda minha família que sempre me apoiou, principalmente a minha prima-irmã de coração Mirian, pela amizade e carinho dedicados a mim.

A minha orientadora, Helen Treichel, pelo apoio e ensinamentos a mim dispensados. Principalmente pela total disponibilidade em ajudar mesmo quando não estava presente e pelas palavras de incentivo. Ao meu orientador, Marco Di Luccio, que no início dos experimentos me viu chorar várias vezes e que sempre estava lá pronto para ajudar e dar sugestões. Muito obrigada de todo o meu coração!!!!!!

Aos professores Alexandre Cichoski, Marcos Corazza e Francine Padilha pelas valiosas contribuições feitas durante os seminários. E a todos os demais professores da Engenharia de Alimentos, que de uma forma ou de outra ajudaram no meu crescimento profissional.

A todas as pessoas que me ajudaram e em especial as pessoas que mais me ajudaram na parte experimental, sendo meu braço direito. Sempre atenciosas, disponíveis e principalmente amigas. Marceli e Gabi muuuito obrigada de todo o meu coração.

As novas amigas que eu fiz durante o mestrado: Cris, Karina, Aline, Marceli, Gabi, Roberta, Ângela, Camila, Silvana, Marcio, João, Jarbas, Ise, Renata Rotta, Renata, Daniela, Franci, Marcus.

À minha amiga Cristiane, que esteve sempre junto, superando dificuldades, dando conselhos e cuidando de mim quando eu precisava. E o mais importante, me agüentando de mau humor e mesmo assim ainda querendo morar comigo. Espero que a distância não separe a nossa amizade e que possamos sempre lembrar das coisas boas que vivemos juntas. Te adoro Crishild!!!!!!!!!!!!

A uma amiga em especial, Karina, que chegou à uma hora difícil trazendo muita alegria para quem convivesse com ela. Obrigada pelas horas em que ficamos conversando.

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.

Ao pessoal da central do prédio 9, Rosi, Morgana, Leandra, Maiquel, Madalena, Fernanda e Franci pela total disponibilidade e ajuda. Em especial, ao Rogério, pela enorme ajuda com as análises. Desculpa por ter sido em muitas horas chata, precisando da ajuda de vocês a toda hora.

Aos funcionários do Centro de Ciências da Saúde da URI – Campus de Erechim por me agüentar praticamente todos os dias na centrífuga, de maneira especial, ao Cassiano, que além do suporte técnico sempre tinha uma palavra de incentivo.

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.

Aos demais amigos que sempre estiveram ao meu lado, presentes ou ausentes.

À todas as pessoas maravilhosas que conheci em Erechim, e que foram preciosas nesta etapa da minha caminhada, por tornarem meus dias menos cansativos e mais alegres. Obrigada por tudo.

Muito obrigada a todos do fundo do meu coração!

Michele C. Mesomo

“Aprendi com a primavera a deixar-me
cortar e a voltar sempre inteira.”

(Cecília Meireles)

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

PRODUÇÃO DE GOMA XANTANA EM BIORREATOR UTILIZANDO MEIO À BASE DE SORO DE QUEIJO

Michele Cristiane Mesomo

Janeiro/2007

Orientadores: Prof^a. Helen Treichel, D.Sc.

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.

A goma xantana é um polissacarídeo sintetizado por bactérias do gênero *Xanthomonas* e de extrema importância no aspecto comercial. A sua aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e petroquímica é devida principalmente às suas propriedades de formar soluções viscosas em baixas concentrações, ampla faixa de estabilidade a pH e temperatura. A goma xantana pode ser produzida a partir de meios quimicamente definidos e meios industriais. O soro de queijo, um resíduo industrial, possui proteínas de alto valor biológico, e, além disso, possui alto teor de lactose (4,5%) e sais minerais (0,6%) constituindo um substrato rico e de fácil obtenção para a produção de polissacarídeos. Na maioria das indústrias de processamento de leite, o soro é tratado como resíduo e descartado inadequadamente. Este descarte, além de trazer danos à natureza, corresponde também a um desperdício inaceitável diante de suas características nutricionais, sendo portanto, considerado um substrato potencial para a produção de biopolímeros. O objetivo deste trabalho foi a produção da goma xantana em meio à base de soro de queijo e posterior estudo de viscosidade aparente do biopolímero produzido. Foi utilizado um biorreator de bancada de 2,5L utilizando um volume útil de 1L, contendo 900mL de meio de fermentação contendo: soro de queijo, 0,1% de sulfato de magnésio e 2% de fosfato de potássio. Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 , no qual as variáveis estudadas foram agitação e aeração. Todos os ensaios foram realizados a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. A maior produção, $36,89 \text{ g.L}^{-1}$, foi encontrada com agitação de 410 rpm e aeração 1,5 vvm,

correspondente ao ponto central do planejamento de experimentos. Para o estudo da viscosidade aparente da goma xantana produzida foram preparadas soluções aquosas das gomas na concentração de 3%, a 25°C, para todos os ensaios de fermentação. Para as análises de viscosidade aparente foi utilizado o reômetro digital marca Brookfield. Avaliou-se também o comportamento da viscosidade em soluções salinas de gomas de acordo com a metodologia de planejamento de experimentos, para a goma produzida no ponto central da fermentação, variando-se a concentração de goma, a concentração de sal e a temperatura. O estudo da adição de sais na solução de goma permitiu concluir que o uso de CaCl_2 resultou na maior viscosidade da solução dentre os sais estudados. Na condição de 25°C, 0,1% de CaCl_2 e 4,68% de goma foi alcançada uma viscosidade de 1704 cP.

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, gelificantes, 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.

Nas últimas décadas observaram-se progressos significativos em relação à identificação, caracterização e utilização de polissacarídeos sintetizados por microrganismos (PADILHA, 1997). Inúmeros biopolímeros têm sido produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana, xantana, curdulana, alginato bacteriano, zanflo, gelana, welana, escleroglucana, pululana, celulose bacteriana (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). Outros, tais como indicana, emulsana, pululana, ciclossóforanas, clairana, diutana, dentre outros vêm sendo estudados, sem ainda serem produzidos em escala industrial (MAUGERI, 2001; NAVARRETE e SHAH, 2001; CHI e ZHAO, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003). Dextrana, xantana e gelana são, praticamente ainda os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em larga escala, tendo importância relevante no mercado de gomas (MAUGERI, 2001).

Quatro biopolímeros são aprovados pelo *Food and Drugs Administration* (FDA), nos Estados Unidos, para uso alimentar: xantana, dextrana, curdulana 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, curdulana e gelana ainda não são aprovadas (ANVISA, 2007).

Diversos estudos que visam o aproveitamento de resíduos industriais na bioprodução de goma xantana são encontrados na literatura, devido ao mercado crescente de polissacarídeos de alto valor agregado e a redução do custo de produção. A utilização de substratos alternativos, como soro de queijo, além de auxiliar

a produção de goma xantana pode ajudar a eliminar possíveis problemas ambientais como descarte de efluentes.

O soro do queijo é um líquido obtido da coagulação do leite na elaboração dos queijos, logo após a separação da coalhada (caseína) e da gordura. No leite, o soro representa de 80% a 90% do volume total que entra no processo industrial e contém em torno de 6,0% a 6,4% de extrato seco, cerca de 55% dos nutrientes do leite original permanecem no soro, sendo proteínas solúveis, lactose, vitaminas e sais minerais. Apesar do grande valor nutritivo, o soro foi considerado durante muito tempo um subproduto sem utilidade (ALMEIDA *et al.*, 2001). Na atualidade, o soro é utilizado em algumas indústrias na fabricação de bebidas lácteas, ricotas, achocolatados, porém em pequena escala.

O descarte do soro, além de trazer danos à natureza, corresponde também a um desperdício inaceitável devido a apreciável quantidade de proteínas, lactose, e demais compostos, tornando-se assim muito atrativo técnica e economicamente para utilização em processos fermentativos.

A goma xantana deve provavelmente continuar sendo o polímero mais utilizado nos próximos anos, devido às suas características reológicas singulares, pois pode alterar as propriedades básicas da água com capacidade de espessamento, estabilização, emulsificação, suspensão e gelificação. Soluções de xantana possuem alta viscosidade em baixas concentrações, estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, pH e concentração de sais. Por estas razões a goma xantana tem sido bastante empregada na indústria alimentícia e petrolífera, e apesar do preço ser mais elevado por unidade de massa, é menor quando comparado por unidade de viscosidade obtida (MORAINE e ROGOVIN, 1973; MAUGERI, 2001).

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi utilizar soro de queijo na produção de goma xantana em biorreator a partir da bactéria *Xantomonas campestris* pv *mangiferaeindicae*. E como objetivos específicos otimizar as condições de produção (agitação e aeração) da goma xantana em meio industrial (soro de queijo) e analisar as características reológicas do polissacarídeo produzido e a influência da adição de soluções salinas (NaCl, CaCl₂ e KCl) na viscosidade aparente dos biopolímeros.

REVISÃO DA LITERATURA

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, freqüentemente, 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*), curdulana (*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 curdulana 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 aeróbio 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.

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 aceptor 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 tricarbóxico 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).

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.

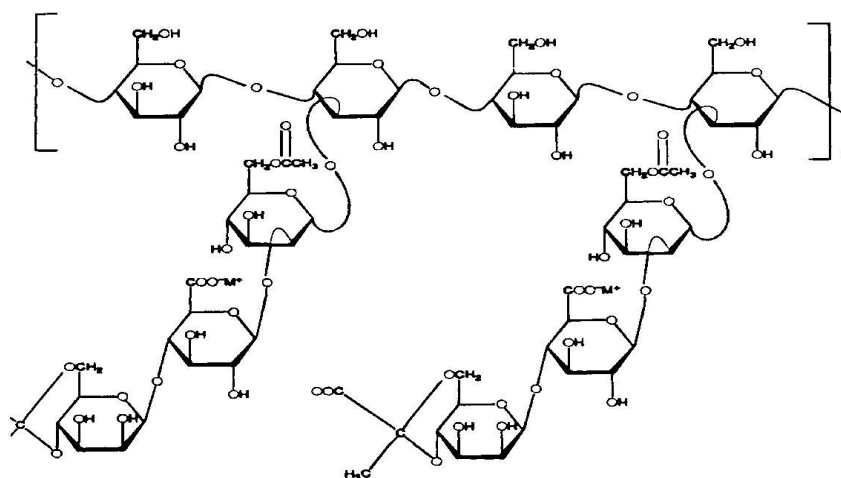


Figura 1 – Estrutura da goma xantana (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

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 4º e 93ºC, 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).

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).

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 MPlI 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 g.L⁻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).

1.1.1 2.6.1 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 30-60kg/m³. 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).

Tabela 1 - Composição centesimal média do soro de queijo.

Componentes	Quantidade
Água (%)	93,39 $\pm$ 0,44
Gordura (%)	0,43 $\pm$ 0,19
Proteína (%)	0,78 $\pm$ 0,25
Lactose (%)	4,90 $\pm$ 0,11
Minerais (%)	1,59 $\pm$ 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)

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.

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.

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).

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).

Reologia de biopolímeros

A reologia é o estudo da deformação e do escoamento da matéria; sendo que a deformação aplica-se no caso da matéria sólida e o escoamento quando a matéria é líquida. No caso mais simples, a propriedade reológica de interesse em sólidos é a sua elasticidade, e nos líquidos é a viscosidade, que pode ser interpretada como a resistência que um fluido oferece para escoar ou também como a medida da fricção interna de um fluido (PASQUEL, 1999). A viscosidade se torna aparente quando uma camada de fluido move-se em relação à outra camada. Assim, à medida que aumenta a viscosidade do fluido, aumentam as forças de atrito e é necessário mais energia para que haja escoamento. Conseqüentemente, fluidos altamente viscosos requerem maior força para se moverem do que materiais menos viscosos (LEWIS, 1993).

As propriedades reológicas das soluções mudam com a natureza do polímero, dependem da massa molar média, da estrutura molecular e da quantidade de grupos acetil ou piruvato (CASAS *et al.*, 2000; DILTZ e ZELLER, 2001; NAVARRETE *et al.*, 2001).

As propriedades reológicas das gomas são particularmente importantes quando elas são usadas na formulação de alguns alimentos. As propriedades reológicas de fluidos alimentícios devem ser cuidadosamente levadas em conta para projetar e propor modelos (KAYACIER *et al.*, 2005).

Dados reológicos são necessários para o cálculo de alguns processos envolvendo escoamento de fluidos (por exemplo, tamanho de bomba, extração, filtração, extrusão, purificação) e tem uma importante função na análise das condições do escoamento em processos de alimentos tais como pasteurização, evaporação, secagem e processos assépticos. A viscosidade de hidrocolóides pode ser afetada

significativamente por variáveis tais como taxa de cisalhamento, temperatura, pressão e tempo de cisalhamento (MARCOTTE *et al.*, 2001).

Os fluidos podem ser classificados como newtonianos ou não-newtonianos conforme seu comportamento, nos fluidos não-newtonianos a viscosidade muda conforme varia a taxa de cisalhamento. Dentro dos fluidos não-newtonianos tem-se os pseudoplásticos, onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, o que é também chamado de cisalhamento fino ou *shear-thinning* (LEWIS, 1993).

A viscosidade de uma solução polimérica é uma função do tamanho e da forma e conformação que adotam suas moléculas no solvente, sendo que no caso de alimentos e bebidas, o solvente é uma solução aquosa de outros solutos. Assim sendo, as soluções de gomas são dispersões de moléculas hidratadas e/ou agregados de moléculas hidratadas, e seu comportamento reológico é determinado pelo tamanho, forma, facilidade de deformação ou flexibilidade, e presença e magnitude da carga elétrica nessas moléculas hidratadas e/ou agregados. As soluções de polissacarídeos exibem dois tipos gerais de comportamento reológico: pseudoplástico e tixotrópico. As soluções da maioria das gomas experimentam uma diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura, sendo que a goma xantana é uma exceção entre 0°C e 100°C (PASQUEL, 1999).

Soluções de goma xantana são geralmente fluidos não-newtonianos pseudoplásticos onde a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, portanto elas exibem um comportamento *shear-thinning* (KAYACIER *et al.*, 2005).

O primeiro estudo dos efeitos da taxa de cisalhamento, temperatura e concentração na viscosidade da goma xantana foi feito por LI SHIYAN *et al.* (1992) apud XUEWU *et al.* (1996), entretanto eles não propuseram um modelo reológico que poderia ser útil para prever a taxa de cisalhamento, concentração e temperatura apropriada para preparação de soluções de goma xantana com viscosidade que permite a manipulação industrial. Assim XUEWU *et al.* (1996) desenvolveram um modelo onde descrevem os efeitos da temperatura e concentração na viscosidade da goma xantana, e verificaram que além da temperatura e concentração, a viscosidade da goma xantana pode ser afetada por outros fatores tais como pH, sólidos insolúveis, e substâncias iônicas.

Efetivamente, polissacarídeos que possuem comportamento pseudoplástico provocam menos sensação de gomosidade na boca do que aqueles com comportamento newtoniano (viscosidade se mantém inalterada com o aumento da taxa de deformação) (MORRIS, 1984). Sua associação com hidrocolóides, como proteínas e outros biopolímeros, pode potencializar o efeito pseudoplástico (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

A viscosidade da goma xantana diminui com o aumento da temperatura (XUEWU *et al.*, 1996), por esse motivo a viscosidade depende da temperatura, sendo importante controlá-la durante as determinações experimentais, bem como citá-la juntamente com os dados de viscosidade. Os líquidos têm sua viscosidade diminuída com o aumento da temperatura, ao contrário da maioria dos gases, cuja viscosidade aumenta com o aumento da temperatura (LEWIS, 1993).

A magnitude de K (índice de consistência) e da viscosidade aparente para misturas são fortemente influenciadas pela temperatura e pela concentração de goma xantana (KIM *et al.*, 2005). Alta viscosidade aparente em baixas concentrações de solução é um parâmetro simples para avaliar o potencial de utilização industrial de um biopolímero (MOREIRA *et al.*, 2001).

Os fluidos não-Newtonianos dependentes do tempo são aqueles em que ocorre mudança de viscosidade com o tempo, assim como com a taxa de cisalhamento e a temperatura. Podem ser divididos em tixotrópicos e reopéxicos ou reopéticos. Nos fluidos tixotrópicos, a viscosidade diminui com o tempo para uma taxa de cisalhamento constante; já para os reopéxicos ocorre o contrário, ou seja, a viscosidade do fluido aumenta com o tempo para uma taxa de cisalhamento constante (LEWIS, 1993).

As soluções de xantana apresentam uma pequena tixotropia; a diminuição verificada na viscosidade é quase que totalmente reversível desde que não haja imediata destruição da estrutura interna, causada pela aplicação de taxa de deformação muito alta (NAVARRO, 1997). Certa tixotropia é de grande utilidade para cosméticos, como loções e xampus, e tintas, por exemplo, pois facilita a retirada do produto da embalagem (sem ocorrer escorrimento exagerado) e seu espalhamento durante a utilização (MOREIRA, 2002).

Em algumas formulações de goma xantana comercial são adicionados sais, tais como sais de potássio, sais de cálcio e sódio na forma de cloretos, para facilitar a solubilização, aumentar a viscosidade e manter a estabilidade (MORRIS, 1996). Ocorrem diminuições da viscosidade com o aumento da temperatura, mas a goma xantana adicionada de sais pode manter sua estrutura ordenada e sua viscosidade até cerca de 100°C (PINTO, 2005).

Os sais influenciam na viscosidade das soluções aquosas de goma xantana, sendo que alguns sais aumentam a viscosidade das soluções. Isto é resultado da estabilização da estrutura ordenada da goma xantana pelo aumento da associação intermolecular. No entanto, concentrações de biopolímero abaixo de 0,2%, a adição de sais causa leve diminuição na viscosidade (SMITH e PACE, 1982; XUEWU *et al.*, 1996).

Muitos biopolímeros apresentam mudanças na viscosidade da solução quando o pH é alterado. Entretanto, a viscosidade das soluções de goma xantana não é influenciada por mudanças de pH entre 1 e 11, na presença de 0,1% de cloreto de sódio (MORRIS, 1984).

Segundo CASAS *et al.* (2001) todas as soluções de xantana mostram um comportamento pseudoplástico. Soluções de xantana num tempo de fermentação acima de 55 horas possuem uma viscosidade mais elevada, já com aumento de temperatura a partir de 28°C ocorre um decréscimo na viscosidade, que também ocorre com aumento da concentração inicial de nitrogênio (NH_4NO_3). Em temperaturas elevadas (34°C) goma xantana é produzida com índices baixos de acetato e de piruvato e baixa massa molar, conseqüentemente, as soluções aquosas desta xantana terão viscosidades baixas, ao contrário ocorre quando baixas temperaturas (25°C) são usadas.

O processo de desacetilação altera as propriedades da xantana comercial. A viscosidade e o grau de acetilação do biopolímero são influenciados pelo álcali e sua concentração, tempo e temperatura empregados durante a reação. Os sais que podem estar contidos nas preparações comerciais afetam a viscosidade do biopolímero desacetilado. O grau de piruvatação da goma xantana modificada quimicamente não varia, conseqüentemente, não mostra relação com a viscosidade. O biopolímero desacetilado apresenta viscosidade superior à goma xantana adicionada de sais, no entanto, a remoção de grupos acetil maior que 10% proporciona um decréscimo da viscosidade. A viscosidade da goma xantana comercial dialisada diminui (170mPa.s a 10s^{-1}) em relação à amostra não purificada (430mPa.s; 10s^{-1}), provavelmente devido à eliminação dos sais de sódio e potássio. No entanto, as amostras desacetiladas que não são purificadas apresentam viscosidade superior às demais, comprovando a influência dos sais presentes na goma xantana comercial (PINTO, 2005).

Matematicamente, a viscosidade pode ser definida como: $\eta = \sigma / \gamma$, onde η é a viscosidade, σ é a tensão de cisalhamento e γ é a taxa de cisalhamento ou deformação. Muitos modelos têm sido usados para caracterizar o comportamento reológico de soluções de goma, entre eles o modelo de potência que tem sido freqüentemente usado para determinação das propriedades reológicas de fluidos alimentícios. Esse modelo descreve os efeitos da taxa de cisalhamento na viscosidade das soluções de goma xantana (XUEWU *et al.*, 1996; KAYACIER e DOGAN, 2005).

O conhecimento do comportamento reológico dos alimentos é essencial para o seu processamento, para a sua avaliação, para o seu controle de qualidade e para a aceitabilidade do consumidor. O estudo das características dos produtos à baixa

tensão de cisalhamento, relaciona-se ao controle de qualidade da produção, e o estudo das características à alta tensão de cisalhamento, relaciona-se às condições do processamento do produto (LEWIS, 1993; SCAMPARINI, 1993 apud PADILHA, 1997).

1 3 MATERIAL E MÉTODOS

1.2 3.1 Microrganismo

Uma linhagem de bactéria identificada como sendo *Xanthomonas campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 obtida a partir da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico – Campinas – SP, já utilizada em ensaios de crescimento e de produção de goma xantana.

1.3 3.2 Soro de Queijo

Como fonte de carbono e nitrogênio foi utilizado soro de queijo mussarela cedido pelo laticínio da COCEL (Cooperativa Central do Alto Uruguai) em Erechim – RS. O soro de queijo foi utilizado líquido e logo após coletado.

1.4 3.3 Metodologia

3.3.1 Determinações físico-químicas no soro de queijo

Para cada experimento retirou-se uma amostra de soro de queijo para monitorar as características pH, acidez total e gordura. As demais análises foram feitas em 4 lotes aleatórios utilizados no decorrer do trabalho. 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. Todas as análises foram tratadas estatisticamente pelo teste de Tukey.

1.4.1.1 3.3.1.1 pH

Determinado utilizando-se um potenciômetro digital GEHAKA modelo PG 2000, realizando-se leituras diretamente na amostra (IAL, 1985).

1.4.1.2 3.3.1.2 Acidez Total (°Dornic)

Realizada através de titulometria de neutralização, utilizando-se solução padrão de NaOH 0,111N e indicador fenolftaleína, segundo a metodologia de TRONCO (1997).

1.4.1.3 3.3.1.3 Gordura

Esta análise foi efetuada no local de coleta do soro por método instrumental denominado Milko-Tester (turbidimetria) (TRONCO, 1997).

1.4.1.4 3.3.1.4 Proteína

Foi utilizado método de Kjeldahl, conhecido também por método NKT (Nitrogênio Kjeldahl Total), segundo metodologia descrita por TRONCO (1997). O Fator de conversão utilizado foi 6,38.

1.4.1.5 3.3.1.5 Lactose

O método de Munson-Walker foi utilizado para a determinação do teor de lactose das amostras. Também conhecido como método de redução (Licor de Fehling), esse método baseia-se na redução de íons cúpricos (solução de sulfato de cobre) a íons cuprosos pela lactose (açúcar redutor) em meio alcalino aquecido. A solução de hidróxido de sódio faz a alcalinização do meio e, com o agente complexante (tartarato de sódio e potássio), ambos impedem o consumo de cobre(II) para a formação de hidróxido cúprico (**TRONCO, 1997 trocar por adolfo lutz**).

1.4.1.6 3.3.1.6 Minerais

O método fundamenta-se na perda de massa que ocorre quando o produto é calcinado a 500-550°C, com a destruição da matéria orgânica, sem decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (LANARA, 1981).

Os macronutrientes (Mg, Ca e K) e micronutriente (Fe) foram determinados por espectrometria de absorção atômica em chama – FAAS (Varian Spectra AA – 55), segundo metodologia descrita por AOAC (1995). Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco de Ca, Mg, K e Fe, como fonte de radiação. Os elementos foram medidos em condições de operação otimizadas por FAAS em chama ar/acetileno ou óxido nitroso/acetileno. As leituras de Ca, Mg, K e Fe foram realizadas no FAAS, no modo absorção. Para eliminar possíveis interferências na determinação de Ca e Mg, foi adicionado cloreto de lantânio nas amostras e nas soluções padrão na proporção de

1% (m/v). Os cálculos dos teores dos minerais nas amostras foram baseados em curva de calibração obtida com as soluções padrão.

3.3.2 Manutenção e caracterização do microrganismo

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 as culturas e diminuir o risco de alteração no perfil genético (ROTTAVA, 2005). Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica.

As linhagens inoculadas em ágar YM foram incubadas 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.

3.3.3 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°C ± 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 10⁸ UFC/mL.

3.3.4 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, $28^{\circ} \pm 2^{\circ}C$. 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.

3.3.5 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 2) 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 (2006). O pH inicial do meio foi ajustado para 7,2 e mantido livre durante a fermentação. O meio foi autoclavado a $121^{\circ}C/15min$. Ao meio de fermentação foi adicionado 100 mL de inóculo sendo, portanto o volume final utilizado nos experimentos de 1000 mL.

Os níveis de agitação e aeração utilizados variaram de acordo com o planejamento de experimentos. Todos os ensaios foram realizados a $28^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ por 72 horas (GOLLO, 2006).

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 , com 2 pontos axiais para cada variável independente e triplicata do ponto central, totalizando 11 ensaios. Os níveis estudados neste planejamento basearam-se em dados da literatura e testes preliminares, sendo os mesmos apresentados na Tabela 2.

As respostas avaliadas foram produção de biopolímero, células, açúcares redutores totais, oxigênio dissolvido e pH. Os cálculos para verificar o efeito das variáveis nas respostas foram feitos com o auxílio do programa Statistica 5.0.

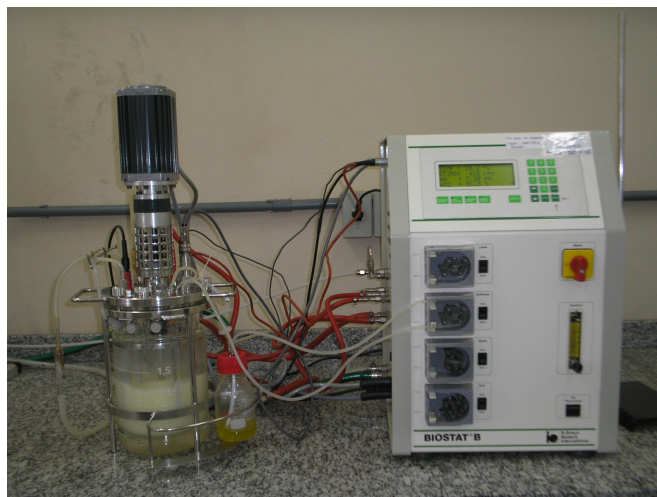


Figura 2. Ilustração do aparato experimental utilizado no estudo da produção da goma xantana

Tabela 2 - Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental 2²

Variáveis/ Níveis	-1,41	-1	0*	1	1,41
Agitação (rpm)	101	180	390	600	693
Aeração (vvm)	0	0,5	1,5	2,5	2,9

* Ponto central

3.3.6 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 calculado 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. Esta 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 de 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

lioofilizadas. 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).

3.3.7 Análise reológica do biopolímero

Foram preparadas soluções aquosas das gomas na concentração de 3 % (m/v), para análise de viscosidade aparente, a 25 °C, para todos os ensaios de fermentação.

Para as análises de viscosidade aparente foi utilizado o reômetro digital marca Brookfield, modelo LVDV III+, acoplado a um banho-maria, marca Brookfield, modelo TC-502P; utilizando-se o adaptador para pequenas amostras. O *spindle* foi escolhido de acordo com a viscosidade da amostra. As leituras foram realizadas a intervalos de 5 segundos, variando-se a taxa de cisalhamento ($4 - 264 \text{ s}^{-1}$).

As unidades de medida utilizadas foram: centipoise (cP) = mPa.s, para viscosidade aparente, 1/segundo (s^{-1}) para taxa de cisalhamento e dina/cm² para tensão de cisalhamento.

Para confirmação do comportamento pseudoplástico das soluções de gomas, foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald – de Waele ($\sigma = K \dot{\gamma}^n$) aos dados experimentais, a partir de regressão linear, usando o software Excel 2000. Plotou-se $\log \dot{\gamma} \times \log \sigma$, obtendo-se as equações das retas (taxa de cisalhamento crescente e decrescente), os valores de K (índice de consistência) e n (índice de fluxo), podendo-se então, através de análise gráfica, demonstrar o ajuste do modelo aos dados experimentais.

Para as análises de viscosidade aparente do polissacarídeo produzido no ponto central (maior produção), foram preparadas soluções salinas de gomas de acordo com os planejamentos experimentais, variando-se a concentração de goma, a concentração de sal e a temperatura, para os seguintes sais: cloreto de cálcio, cloreto de potássio e cloreto de sódio. Foram realizados três planejamentos experimentais completos 2^3 com 2 pontos axiais para cada variável independente e duplicata no ponto central totalizando 16 experimentos. As variáveis e níveis estudados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental.

Variáveis/Níveis	-1,68	-1	0*	1	1,68
Temperatura (°C)	5	13	25	37	45
Concentração de sal (% m/v)	0,0016	0,05	0,1	0,15	0,184
Concentração de goma (% m/v)	1,32	2	3	4	4,68

*Ponto central

3.3.8 – Acompanhamento cinético

O acompanhamento da cinética do processo fermentativo foi realizado na condição referente ao ponto central da fermentação. Foram retiradas amostras a cada 12 horas e feitas análises de células, ART, produção de goma, pH e oxigênio dissolvido.

Foi feita a recuperação do polímero conforme o item 3.3.6 e então feito a análise de células e produção de goma.

O acompanhamento do consumo do substrato foi feito pelo método de DNS, com amostra hidrolisada e sem hidrolisar.

Os valores de pH e oxigênio dissolvido foram lidos diretamente no equipamento que possui sensor dos mesmos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do Soro de Queijo

A caracterização do soro foi efetuada para determinação de algumas características que poderiam acarretar alterações na produção e qualidade da goma xantana produzida e foi realizada em 4 diferentes lotes utilizados durante o desenvolvimento do trabalho.

Na Tabela 4 pode-se verificar a caracterização média do soro de queijo mussarela utilizado neste estudo.

Tabela 4 – Caracterização do soro de queijo mussarela.

Análise	Soro Mussarela*
pH**	6,26 ± 0,08
Acidez (°D)**	15,00 ± 1,00
Proteína (%)	0,80 ± 0,04
Gordura (%)**	0,71 ± 0,10
Lactose (%)	4,48 ± 0,20
Cálcio (mg/100g)	49,10 ± 6,50
Ferro (mg/100g)	0,30 ± 0,10
Potássio (mg/100g)	125,00 ± 1,70
Magnésio (mg/100g)	7,30 ± 0,30

* média e desvios padrão das caracterizações realizadas

**caracterizações realizadas em todos os lotes utilizados

Os valores de proteína e lactose encontrados neste trabalho são semelhantes aos descritos por FARRO e VIOTTO (2003) e TRONCO (1997) onde apresentaram valores de 0,86% de proteínas e 4,59% de lactose.

Ainda com relação à proteína, SERPA (2005) trabalhando com soro de queijo mussarela obteve valores entre 0,77 a 0,91%, estando novamente de acordo com os valores encontrados neste trabalho. Porém, os valores de lactose encontrados por tal autor, ficam um pouco acima do valor observado (4,48%).

FARRO e VIOTTO (2003) observaram valores para os minerais potássio, cálcio e ferro em média de 140 mg/100g, 120 mg/100g e 0,1 mg/100g respectivamente. No trabalho realizado por GOLLO (2006) com soro de queijo mussarela, os valores encontrados para potássio, cálcio e ferro foram de 64 mg/100g, 36 mg/100g e 0,072 mg/100g, respectivamente. De acordo com o tipo de processamento dos queijos e o leite utilizado, podem ocorrer algumas diferenças nos teores de minerais. VEISSEYRE (1988) descreve que a variação na composição de minerais, pode ser devido à raça do animal, fase de lactação, alimentação dos animais e tipo de queijo processado. Neste trabalho a composição de minerais encontrada foi de: 49,01 mg/100g, 125,00 mg/100g e 0,30 mg/100g para cálcio, potássio e ferro, respectivamente.

Características Morfológicas da Colônia

A fim de verificar as características morfológicas das colônias do microrganismo utilizado foi realizado plaqueamento da cultura em ágar YM. Observou-se que elas apresentam formato de bastonetes e tem coloração amarela clara, o que está de acordo com a descrição apresentada por ROTTAVA (2005) e GOLLO (2006).

As colônias de *Xanthomonas* sp são geralmente amarelas, lisas e viscosas (GARCÍA-OCHOA, *et al.*, 2000). Observa-se na Figura 3 que a linhagem *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 apresenta pigmentação clara ou ausência de pigmentação em relação à maioria das linhagens, esta característica também foi descrita por ROTTAVA (2005) e GOLLO (2006).



Figura 3 - Aspecto das colônias de *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, crescidas em ágar YM, 28°C $\pm$ 2°C, 48 horas

A pigmentação das colônias deve-se às xantomonadinas que são pigmentos amarelos característicos do gênero *Xanthomonas*, este pode estar ausente quando ocorre alguma degradação ou mutação (POPLAWSKY *et al.*, 2000).

Curva de crescimento microbiano

Com o intuito de se obter informações como a fase exponencial de crescimento e concentração celular correspondente a esta faixa, foi realizada curva de crescimento microbiano. Produções mais homogêneas são resultado de um trabalho com inóculos na mesma faixa de concentração celular, por isso a importância de tais características.

A partir da curva de crescimento microbiano observou-se que o ótimo da fase de crescimento ocorre entre 8 e 20 horas de incubação a 28°C, 120 rpm e através do plaqueamento encontra-se uma concentração celular média de 10^8 UFC/mL, apresentando um período de crescimento inferior ao encontrado por ROTTAVA (2005) para a mesma bactéria (16 a 40h). A Figura 4 apresenta a curva de crescimento encontrada para a bactéria.

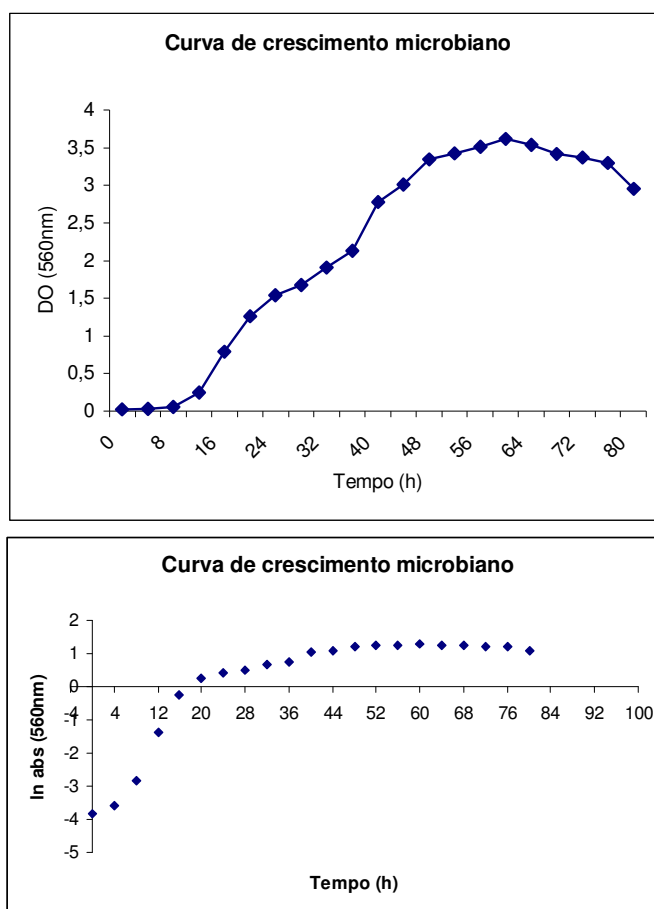


Figura 4 - Curva de crescimento microbiano, 28°C, 120 rpm

Estudo da Produção da Goma Xantana

Comportamento Cinético

Foi feito o acompanhamento da cinética do processo fermentativo na condição referente ao ponto central (Figura 5). O acompanhamento da produção de goma xantana não é apresentado no gráfico devido ao seu comportamento irregular. O meio à base de soro de queijo usado na produção afetou consideravelmente a recuperação da goma dependendo da fase em que se encontrava o processo fermentativo.

Em relação ao comportamento do pH, verificou-se que o mesmo permaneceu constante durante o processo de produção da goma. As células tiveram um incremento na concentração até as 42 horas de fermentação. Convém salientar que a determinação da concentração celular foi feita por método gravimétrico, no qual pode ter ocorrido interferência de alguns componentes do soro de queijo.

O oxigênio dissolvido no meio de produção teve um acentuado decréscimo nas primeiras horas de fermentação. Isso ocorreu provavelmente porque na fase inicial a bactéria utiliza maior quantidade de oxigênio no seu metabolismo para crescimento celular.

O comportamento cinético é comparado posteriormente com dados de literatura na análise individual das respostas.

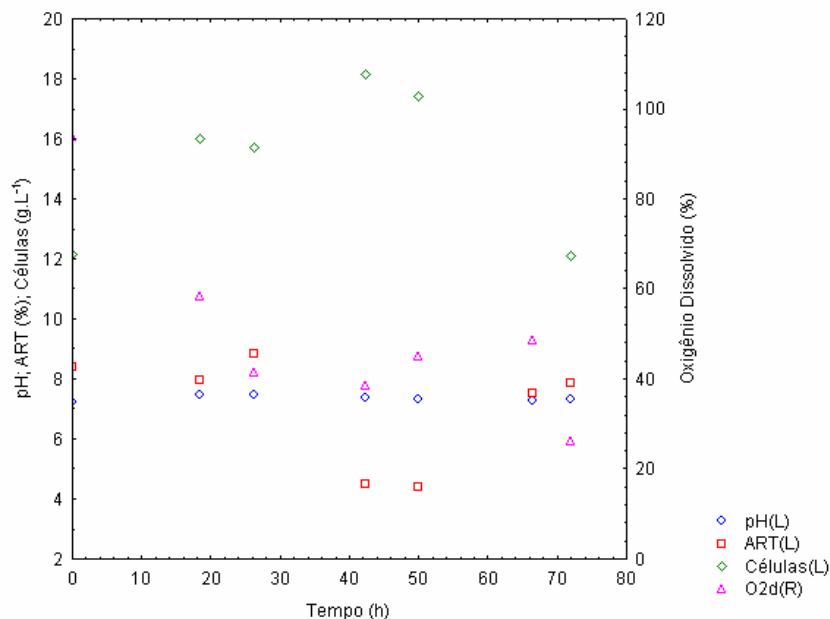


Figura 5 – Acompanhamento cinético do processo fermentativo referente ao ponto central do planejamento de experimentos

Produção de Goma

A Tabela 5 apresenta a matriz do planejamento experimental 2^2 com os valores reais e codificados e as respectivas respostas. Os dados obtidos no planejamento experimental foram tratados estatisticamente, sendo que cada resposta, produção de goma, células, açúcares redutores totais (ART), pH e oxigênio dissolvido, foi avaliada independentemente.

Tabela 5 – Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) com respostas de produção de goma, células, açúcares redutores totais, pH e oxigênio dissolvido em 72 horas.

Ensaio	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)	Produção (g.L ⁻¹)	Células (g.L ⁻¹)	ART (%)	pH	Oxigênio Dissolvido (%)
1	-1(0,5)	-1(180)	20	0,9	0,9	5,4	0
2	1(2,5)	-1(180)	24	4,5	1,2	4,4	9,1
3	-1 (0,5)	1(600)	18	3	1,1	5,4	0
4	1(2,5)	1(600)	29	4,1	0,9	6,8	27
5	-1,41(0)	0(410)	24	0,7	1,3	7,3	26
6	1,41(2,9)	0(410)	30	5	1,3	6,8	69
7	0(1,5)	-1,41(101)	17	1,3	1,6	6,9	0
8	0(1,5)	1,41(693)	31	1,4	0,3	5,6	0
9*	0(1,5)	0(390)	37	1,3	1	7	0,2
10*	0(1,5)	0(390)	33	0,6	1,3	5,6	0
11*	0(1,5)	0(390)	36	2,5	1,4	7,3	69

* ponto central

Para a resposta produção de goma foram calculados os coeficientes de regressão e os desvios padrão, mostrados na Tabela 6, onde se observa que com exceção do termo de interação entre as variáveis, todos os demais foram estatisticamente significativos. Os parâmetros lineares da agitação e aeração foram significativos com 92% de confiança e os demais com $p < 0,05$. Desta forma a análise dos dados para esta resposta foi conduzida a 92% de confiança.

A Equação 1 apresenta o modelo empírico codificado obtido para a produção de goma xantana em função das variáveis independentes estudadas. O parâmetro não significativo foi adicionado à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 7.

Tabela 6 – Coeficientes de regressão para a produção de biopolímero

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão	t(2)	p
Média	35,38*	1,29	27,39	0,001
(1)Aeração (L)	3,05**	0,79	3,85	0,06
Aeração (Q)	-4,85*	0,94	-5,13	0,03
(2)Agitação(L)	2,74**	0,79	3,46	0,07
Agitação(Q)	-6,52*	0,94	-6,90	0,02
Interação 1L x 2L	1,85	1,12	1,65	0,24

* efeitos significativos ($p < 0,05$)** efeitos significativos ($p < 0,08$)

$$P = 35,38 + 3,05 \times Ae - 4,85 \times (Ae)^2 + 2,74 \times Ag - 6,52 \times (Ag)^2 \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

P= produção de goma (g.L^{-1})

Ae = aeração

Ag= agitação

Analisando a Tabela 7, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,92 e o F calculado foi em torno de 2,4 vezes maior que o valor Tabelado, permitindo a validação do modelo codificado de segunda ordem (Equação 1).

A partir do modelo foi possível a construção da superfície de resposta apresentada na Figura 6. A maior produção de goma xantana foi encontrada no ensaio 9, com agitação de 390 rpm e aeração 1,5 vvm, correspondente ao ponto central. As menores produções foram encontradas nos ensaios com menor velocidade de agitação e níveis mais baixos de aeração, o que ocorreu provavelmente devido a menores taxas de transferência de calor e massa durante o processo fermentativo.

Tabela 7 – Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para produção de goma

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	425,74	4	106,43	8,46	3,58
Resíduos	75,45	6	12,57		
Falta ajuste	65,44	4			
Erro Puro	10,01	2			
Total	501,19	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

Coefficiente de Correlação: R = 0,92

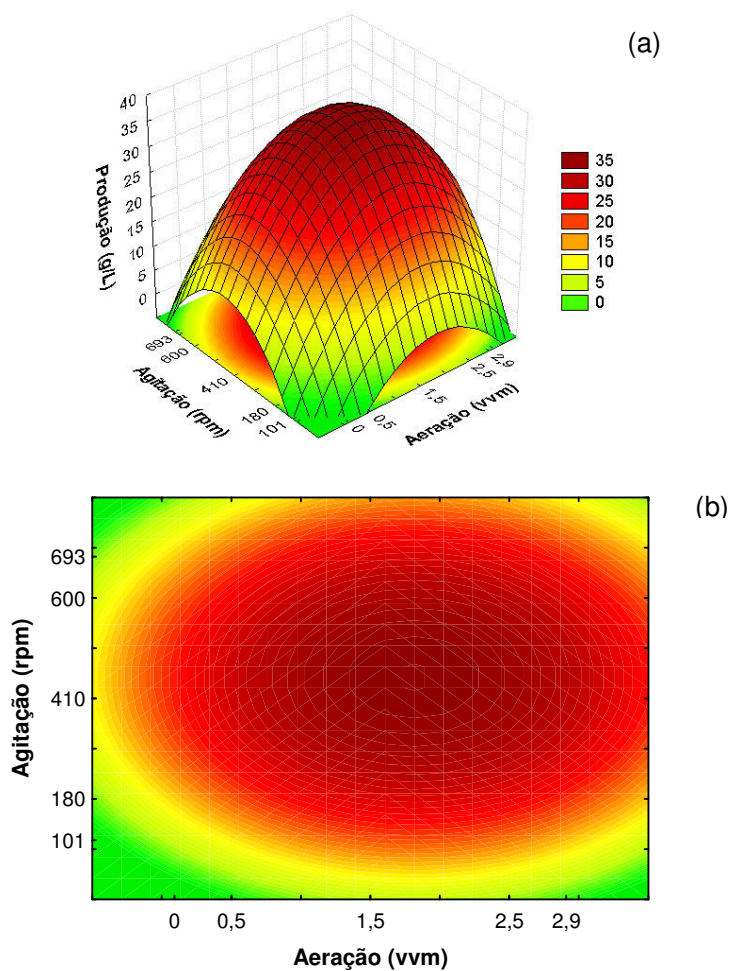


Figura 6 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) com o comportamento da produção de goma xantana em relação à agitação e aeração

Convém salientar que os experimentos 8 (693 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração), 6 (390 rpm de agitação e 2,9 vvm de aeração) e 4 (600 rpm de agitação e 2,5 vvm de aeração) também apresentaram uma alta produção de goma. Observa-se na superfície de resposta e curva de contorno obtidas a partir do modelo empírico codificado que existe uma faixa ótima de produção de goma xantana. Do ponto de vista de aumento de escala, este fato é de extrema relevância visto que está sendo utilizado um resíduo industrial para a produção da goma, o qual apresenta variações de composição dependendo do lote. Oscilações de processo referentes à agitação e aeração também estão contempladas nesta faixa ótima, não sendo a produção afetada significativamente se estes parâmetros sofrerem pequenas alterações.

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 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 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 NH₄H₂PO₄ 2,5; K₂HPO₄ 5,0; H₃BO₃ 0,006; (NH₄)₂SO₄ 2,0; FeCl₃ 0,0024; CaCl₂.2H₂O 0,002; ZnSO₄ 0,002; sacarose 50,0, pH 7,0, no qual obteve 8,83g.L⁻¹ de polissacarídeo.

MAYESKI (2005), trabalhando com meio sintético e *X. campestris* pv *mangiferaeindicae* 1230, obteve uma produção de 30,27 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 g.L⁻¹ utilizando meio PMII 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, 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.

Alguns autores também relataram à influência do tempo de fermentação na produção da goma, onde um maior tempo de fermentação acarreta uma maior produtividade (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 g.L⁻¹ e 7,9 g.L⁻¹ com 72 horas e 96 horas de fermentação respectivamente.

A Figura 7 apresenta o aspecto do biopolímero produzido nas condições referentes ao ponto central logo após a precipitação, depois de 24 horas em repouso e o polímero já separado do sobrenadante.

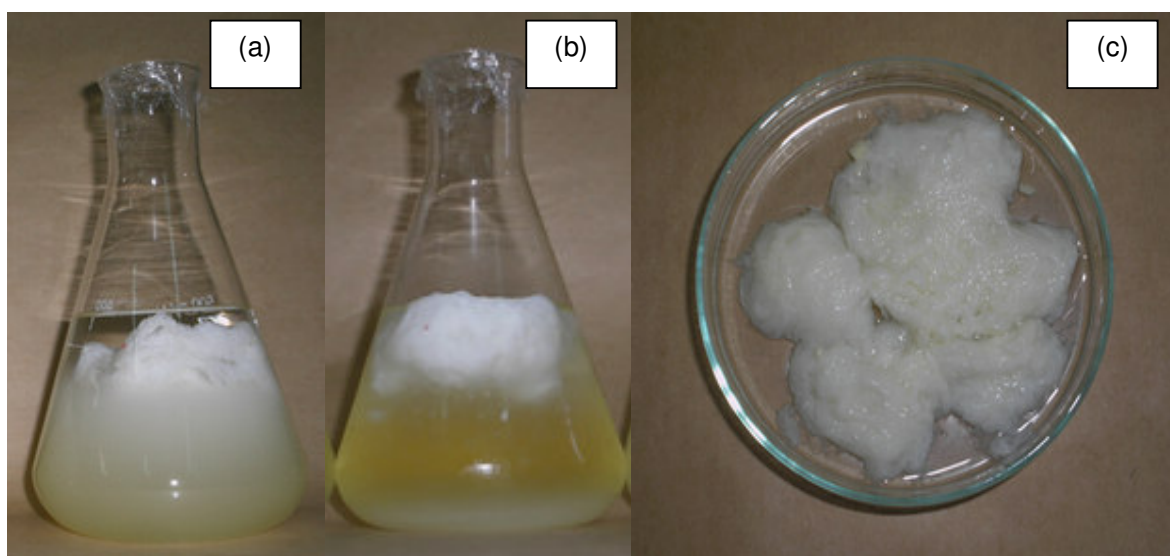


Figura 7 - Aspecto do biopolímero precipitado, logo após a adição de álcool (a), após 24 horas de repouso (b) e o polímero separado do sobrenadante (c)

Produção de células

Para a resposta produção de células foram calculados os coeficientes de regressão e os desvios padrão, mostrados na Tabela 8, onde se observa que apenas o parâmetro linear referente a aeração foi estatisticamente significativo ($p < 0,06$).

Tabela 8 – Coeficientes de regressão para a resposta concentração de células

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão	t(2)	p
Média	1,46	0,55	2,63	0,12
(1) Aeração (L)	1,35*	0,34	3,97	0,05
Aeração (Q)	0,95	0,40	2,35	0,14
(2) Agitação (L)	0,23	0,34	0,68	0,57
Agitação (Q)	0,20	0,40	0,49	0,67
Interação 1L x 2L	-0,62	0,48	-1,30	0,32

*efeitos significativos ($p < 0,06$)

Tabela 9 – Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para células

Parâmetro	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	16,08	1	16,08	12,69	4,62
Resíduos	11,41	9	1,27		
Falta de Ajuste	9,60	7			
Erro Puro	1,85	2			
Total	27,49	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

Coeficiente de correlação: R = 0,77

Analisando a Tabela 9, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,77 e o F calculado foi 2,74 vezes maior que o valor tabelado, permitindo a obtenção de um modelo codificado não linear de primeira ordem (Equação 2), que descreve a resposta células em função das variáveis independentes analisadas (agitação e aeração), dentro da faixa estudada.

$$C = 1,46 + 1,35 \times Ae \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

C= células (g.L⁻¹)

Ae = aeração

A partir do modelo foi possível a construção da Figura 8. Verifica-se que a agitação não apresentou efeito sobre a produção de células enquanto que quanto maior a aeração maior a produção.

PAPAGIANNI *et al.* (2001), avaliou o crescimento celular variando a agitação do meio de 100 a 600 rpm. Estes autores concluíram que quanto maior a agitação, maior é a taxa de crescimento celular, ao contrário do que foi encontrado no presente trabalho, onde apenas a aeração teve influência sobre o crescimento celular. Provavelmente, o crescimento não estava limitado pela transferência de massa, não sofrendo efeito da agitação.

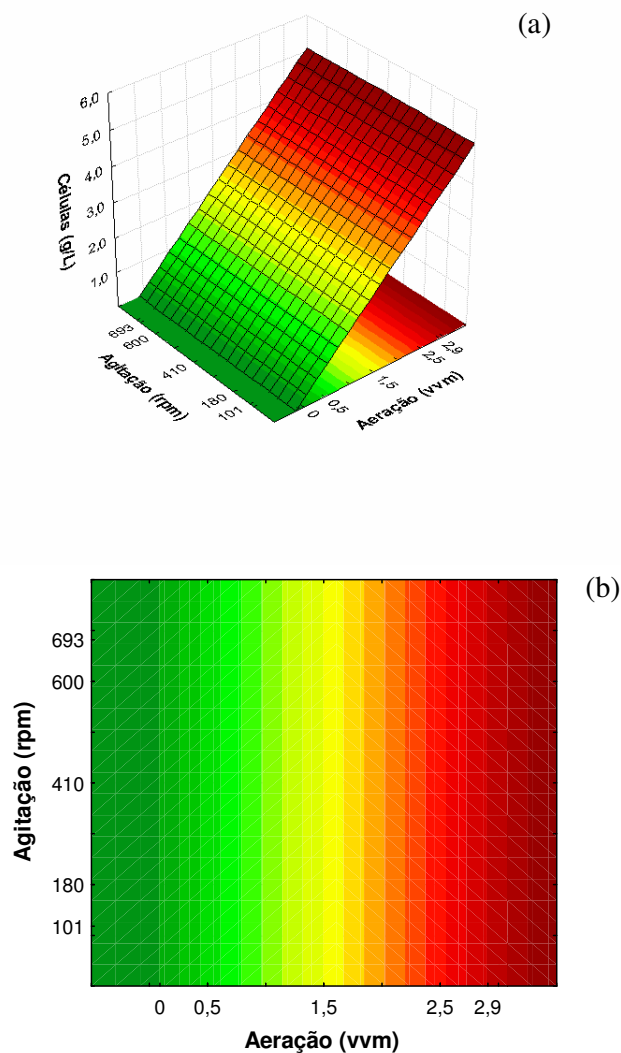


Figura 8 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) com as produções de células em relação à agitação e aeração

Açúcares Redutores Totais

No presente trabalho, pode-se perceber que a lactose foi consumida no decorrer da fermentação, evidenciando que a bactéria *X.campestris* pv *mangiferaeindicae* é capaz de utilizar a lactose como fonte de carbono para produção de goma xantana, comprovando os resultados encontrados por GOLLO (2006).

Resultados semelhantes foram observados por NITSCHKE *et al.* (2001), que verificaram que a concentração inicial de lactose no soro de queijo era de 11 g.L⁻¹ e ao final da fermentação, após 72 horas, a concentração de lactose baixou para 2,5 g.L⁻¹ indicando a adaptação do microrganismo à lactose para produção de goma xantana.

A Figura 9 apresenta o gráfico de pareto resultante do tratamento dos dados obtidos pra açúcares redutores totais (ART). Verifica-se que apenas o parâmetro linear para agitação foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$) e negativo, indicando que um aumento nos níveis de agitação acarreta uma redução no teor de açúcares redutores totais ao final do processo fermentativo. Isso provavelmente ocorre porque o aumento da agitação aumenta a transferência de massa. Entretanto não foi possível o ajuste de um modelo empírico aos dados experimentais.

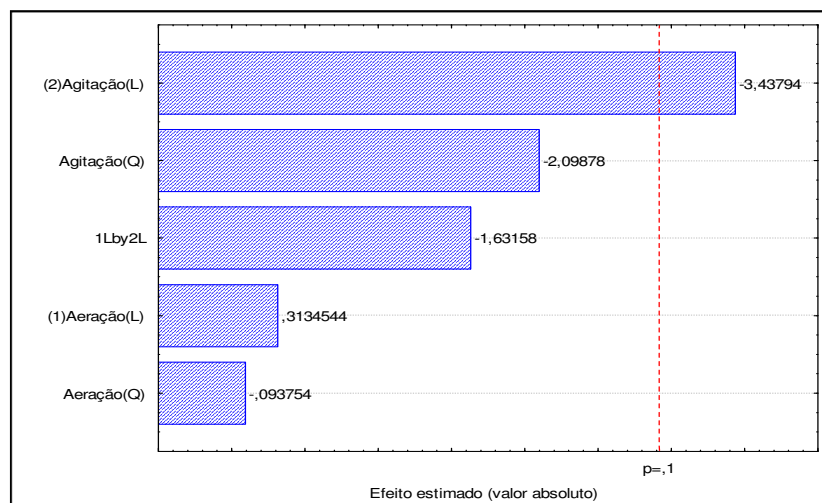


Figura 9 – Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis estudadas sobre o consumo de açúcares redutores totais

Oxigênio Dissolvido e pH

Tanto a resposta pH quanto a resposta oxigênio dissolvido não apresentaram efeito significativo estatisticamente ($p < 0,10$), e, portanto, os mesmos não sofrem influência das variáveis agitação e aeração, dentro da faixa estudada.

Em experimentos que avaliaram a concentração de oxigênio dissolvido, GARCÍA-OCHOA *et al.* (2000) encontraram resultados que demonstram que a concentração de oxigênio dissolvido diminui lentamente na fase lag e declina rapidamente na fase exponencial.

CHI e ZHAO (2003) em seus trabalhos com pululana, encontraram resultados que demonstram que após o início da fermentação com aumento da viscosidade do meio, a taxa de transferência de oxigênio diminuiu o que teve influencia negativa na produção de pululana.

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. Devido a esse aumento na

viscosidade, a velocidade de agitação não deve ser mantida constante durante o processo, pois a transferência mássica de oxigênio pode ser dramaticamente afetada (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

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 (CHI e ZHAO, 2003).

Segundo YANG *et al.* (1996) apud HSU & LO (2003) a produção de goma xantana e sua qualidade são altamente dependentes da taxa de transferência volumétrica de oxigênio em um fermentador. 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 taxa de transferência mássica de oxigênio em um fermentador depende de muitos fatores, tais como a geometria do biorreator, as propriedades do líquido, e da energia dissipada no fluido, que depende da vazão de ar, velocidade de agitação, etc (GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

De acordo com ESGALHADO *et al.*, (1995) a produção de goma xantana também é influenciada pelo pH, sendo que um máximo de produtividade de goma com as melhores viscosidades foi encontrado em valores de pH próximos à neutralidade.

Valores de pH ótimo para síntese de polissacarídeos bacterianos situam-se entre pH 6,0 e 7,5. Durante a produção de goma xantana o pH decresce para valores próximos de pH 5,0; por causa dos grupamentos ácidos presentes na xantana (GARCIA-OCHOA *et al.*, 2000).

Os valores de pH durante a produção de goma xantana por *X. campestris*, podem diminuir ou aumentar durante a fermentação, dependendo das condições e composição do meio (PAPAGIANNI *et al.*, 2001). No presente trabalho ocorreram algumas diminuições no pH chegando a um mínimo de pH 4,4, permanecendo na maior parte dos ensaios em pH próximo ao da neutralidade.

A adição de K_2HPO_4 no meio de fermentação influencia nos valores de pH, reduzindo as flutuações do pH da cultura (KALOGIANNIS *et al.*, 2003).

No estudo realizado por GOLLO (2006), os valores de pH mantiveram-se entre 7,32 e 6,65, não ocorrendo valores próximos de pH 5,0 ao longo da fermentação. PAPAGIANNI *et al.* (2001) também não obtiveram decréscimos nos valores de pH durante o período de fermentação, ao contrário, ocorreram aumentos chegando a um valor máximo de pH 9,5 quando utilizaram 600 rpm.

Durante a produção de xantana, o pH diminui para valores próximos 5,0 devido aos grupos ácidos presentes na goma xantana que está sendo formada (GARCÍA-

OCHOA *et al.*, 2000). KALOGIANNIS *et al.* (2003), fizeram um estudo com vários valores de pH inicial na produção de goma xantana e verificaram que após 20 horas o pH das culturas diminuiu para aproximadamente 6,0 enquanto que depois de 48-72 horas voltaram a subir para valores próximos à neutralidade. Um máximo de goma xantana produzida foi obtido depois de 24 horas com pH 6,6.

Mudanças na conformação como consequência da modificação estrutural pela interação de íons ou alteração na composição causada por álcalis tem sido reportadas como responsáveis pela variação de pH no processo (LOPÉZ *et al.*, 2004).

Modelo real para produção de biopolímero

Os dados obtidos no planejamento experimental também foram tratados com seus valores reais para verificar se um modelo empírico real poderia ser validado. A validação de um modelo real é de grande valia na aplicação direta deste para predizer a produção de goma em diferentes condições de aeração e agitação dentro da faixa estudada, sem que haja necessidade de codificar os níveis antes da utilização do modelo empírico.

Foram calculados os coeficientes de regressão e os desvios padrão para a resposta produção, mostrados na Tabela 10, onde se observa que apenas os termos aeração quadrática e agitação linear e quadrática foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Os parâmetros não significativos foram adicionados à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 11.

Tabela 10 – Coeficientes de regressão para a produção de biopolímero (modelo real)

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão	t(2)	p
Média	-1,59	4,97	-0,32	0,78
(1) Aeração (L)	12,62	3,50	3,61	0,07
Aeração (Q)	-4,40*	0,90	-4,87	0,04
(2)Agitação (L)	0,11*	0,02	6,00	0,03
Agitação (Q)	-1 x 10 ⁻⁴ *	0,01	-6,66	0,02
1 L x 2L	0,01	0,01	1,57	0,26

*efeitos significativos a um $p < 0,05$

Tabela 11 – Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo

Parâmetro	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média dos Quadrados	F _{calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	413,06	4	103,26	7,03	3,83
Resíduos	88,13	6	14,69		
Falta de Ajuste	78,12	4			
Erro Puro	10,01	2			
Total	501,19	10			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

Coeficiente de Correlação: R = 0,90

Verifica-se na Tabela 11 que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,90 e o F calculado foi 1,83 vezes maior que o valor Tabelado, permitindo a obtenção de um modelo codificado não linear de segunda ordem (Equação 3), que descreve a resposta produção em função das variáveis independentes analisadas (agitação e aeração), dentro da faixa estudada.

$$P = -1,59 + 12,62 \times Ae - 4,40 \times (Ae)^2 + 0,11 \times Ag - 0,0001 \times (Ag)^2 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

P= produção (g.L⁻¹)

Ae = aeração (vvm)

Ag= agitação (rpm)

A partir do modelo foi possível a construção da Figura 10, onde se observa que a mesma não difere daquela obtida com os dados codificados, mesmo com a perda da ortogonalidade, validando, portanto o modelo empírico real. Através da Figura também verifica-se que dentro dos níveis estudados, foi encontrada uma faixa ótima de agitação e aeração para a produção de goma xantana que está entre 1,0 e 2,5 vvm de aeração e 300 e 600 rpm de agitação.

Análise reológica do biopolímero

As propriedades reológicas das soluções aquosas de biopolímeros influenciam diretamente nos parâmetros de projetos de equipamentos, processamento e aplicação das gomas. Devido a estes parâmetros, foram realizados estudos quanto à viscosidade aparente das soluções aquosas a 3% (m/v) do biopolímero sintetizado e soluções aquosas de goma, com adição dos seguintes sais: cloreto de sódio; cloreto

de cálcio e cloreto de potássio. Os resultados obtidos permitiram avaliar a qualidade da goma sintetizada.

Viscosidade aparente das soluções aquosas de goma

Para verificar a qualidade das gomas produzidas, as propriedades reológicas foram avaliadas através da análise de viscosidade aparente, demonstrando o comportamento das soluções aquosas do polímero a 25°C em solução contendo 3% de goma. A Tabela 12 apresenta os valores de viscosidade encontrados para cada um dos ensaios do planejamento de experimentos a uma taxa de cisalhamento de $39,0 \text{ s}^{-1}$, que foi a taxa de cisalhamento comum para todos os ensaios do experimento.

Através do Teste de Tukey, observou-se que apenas as gomas provenientes dos ensaios 1 e 7 não apresentam diferença significativa entre si ($p < 0,05$) quanto à viscosidade das soluções analisadas.

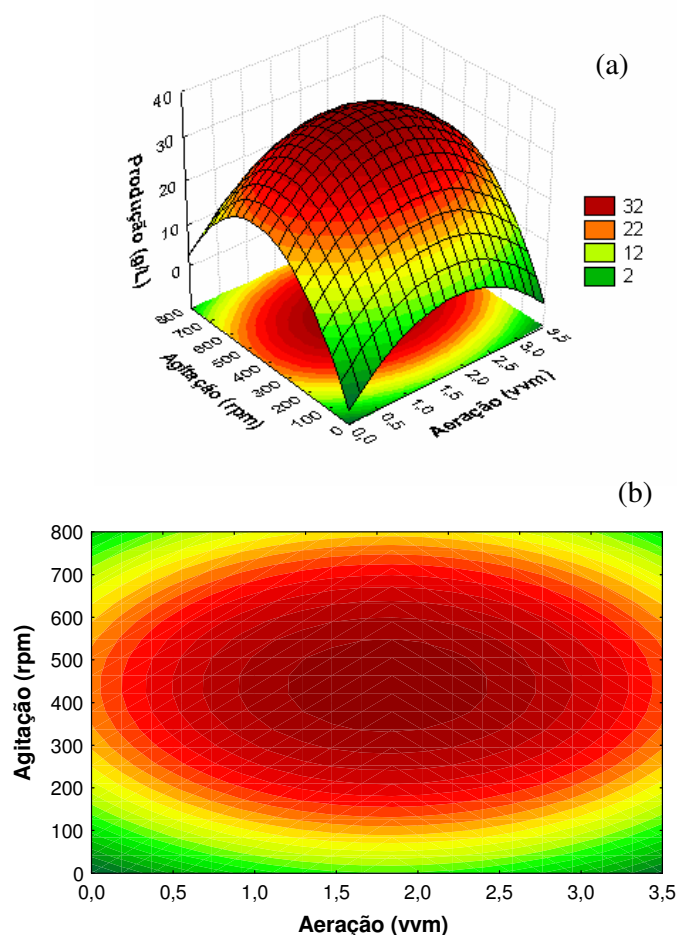


Figura 10 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) com as produções da goma em relação à agitação e aeração

Analizando individualmente as leituras de viscosidade aparente das diversas soluções aquosas a 3%, observa-se que as soluções dos ensaios 3 e 4 apresentaram as melhores viscosidades, ficando muito acima da viscosidade encontrada para solução de goma dos ensaios 1, 2 e 7. Nos ensaios 3 e 4 a velocidade de agitação foi de 600rpm, variando apenas a aeração. Os ensaios que apresentaram gomas com menor viscosidade foram aqueles em que a velocidade de agitação foi baixa.

Os dados de viscosidade também foram tratados estatisticamente conforme metodologia de planejamento de experimentos sendo estes considerados como variável dependente.

Tabela 12 – Viscosidade aparente das soluções aquosas do biopolímero produzido em cada ensaio de fermentação, representando a média de três leituras de cada solução analisada.

Ensaio	Viscosidade aparente (cP) **
1	$2,72 \pm 0,17^i$
2	$32,37 \pm 0,35^h$
3	$1831,34 \pm 23,81^a$
4	$1324,84 \pm 1,50^b$
5	$273,83 \pm 2,57^d$
6	$632,09 \pm 1,50^c$
7	$4,23 \pm 0,21^i$
8	$70,16 \pm 0,28^g$
9*	$214,35 \pm 1,26^f$

*Ponto central

**Letras minúsculas diferentes mostram resultados de viscosidade estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$)

A Figura 11 apresenta o gráfico de Pareto para a resposta viscosidade aparente em função das variáveis agitação e aeração. Percebe-se que todas as variáveis são estatisticamente significativas, sendo que apenas a interação entre as duas variáveis apresentou efeito negativo. Quando os resultados são analisados o gráfico indica que um aumento nos parâmetros individualmente acarretaria um aumento na qualidade da goma, porém como o efeito de interação é negativo, não seria eficaz um aumento nos níveis das duas variáveis, visto que isso acarretaria em uma diminuição na viscosidade da goma.

Valores de viscosidade aparente devem ser comparados quando ocorrem nas mesmas condições, o que nem sempre é possível, pois diferentes equipamentos são utilizados para a realização das análises, assim alguns autores que trabalharam com

viscosidade aparente de goma xantana são citados, porém em condições diferentes das realizadas neste trabalho, dificultando deste modo a comparação de valores. A viscosidade aparente também é influenciada pela condição de preparo da amostra, que possibilita diferentes arranjos conformacionais das cadeias (BREZOLIN *et al.*, 1998).

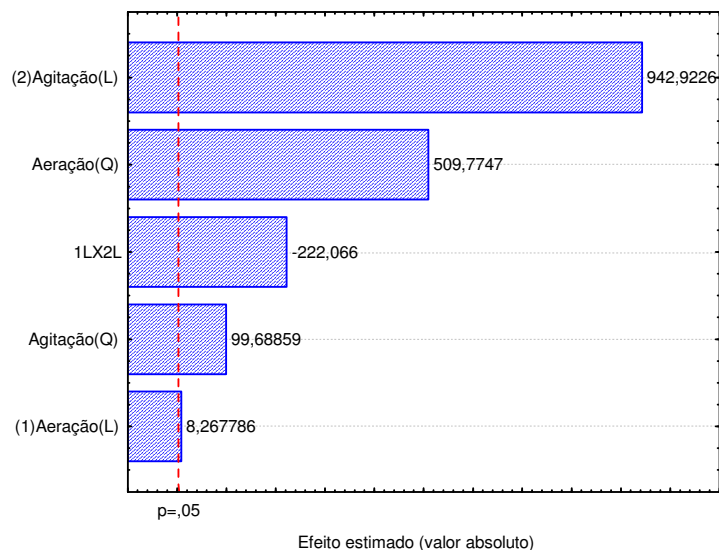


Figura 11 – Gráfico de Pareto com os efeitos das variáveis estudadas na viscosidade aparente.

ANTUNES *et al.* (2000b) trabalharam com meio de soro de queijo com soluções aquosas de goma 3%; 12 rpm a 25°C, obtendo uma viscosidade entre 10.000 e 15.000 cP.

GOLLO (2006), trabalhando com 28°C, 180 rpm, a mesma linhagem e o mesmo meio de fermentação, conseguiu gomas com viscosidade de 61,35 cP, ficando abaixo da encontrada neste trabalho, 1831,34 cP, quando trabalhou-se com 28°C, 600 rpm e 0,5 vvm de aeração, evidenciando que as condições do processo influenciam a qualidade da goma produzida.

NITSCHKE *et al.* (2001) determinaram a viscosidade aparente com solução aquosa 1% de goma sintetizada em meio de soro de queijo integral, a uma taxa de cisalhamento de 10s⁻¹ a 25°C e observaram a viscosidade final ficou em torno de 9508 cP.

FIALHO *et al.* (1999) verificaram que a goma gelana sintetizada com soro de queijo obteve viscosidades mais elevadas do que as gomas sintetizadas em meio com glicose, o mesmo não ocorreu neste caso, já que ROTTAVA, (2005) trabalhando em

meio sintético com a linhagem 1230 em solução aquosa 3% de goma xantana com viscosímetro Brookfield modelo LVDV III, spindle 18, a 25°C com taxa de cisalhamento de $1,32\text{s}^{-1}$ obteve valores de viscosidade de 1818 cP, ficando, portanto logo abaixo dos valores de viscosidade encontrados com soro de queijo (Tabela 12).

As gomas xantana produzidas em meios convencionais MPI e MP11 por *X. campestris* pv *pruni* cepa 06 apresentaram viscosidades comparáveis à goma xantana comercial, com resultados superiores a 20.000 cP a 6 rpm em solução aquosa 3% de goma. Quando empregados os meios alternativos (soro de queijo), os resultados de viscosidade foram mais baixos, indicando que em meios convencionais produziu-se xantana com qualidade superior às gomas sintetizadas com meios alternativos (ANTUNES *et al.*, 2000a).

Soluções de goma arábica, pectina, celulose microcristalina e metilcelulose exibem comportamento newtoniano, enquanto a goma xantana exibe comportamento pseudoplástico à taxa de cisalhamento maior que 10s^{-1} (YASEEN *et al.*, 2005).

PADILHA (2003) verificou que a viscosidade aparente de soluções com 1% de goma sintetizadas por *X. axonopodis* pv *manihotis* 289 e *X. campestris* pv *campestris* CA110 com 72 horas de fermentação foram de 200 a 300 cP com 10 rpm e spindle 31 a 25°C.

Para confirmação do comportamento pseudoplástico das soluções das gomas produzidas a partir de 72 horas de fermentação foi realizado o ajuste do modelo de Ostwald-de Waele aos dados experimentais, a partir da regressão linear ($\log \gamma \times \log \sigma$). A viscosidade obtida experimentalmente foi comparada com a viscosidade calculada. Os resultados obtidos nos ensaios 4 e 6 do planejamento de experimentos da produção de goma xantana, são apresentados nas Figuras 12 e 13, respectivamente. Junto às legendas de cada uma das Figuras são apresentados os valores de R^2 , K e n.

Através das figuras observa-se que os dados experimentais apresentaram um bom ajuste ao modelo, com um comportamento pseudoplástico característico. Não se observa efeitos de tixotropia ou reopexia uma vez que as curvas de viscosidade em função da taxa de cisalhamento crescente e decrescente são coincidentes. NITSCHKE *et al.* (2001) trabalhando com soro de queijo encontrou leve comportamento tixotrópico, o que é característico de soluções de goma xantana.

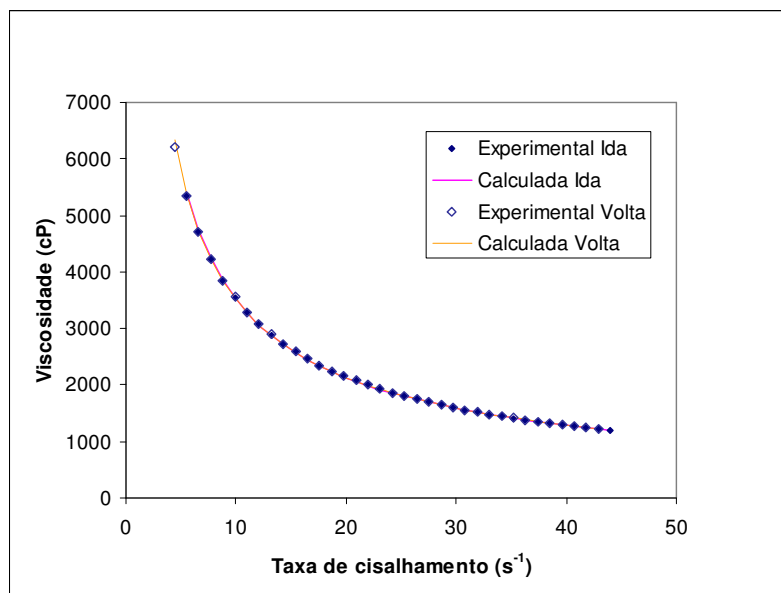


Figura 12 - Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma, leituras a 25°C. Crescente ($R^2 = 0,9988$, $K = 18,59$, $n = 0,28$) e decrescente ($R^2 = 0,9988$, $K = 18,36$, $n = 0,28$)

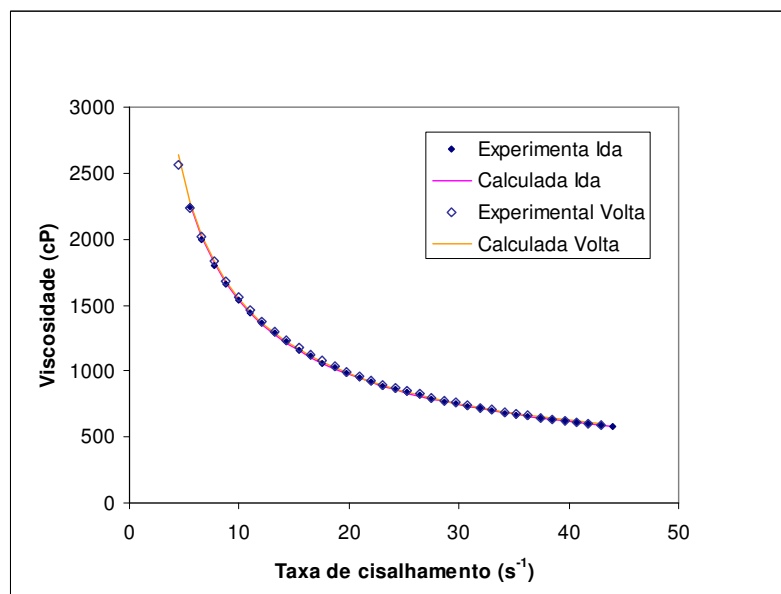


Figura 13 - Viscosidade aparente experimental e calculada das soluções aquosas a 3% de goma, leituras a 25°C. Crescente ($R^2 = 0,9993$, $K = 6,95$, $n = 0,34$) e decrescente ($R^2 = 0,9982$, $K = 6,95$, $n = 0,35$).

Sabe-se que as propriedades reológicas dos polissacarídeos em solução dependem de suas características físico-químicas intrínsecas, isto é, massa molar, polidispersão e grau de substituição. No caso dos polissacarídeos microbianos essas propriedades físico-químicas, bem como a eficiência de produção estão relacionadas ao processo fermentativo, linhagem bacteriana, composição do meio, pH, temperatura e outros parâmetros ambientais da fermentação. Fenômenos de transporte e mistura dos nutrientes no fermentador são os fatores que mais influenciam a biossíntese do biopolímero (BANIK *et al.*, 2000).

Comportamento pseudoplástico é esperado em soluções poliméricas de polissacarídeos microbianos (CACIK *et al.*, 2001; RAO *et al.*, 2003). Todas as soluções analisadas neste trabalho demonstraram comportamento pseudoplástico comprovando o que a literatura cita a respeito de soluções de goma xantana.

Viscosidade aparente das soluções salinas de goma

Foram avaliadas as viscosidades aparentes das soluções aquosas de goma provenientes do ponto central da fermentação, com adição dos seguintes sais: cloreto de sódio; cloreto de cálcio e cloreto de potássio. As concentrações de goma e sal e a temperatura foram determinadas de acordo com o planejamento experimental.

As medidas de viscosidade foram realizadas de acordo com as características de cada solução, ou seja, para soluções mais viscosas, spindles menores eram testados.

A Tabela 13 apresenta a matriz do planejamento experimental 2^3 realizado com os valores reais e codificados e as respectivas respostas para o sal cloreto de cálcio. Observa-se que a maior viscosidade (1704,53 cP) foi obtida no ensaio 14 o qual corresponde a 25°C, 0,1% de CaCl_2 e 4,68% de goma xantana, seguido do experimento 7, no qual atingiu-se uma viscosidade de 916,83 cP. Menores valores de viscosidade foram obtidos quando menores concentrações de goma eram utilizadas, conforme o esperado.

Quando se compara os valores de viscosidade aparente obtidos neste planejamento (1704,53 cP) com aqueles obtidos no ponto central do planejamento de experimentos realizado para a otimização da produção da goma (214,35 cP), ou seja, sem adição de sal na solução de goma para medida da viscosidade, verifica-se que houve um incremento de aproximadamente de 87% na viscosidade aparente da solução, porém a concentração de goma utilizada é maior. Quando se compara os resultados obtidos no ponto central deste planejamento com os obtidos das soluções aquosas de goma (mesma concentração de goma), verifica-se que também houve um

aumento na viscosidade aparente da solução pela adição de 0,1% de sal. A melhora na viscosidade devido à presença de sais, dependendo da concentração utilizada, é verificada em alguns dados de literatura que são citados e discutidos posteriormente.

Tabela 13– Matriz do planejamento experimental (valores codificados e reais) com a resposta viscosidade para o sal cloreto de cálcio.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração Sal (%)	Concentração Goma (%)	Viscosidade (cP)
1	(-1) 13	(-1) 0,05	(-1) 2	90,25
2	(1) 37	(-1) 0,05	(-1) 2	471,33
3	(-1) 13	(1) 0,15	(-1) 2	120,06
4	(1) 37	(1) 0,15	(-1) 2	64,02
5	(-1) 13	(-1) 0,05	(1) 4	733,10
6	(1) 37	(-1) 0,05	(1) 4	636,21
7	(-1) 13	(1) 0,15	(1) 4	916,83
8	(1) 37	(1) 0,15	(1) 4	458,87
9	(-1,68) 5	(0) 0,1	(0) 3	437,24
10	(1,68) 45	(0) 0,1	(0) 3	244,80
11	(0) 25	(-1,68) 0,016	(0) 3	286,90
12	(0) 25	(1,68) 0,184	(0) 3	432,50
13	(0) 25	(0) 0,1	(-1,68) 1,32	46,56
14	(0) 25	(0) 0,1	(1,68) 4,68	1704,53
15*	(0) 25	(0) 0,1	(0) 3	536,77
16*	(0) 25	(0) 0,1	(0) 3	585,36

* ponto central

Foram calculados os coeficientes de regressão e os desvios padrão, mostrados na Tabela 14, onde se observa que com exceção do termo linear de concentração de sal, todos os demais foram estatisticamente significativos com 90% de confiança ($p < 0,10$).

A Equação 4 apresenta o modelo empírico codificado obtido para a viscosidade aparente da goma em função das variáveis independentes estudadas. O parâmetro não significativo foi adicionado à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 15.

Tabela 14 – Coeficientes de regressão para viscosidade aparente quando adicionado cloreto de cálcio

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão	t(1)	p
Média	574,55*	17,42	32,98	0,02
(1) Temperatura (L)	-40,08*	6,69	-5,99	0,11
Temperatura (Q)	-97,24*	8,13	-11,96	0,05
(2) Concentração Sal (L)	-4,93	6,69	-0,74	0,60
Concentração Sal (Q)	-92,22*	8,13	-11,34	0,06
(3) Concentração Goma (L)	347,90*	6,69	51,99	0,01
Concentração Goma (Q)	84,27*	8,13	10,36	0,06
Interação 1L x 2L	-95,29*	8,74	-10,90	0,06
Interação 1L x 3L	-108,32*	8,74	-12,39	0,05
Interação 2L x 3L	57,47*	8,74	6,58	0,10

*efeitos significativos ($p < 0,10$)

$$V = 574,55 - 40,08 \times T - 97,24 \times (T)^2 - 92,22 \times (CS)^2 + 347,90 \times CG + 84,27 \times (CG)^2 - 95,29 \times T \times CS - 108,32 \times T \times CG + 57,47 \times CS \times CG \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

V = viscosidade aparente (cP)

T = temperatura

CS = concentração de sal

CG = concentração de goma

Tabela 15 – Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para viscosidade aparente quando adicionado cloreto de cálcio

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	2203419,00	7	314774,10	10,98	2,62
Resíduos	229375,00	8	28671,88		
Falta ajuste	228764,00	7			
Erro Puro	611,00	1			
Total	2432794,00	15			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

Coeficiente de correlação: R = 0,95

Analizando a Tabela 15, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,95 e o F calculado foi em torno de 4,19 vezes maior que o valor tabelado, permitindo a validação do modelo codificado de segunda ordem (Equação 4).

A partir do modelo foi possível a construção da Figura 14, onde se observa que houve interação entre todas as variáveis independentes estudadas. Nas Figuras 14 (a) e (b) verifica-se que em faixas intermediárias de temperatura e concentração de sal são obtidas as maiores viscosidades aparentes. As Figuras 14 (c) e (d) apresentam a forte interação existente entre as variáveis temperatura e concentração de goma, mostrando ainda que em temperaturas inferiores até médias (5 – 37°C) e maiores concentrações de goma (3,5 – 4,68%) acarretam em maiores viscosidades aparentes. Em relação à interação entre a concentração de goma e de sal utilizada, verifica-se que se a concentração de goma utilizada for alta a concentração de sal que resultará na maior viscosidade está na faixa entre 0,05 e 0,15%.

A matriz do planejamento experimental 2^3 realizado com os valores reais e codificados e as respectivas respostas para o sal cloreto de potássio é apresentada na Tabela 16.

Tabela 16 – Matriz do planejamento experimental realizado (valores codificados e reais) com a resposta viscosidade para o sal cloreto de potássio

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração Sal (%)	Concentração Goma (%)	Viscosidade (cP)
1	(-1) 13	(-1) 0,05	(-1) 2	52,02
2	(1) 37	(-1) 0,05	(-1) 2	10,03
3	(-1) 13	(1) 0,15	(-1) 2	21,43
4	(1) 37	(1) 0,15	(-1) 2	13,63
5	(-1) 13	(-1) 0,05	(1) 4	271,42
6	(1) 37	(-1) 0,05	(1) 4	205,52
7	(-1) 13	(1) 0,15	(1) 4	149,7
8	(1) 37	(1) 0,15	(1) 4	156,23
9	(-1,68) 5	(0) 0,1	(0) 3	109,98
10	(1,68) 45	(0) 0,1	(0) 3	18,12
11	(0) 25	(-1,68) 0,016	(0) 3	44,56
12	(0) 25	(1,68) 0,184	(0) 3	43,39
13	(0) 25	(0) 0,1	(-1,68) 1,32	13,63
14	(0) 25	(0) 0,1	(1,68) 4,68	286,89
15*	(0) 25	(0) 0,1	(0) 3	48,89
16*	(0) 25	(0) 0,1	(0) 3	47,29

*ponto central

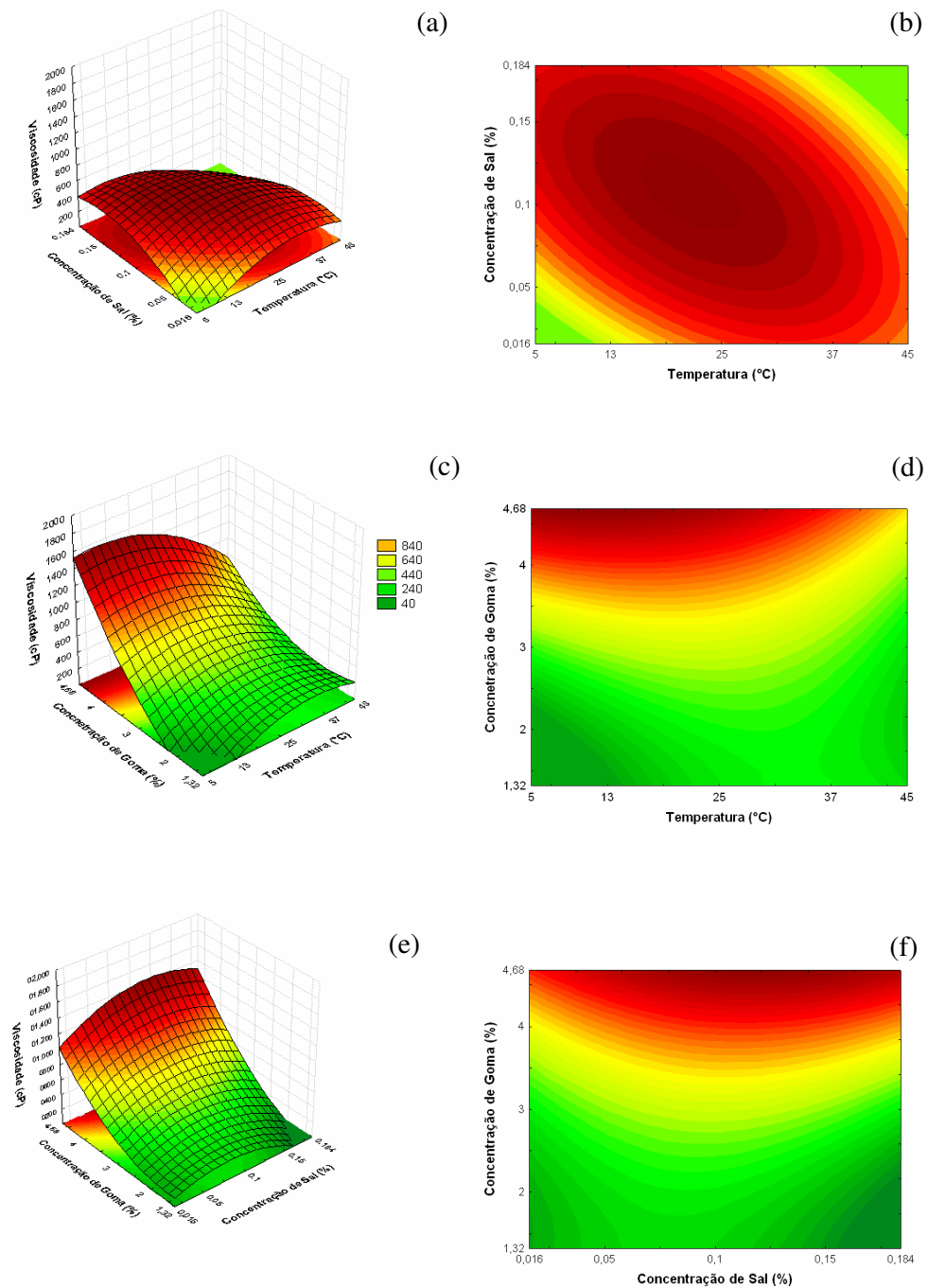


Figura 14 - Superfícies de resposta e curvas de contorno com o comportamento da goma em solução salina de CaCl_2 em relação à temperatura, concentração de sal, e concentração de goma

A maior viscosidade (286,89 cP) foi encontrada no ensaio 14, com temperatura de 25°C, 0,1% de sal e 4,68% de goma, ficando acima do valor encontrado sem a adição do sal. Convém salientar que este valor de viscosidade obtido (289,89 cP) é o menor quando comparado aos outros sais estudados. O ensaio 5 com temperatura de 13°C, 0,05% de sal e 4,00% de goma, também apresentou valores de viscosidade maiores que as soluções aquosas de goma sem adição de sais (271,42 cP). Nos dois casos a concentração de goma utilizada foi maior que aquela utilizada nos experimentos sem adição de sal, comprovando a influência da concentração de goma na viscosidade da solução. Quando se compara os resultados obtidos quando a concentração de goma é igual a concentração utilizada nos experimentos sem a adição de sal (3%), verifica-se que houve uma diminuição na viscosidade aparente da solução de 214,35 cP para 48,09 cP.

Os dados do planejamento de experimentos foram tratados estatisticamente e os coeficientes de regressão e respectivos desvios padrão são mostrados na Tabela 17, onde se observa que com exceção do termo de interação entre as variáveis temperatura (1) e concentração de goma (3), todos os demais foram estatisticamente significativos com 90% de confiança ($p < 0,10$).

O modelo empírico codificado obtido para a viscosidade da goma em função das variáveis independentes estudadas é apresentado na Equação 5. O parâmetro não significativo foi adicionado à falta de ajuste para a análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 18.

Tabela 17 – Coeficientes de regressão para viscosidade aparente quando adicionado cloreto de potássio

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão	t(1)	p
Média	45,94*	0,80	57,61	0,01
(1) Temperatura (L)	-19,31*	0,31	-63,05	0,01
Temperatura (Q)	10,70*	0,37	28,75	0,02
(2) Concentração Sal (L)	-14,66*	0,31	-47,85	0,01
Concentração Sal (Q)	3,59*	0,37	9,63	0,07
(3) Concentração Goma (L)	83,90*	0,31	273,94	0,00
Concentração Goma (Q)	41,24*	0,37	110,82	0,01
Interação 1L x 2L	13,33*	0,40	33,32	0,02
Interação 1L x 3L	-1,20	0,40	-2,99	0,21
Interação 2L x 3L	-18,00*	0,40	-45,01	0,01

*efeitos significativos ($p < 0,10$)

$$V = 45,94 - 19,31 \times T + 10,70 \times (T)^2 - 14,66 \times CS + 3,59 \times (CS)^2 + 83,90 \times CG + 41,24 \times (CG)^2 + 13,33 \times T \times CS - 18,00 \times CS \times CG \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

V = viscosidade aparente (cP)

T = temperatura

CS = concentração de sal

CG = concentração de goma

Tabela 18 – Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para viscosidade aparente quando adicionado cloreto de potássio

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	126003,80	8	15750,47	25,53	16,97
Resíduos	4318,40	7	616,91		
Falta ajuste	4317,10	6			
Erro Puro	1,30	1			
Total	130322,20	15			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

Coeficiente de Correlação: R = 0,98

A análise de variância (Tabela 18) realizada resultou em um coeficiente de correlação de 0,98 e um F calculado em torno de 1,50 vezes maior que o valor tabelado, permitindo a validação do modelo codificado de segunda ordem (Equação 5).

A partir do modelo foi possível a construção da Figura 15, que mostra também interação entre todas as variáveis estudadas, assim como ocorreu quando foi adicionado o CaCl_2 . Nas Figuras 15 (a) e (b) verifica-se a interação entre a temperatura e a concentração de sal, ou seja, em temperaturas e concentrações de sal inferiores, dentro da faixa estudada, maiores viscosidades aparentes são obtidas. Em relação à interação entre a temperatura e concentração de goma (Figura 15 (c) e (d)) verifica-se que em altas concentrações de goma a viscosidade alcançada não varia muito em função da temperatura, sendo maior em temperaturas mais baixas. Na Figura 15 (e) e (f) observa-se que em menores concentrações de sal e maiores concentrações de goma maiores viscosidades são atingidas.

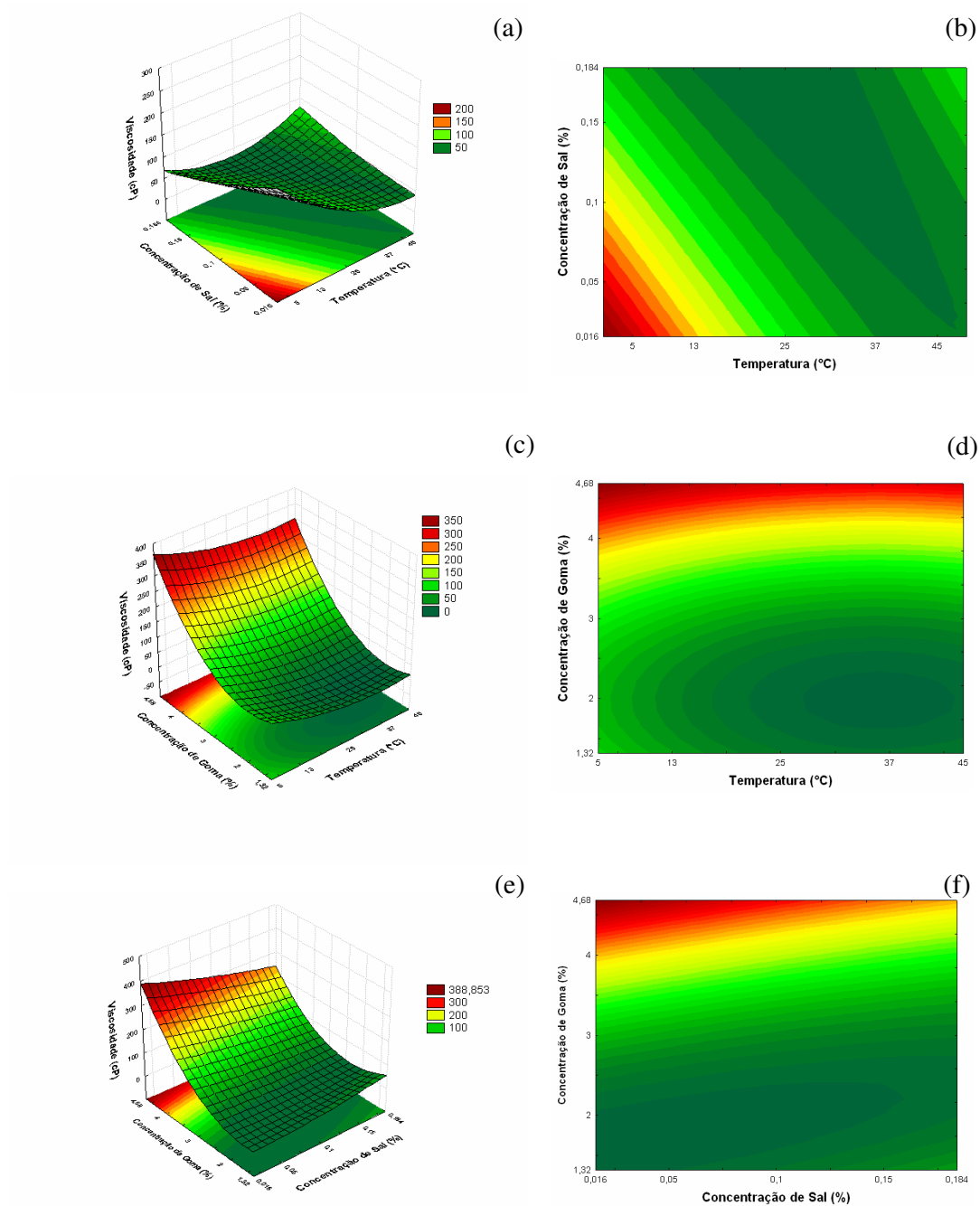


Figura 15 - Superfícies de resposta e curvas de contorno com o comportamento da goma em solução salina de KCl em relação à temperatura, concentração de sal, e concentração de goma

A Tabela 19 apresenta a matriz do planejamento experimental 2^3 realizado com os valores reais e codificados e as respectivas respostas para o sal cloreto de sódio. Na condição de temperatura de 25°C, 0,1% de sal e 4,68% de goma (ensaio 14) foi obtida a maior viscosidade (541,81 cP), ficando esta acima do valor encontrado sem a adição do sal (214,35 cP).

Os coeficientes de regressão e os desvios padrão referentes a este planejamento de experimentos são mostrados na Tabela 20, onde se observa que todos os termos foram estatisticamente significativos com 90% de confiança.

Tabela 19 – Matriz do planejamento experimental realizado (valores codificados e reais) com a resposta viscosidade para o sal cloreto de sódio

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração Sal (%)	Concentração Goma (%)	Viscosidade (cP)
1	(-1) 13	(-1) 0,05	(-1) 2	94,15
2	(1) 37	(-1) 0,05	(-1) 2	61,99
3	(-1) 13	(1) 0,15	(-1) 2	92,33
4	(1) 37	(1) 0,15	(-1) 2	28,26
5	(-1) 13	(-1) 0,05	(1) 4	111,98
6	(1) 37	(-1) 0,05	(1) 4	484,64
7	(-1) 13	(1) 0,15	(1) 4	456,20
8	(1) 37	(1) 0,15	(1) 4	308,97
9	(-1,68) 5	(0) 0,1	(0) 3	279,80
10	(1,68) 45	(0) 0,1	(0) 3	111,83
11	(0) 25	(-1,68) 0,016	(0) 3	196,91
12	(0) 25	(1,68) 0,184	(0) 3	182,83
13	(0) 25	(0) 0,1	(-1,68) 1,32	22,06
14	(0) 25	(0) 0,1	(1,68) 4,68	541,81
15*	(0) 25	(0) 0,1	(0) 3	203,43
16*	(0) 25	(0) 0,1	(0) 3	203,61

* ponto central

A Equação 6 apresenta o modelo empírico codificado obtido para a viscosidade da goma em função da temperatura, concentração de sal e de goma. A análise de variância (ANOVA) é apresentada na Tabela 21.

Tabela 20 – Coeficientes de regressão para viscosidade aparente quando adicionado cloreto de sódio

Parâmetro	Coeficientes de Regressão	Desvio Padrão	t(1)	p
Média	205,45*	0,13	1580,45	0,0004
(1) Temperatura (L)	-11,21*	0,05	-224,56	0,003
Temperatura (Q)	-7,18*	0,06	-118,38	0,005
(2) Concentração Sal (L)	8,01*	0,05	160,51	0,004
Concentração Sal (Q)	-9,29*	0,06	-153,09	0,004
(3) Concentração Goma (L)	143,51*	0,05	2874,52	0,0002
Concentração Goma (Q)	23,33*	0,06	384,59	0,002
Interação 1L x 2L	-68,97*	0,07	1057,82	0,001
Interação 1L x 3L	40,21*	0,07	616,66	0,001
Interação 2L x 3L	25,51*	0,07	391,29	0,002

*efeitos significativos (p<0,10)

$$V = 205,45 - 11,21 \times T - 7,18 \times (T)^2 + 8,01 \times CS - 9,29 \times (CS)^2 + 143,51 \times CG + 23,33 \times (CG)^2 - 68,97 \times T \times CS - 40,21 \times T \times CG - 25,51 \times CS \times CG \quad (\text{Equação 6})$$

Onde:

V = viscosidade aparente (cP)

T = temperatura

CS = concentração de sal

CG = concentração de goma

Tabela 21 – Análise de variância para avaliação da significância estatística do modelo para viscosidade aparente quando adicionado cloreto de sódio

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calculado}	F _{Tabelado}
Regressão	350524,40	9	38947,16	4,87	2,96
Resíduos	48015,40	6	8002,57		
Falta ajuste	48015,40	5			
Erro Puro	0,00	1			
Total	398539,80	15			

Resíduos = Falta de Ajuste + Erro Puro

Coeficiente de Correlação: R = 0,93

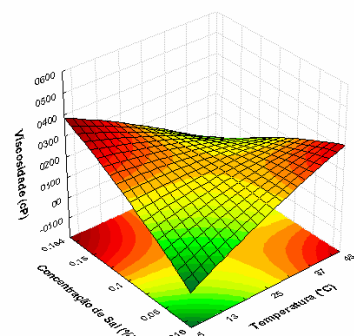
Analizando a Tabela 21, verifica-se que o coeficiente de correlação obtido foi de 0,93 e o F calculado foi em torno de 1,64 vezes maior que o valor tabelado, permitindo a validação do modelo codificado de segunda ordem (Equação 6).

A partir do modelo foi possível a construção da Figura 16 que apresenta novamente interações significativas entre as variáveis estudadas. Na Figura 16 (a) e (b) observa-se que maiores viscosidades são obtidas em concentrações de sal altas e temperaturas baixas, bem como em concentrações de sal baixas combinadas com altas temperaturas. A concentração de goma quando combinada com a temperatura e com a concentração de sal mostra que em altas concentrações de goma, há pouca variação na viscosidade, sendo ligeiramente maior a viscosidade quanto mais alta a temperatura e a adição de sal, dentro da faixa estudada (Figuras 16 (c), (d), (e) e (f)).

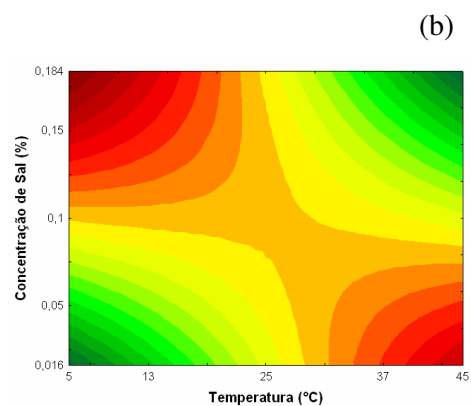
Neste estudo verificou-se que as maiores viscosidades foram obtidas em soluções que continham CaCl_2 em uma concentração de 0,1%, 4,68% de goma xantana e 25°C. Quando os outros dois sais estudados foram utilizados, verificou-se também a condição citada acima como a que acarretou uma maior viscosidade em relação à solução sem adição de sais, porém inferior aquela encontrada com CaCl_2 . Quando KCl é adicionado nas mesmas condições de concentração de goma que nos ensaios realizados sem a adição de sais, verifica-se que há uma diminuição na viscosidade aparente das soluções. Essa viscosidade mais baixa encontrada para o KCl provavelmente se deve ao fato de que o sódio e o potássio possuem apenas uma carga positiva, enquanto que o cálcio possui duas, possibilitando menor interação com as cadeias poliméricas predominantemente negativas.

Para MOREIRA (2002) o aumento na viscosidade causado pela adição de NaCl e KCl é resultado da estabilização da estrutura ordenada da xantana, gerando um aumento na associação intermolecular, por estabilização das cargas negativas da xantana.

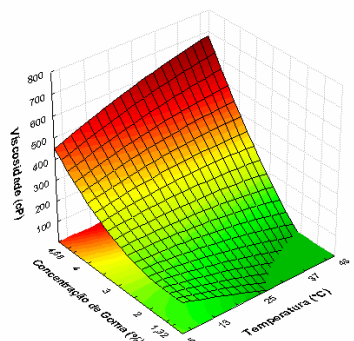
De um modo geral, as maiores produções de goma não foram as que apresentaram as maiores viscosidades. Estes dados são muito relevantes do ponto de vista da aplicação da goma produzida, pois em alguns casos são necessárias altas produções e em outros viscosidades elevadas.



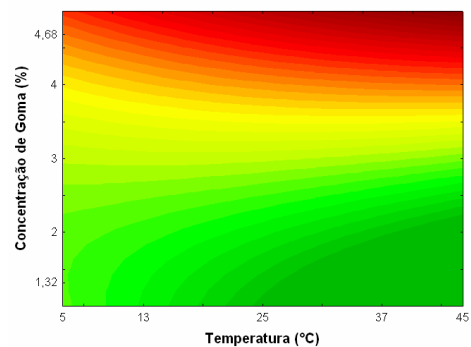
(a)



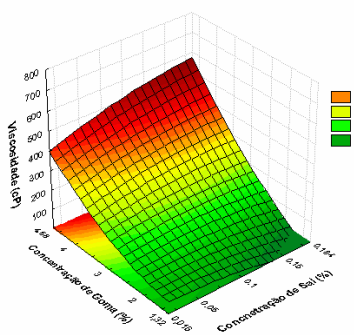
(b)



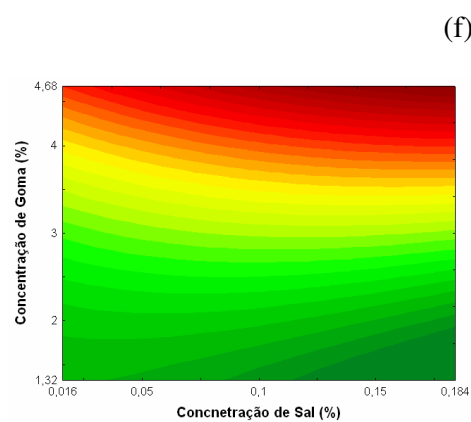
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 16 - Superfícies de resposta e curvas de contorno com o comportamento da goma em solução salina de NaCl em relação à temperatura, concentração de sal, e concentração de goma

MOREIRA *et al.*, (2001) verificaram relações da viscosidade com a temperatura, das seguintes formas: não ocorre nenhuma variação; ocorre decréscimo da viscosidade com o aumento da temperatura ou ocorre decréscimo da viscosidade com o decréscimo da temperatura, dependendo da composição da goma. Quando o conteúdo de manose na goma era alto, a viscosidade se mantinha constante ou aumentava, a 65°C, enquanto que polímeros com altas concentrações de glicose apresentaram efeito contrario. A viscosidade aparente de soluções aquosas 3% foram medidas a 25°C e 12 rpm, chegando a um valor máximo em torno de 15.000 cP, ficando acima do encontrado neste trabalho que foi de 1831,34 cP, a 25°C e 3,00 % (m/v) de goma.

LÓPEZ *et al.*, (2004) observaram que com o aumento da temperatura ocorreu um decréscimo na viscosidade das gomas estudadas, sendo mais marcante para goma comercial do que para goma sintetizada em meio de rejeitos agroindustriais.

Segundo GARCÍA-OCHOA *et al.* (2000) a viscosidade das soluções de xantana depende da temperatura na qual a viscosidade é medida, sendo que esta diminui com o aumento da temperatura. Este comportamento é associado à mudanças na conformação da molécula de xantana. A conformação vai de uma forma ordenada a baixas temperaturas de dissolução para um estado desordenado quando são empregadas altas temperaturas de dissolução. BERWANGER (2005) verificou em seu trabalho com gelana que a viscosidade das soluções diminuiu com o aumento da temperatura.

A presença de sais na solução influencia a viscosidade da xantana. A literatura apresenta algumas explicações para esse comportamento. Para baixas concentrações de polímero, a viscosidade da xantana diminui quando uma pequena quantidade de sais é adicionada na solução, efeito atribuído à redução nas dimensões moleculares, resultante de forças eletrostáticas intermoleculares diminuídas. A viscosidade aumenta para altas concentrações de xantana ou quando uma grande quantidade de sais é adicionada. Esse efeito é devido, provavelmente, ao aumento da interação entre as moléculas de polímero devido a presença de sais (SMITH & PACE, 1982 apud GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000; MILAS *et al.*, 1985 apud GARCÍA-OCHOA *et al.*, 2000).

LEE *et al.* (2003) mostraram o efeito da concentração de NaCl sobre a tensão de cisalhamento de soluções de mistura gelana/gelatina. A tensão de cisalhamento diminui com o aumento do nível de NaCl e, portanto, a viscosidade aparente das soluções diminui com o aumento do nível de íons sódio. Uma possível explicação é que a presença excessiva de íons por adição de sais pode aumentar a repulsão eletrostática, resultando em interações fracas entre as moléculas.

LÓPEZ *et al.* (2004) observaram uma diminuição na viscosidade de soluções padrão de xantana quando aumentaram a concentração de sais, sendo esta variação mais acentuada na presença de cátions divalentes ($MgCl_2$). Ao contrário de PADILHA (2003), que obteve aumento da viscosidade aparente de soluções de xantana em presença de íons cálcio.

KAYACIER e DOGAN (2005) estudaram três diferentes gomas (guar, alginato e xantana) em concentrações de 0,25; 0,5; 0,75 e 1%, com concentrações de salep de 0,5 e 0,1%. A viscosidade aparente das soluções aumentaram com o aumento da concentração das gomas. A viscosidade foi medida a 25°C em velocidade que variaram de 6 a 210 rpm. Nas condições avaliadas a goma xantana sem adição de salep obteve uma viscosidade aparente em torno de 4000 cP quando 1% de goma foi utilizada, sendo que com a adição de salep ocorreu uma leve aumento da viscosidade.

O efeito da concentração de goma no comportamento viscoso das gomas xantana, guar e goma locusta foram observados por YASEEN *et al.*, (2005), que também verificaram dependência da temperatura na viscosidade das soluções de gomas.

KIM e YOO (2005) trabalharam com misturas de amido de arroz e goma xantana a 25°C, e observaram um aumento da viscosidade aparente com o aumento na concentração da goma xantana. Também observaram influência da temperatura na viscosidade da solução.

Variações nas faixas de pH e temperatura foram estudadas por ESGALHADO *et al.*, (1995) que encontraram um valor máximo de viscosidade aparente de 100,33 cP para a goma xantana sintetizadas, quando utilizou pH entre 7,0 e 8,0 e temperaturas entre 25 e 30°C.

2 5 CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho pode-se concluir que:

- O soro de queijo pode ser utilizado como substrato na produção de goma xantana, podendo-se obter boa produção de goma com ampla faixa de viscosidade.

- Através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foi possível otimizar a produção de goma xantana em biorreator, validando um modelo empírico codificado e um real que descrevem a produção da goma em função da agitação e aeração.

- A condição otimizada para produção de xantana em biorreator de bancada para 900 mL de soro de queijo, 0,1% de sulfato de magnésio, 2% de fosfato de potássio, temperatura de 28°C e pH inicial do meio de 7,2 é agitação de 390 rpm e aeração de 1,5 vvm que resultou na produção de 36 g.L⁻¹ de goma em 72 horas.

- A maior viscosidade obtida no estudo de otimização da produção foi de 1831,34 cP, a 25°C e 3% de goma, correspondendo ao ensaio no qual a produção foi de 18 g.L⁻¹, demonstrando que maiores produções não estão relacionadas às maiores qualidades de goma.

- O estudo da adição de sais na solução de goma permitiu concluir que o uso de CaCl₂ resultou na maior viscosidade da solução dentre os sais estudados. Na condição de 25°C, 0,1% de sal e 4,68% de goma foi alcançada uma viscosidade de 1704,53 cP.

- A adição do sal na condição referente ao ponto central (maior produção – 36 g.L⁻¹ de goma) permitiu alcançar uma viscosidade similar (1704,53 cP) àquela obtida sem a adição deste (1831,34 cP) porém em um ensaio que atingiu valores bem mais baixos de produção (18 g.L⁻¹).

3 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar a estrutura dos açúcares e ácidos da goma produzida através de técnicas cromatográficas.
- Analisar a viscoelasticidade das soluções aquosas da goma.
- Realizar a desacetilação da goma para verificar os efeitos na viscosidade aparente.
- Desenvolver métodos para melhorar a quantificação da goma produzida.
- Avaliar parâmetros cinéticos da produção em biorreator.
- Determinar o coeficiente de transferência de oxigênio durante as várias fases da produção usando o método dinâmico.
- Fazer estudo da produção utilizando soro de queijo desidratado em spray-drier.
- Utilizar a metodologia de planejamento em estudos que visem o aumento da recuperação do biopolímero

4 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

(a) 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

(b) 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

Association of Official Agricultural Chemists, **Official methods of analysis of the AOAC**. 16 ed, Gaithersburg, USA, Rhapsody, 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

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

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

BOBBIO, F.O. & BOBBIO, P.A. **Introdução a Química de Alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 1992

BOZA, Yolanda E. A. G. **Encapsulamento *Beijerinckia* sp utilizando spray-drier**. Departamento de Ciência de Alimentos (FEA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas, 2002

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

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

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

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

CNPGL – Centro Nacional de Pesquisa em Gado Leiteiro – EMBRAPA: MG. 2002

CROSSMAN, L. & DOW, J.M.. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and Infection**, v.6, p.623-629, 2004

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

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

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 nº6, p.2485-2491. 1999

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

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

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

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.; KRIEQU, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T. – **BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. Philadelphia (USA): Lippincott Williams & Wilkins. 9^a edição, 100-174p. 1994

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**. 3^a 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

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

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

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

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 *mangiferae* indicada utilizando resíduo industrial. Monografia de graduação. Curso de Biologia URI - campus de Erechim, 2005

MORAINE, 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.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

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

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 nº1, 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. **Síntese e caracterização de biopolímeros por *Beijerinckia* sp 7070**, Dissertação de Mestrado – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas (UFPe), Pelotas, 1997

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

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S.K.; BATSILAS, L.; PARAS, S.V; KYRIAKIDIS, D.A.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry** v.37, p.73-80. 2001

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, nº1, p.86-97, 1999

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, nº12, 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

RAO, Y. M.; SURESH, A. K.; SURASHKUMAR, 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

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 polysaccharides 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

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

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

SMITH, J. H.; PACE, G. W. Recovery of microbial polysaccharides. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.32, p.119-129, 1982.

SILVA F.R.; VETTORE, A.L.; KEMPER, E.L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidian gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters** v.203, p.165-71, 2001

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*

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

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

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**. v. 23, p. 80-142, 1982

SUTHERLAND, I. W. & TAIT, M. I. Biopolymers. **Encyclopedia of Microbiology**. v. 1, 1992

SUTHERLAND, Ian W. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 12, p. 393-448, 1994

SUTHERLAND, I. A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, 29, 70-71, 2002

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

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

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: composición, 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

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

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, 2002a

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, 2002b

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

